

Medikationsstudie zur Untersuchung von Stabilität und
Analytik von Tetracyclinen in Honig nach der
Anwendung bei Honigbienen

Vom Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften
der Bergischen Universität Wuppertal
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

von

Thorsten Münstedt

Wuppertal 2009

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Michael Petz

an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachbereich Mathematik und
Naturwissenschaften, Fach Lebensmittelchemie

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20090704

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20090704>]

Teile dieser Arbeit wurden publiziert oder vorgetragen:

Tetracyclin-Rückstände in Honig – eine Analytik-, Medikations- und Marktstudie.

T. Münstedt, E. Rademacher, M. Petz: Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, 25.- 27. März 2002, Celle.

Tetracycline in Honig – ein Problem?

T. Münstedt, M. Petz: Gemeinsames Symposium der Lebensmittelchemischen Gesellschaft und der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 8.-10. April 2002, Münster.

Chlortetracycline and oxytetracycline residues in honey after administration to honeybees.

T. Münstedt, E. Rademacher, M. Petz: International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 4.-7. Juni 2002, Antwerpen/B.

HPLC, Charm II and ELISA: advantages and disadvantages for the analysis of tetracyclines in honey.

T. Münstedt, E. Rademacher, M. Petz: International Symposium “Pre-vention of Residues in Honey” – Apimondia/International Honey Commission, 10.-11. Oktober 2002, Celle.

HPLC, Charm II and ELISA: advantages and disadvantages for the analysis of tetracyclines in honey.

T. Münstedt, E. Rademacher, M. Petz: Apiacta 40 (2005) 5-9

Dank

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1999 bis März 2003 an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachbereich Chemie, Fach Lebensmittelchemie angefertigt.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Petz für die Überlassung des Themas zur weitgehend eigenständigen Bearbeitung, seine fachliche Betreuung und Unterstützung und vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen aussprechen.

Großer Dank gebührt auch Frau Dr. Eva Rademacher, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie, Institut für Biologie – Neurobiologie, für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung einer Medikationsstudie mit den Bienenvölkern ihres Instituts.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Gerhard Wusterack für die Betreuung der Bienenvölker während der Medikationsstudie und die große Hilfe bei der Honigernte.

Mein Dank gilt Frau Christiane Richter, Chemisches Untersuchungsamt der Stadt Hagen, für die Durchführung der Pollenanalysen der Honige.

Weiter möchte ich Frau Dr. Müller-Seitz für die zahlreichen Ratschläge und Gespräche, die Hilfestellung bei verdeckten Kontrollanalysen und die kritische Hinterfragung der gewonnenen Ergebnisse herzlich danken.

Frau Dr. Elena Smouchkina danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung von HPLC-Analysen.

Frau Meike Witt, Frau Rahil Taheri, Frau Bärbel Adam und Herrn Robin Hilicke danke ich für ihre im Rahmen eines studentischen Praktikums geleistete Mitarbeit.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit aussprechen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Roberto Fritzler, der mir jederzeit freundschaftlich zur Seite gestanden hat und mich und meine Familie stets hilfreich entlastend unterstützte.

Schließlich möchte ich meiner Frau und unseren Kindern dafür danken, dass sie stets Verständnis für meine Arbeit und die damit verbundenen Begleiterscheinungen aufgebracht haben, mich immer unterstützt und bestärkt und in schwierigen Situationen beigestanden haben.



Inhaltsverzeichnis

1	Theoretischer Teil.....	10
1.1	Einleitung	10
1.2	Tetracycline	19
1.2.1	Geschichte	19
1.2.2	Eigenschaften.....	19
1.2.2.1	Physikalische Eigenschaften	20
1.2.2.2	Chemische Eigenschaften.....	21
1.2.2.3	Antibiotische Eigenschaften.....	27
1.2.3	Analytik	29
1.2.3.1	Mikrobiologische und immu-chemische Analyseverfahren	30
1.2.3.2	Physikalisch-chemische Verfahren	33
1.3	Bienenkrankheiten	40
1.3.1	Faulbrut.....	40
1.3.2	Erreger	41
1.3.3	Verbreitung.....	41
1.3.4	Bekämpfung	41
1.4	Honig	43
1.4.1	Definition.....	43
1.4.2	Honigarten	43
1.4.2.1	Blütenhonig	43
1.4.2.2	Honigtauhonig	44
1.4.3	Zusammensetzung	44
1.4.4	Honiganalytik	45
1.5	Zielsetzung	47
2	Experimenteller Teil und Diskussion	49
2.1	Methodenentwicklung	49
2.1.1	On-line Dialyse.....	49
2.1.1.1	Funktionsweise	50
2.1.1.2	Überprüfung des Analysensystems	54
2.1.1.3	Untersuchung von Honigproben.....	54
2.1.2	Einstufige online-Festphasenextraktion	58

2.1.3	Methode nach § 64 LFGB	62
2.1.3.1	Durchführung	63
2.1.3.2	Chromatographie	64
2.2	Radiorezeptortest (Charm [®] II).....	71
2.3	Enzymimmunoassay	79
2.3.1.1	Durchführung	80
2.3.1.2	Auswertung.....	81
2.4	Medikationsstudie.....	86
2.4.1	Durchführung	86
2.4.2	Eigenschaften der geernteten Honige	92
2.4.3	Untersuchungen der Honige aus der Medikationsstudie	94
2.5	Methodenvergleich	97
2.6	Stabilitätsstudie mit Tetracyclinen in Honig	100
2.7	Marktstudie	105
2.8	Methodenfortentwicklung	111
2.8.1	Methode nach § 64 LFGB ohne Einengung	111
2.8.2	Methode nach § 64 LFGB mit einer SPE	117
2.8.3	Methode nach § 64 LFGB automatisiert	122
2.8.3.1	Optimierungen	126
2.8.3.2	Qualitätskenndaten der Chromatographie	136
2.8.3.3	Schlussbetrachtung	146
3	Zusammenfassung	148
4	Verzeichnisse	151
4.1	Literaturverzeichnis	151
4.2	Abkürzungsverzeichnis	175
5	Anhang	179
5.1	Arbeitsvorschrift	179
5.2	Programme	188
5.2.1	Programm 011	188
5.2.2	Programm 012	191
5.2.3	Programm 052	195
5.2.4	Programm 053	199
5.2.5	Programm 060	205
5.2.6	Programm 070	206

5.3	Pufferlösungen.....	213
-----	---------------------	-----

1 Theoretischer Teil

1.1 Einleitung

Nachrichten, die etwa so lauten wie „Antibiotika im Essen“ bringen viele Verbraucher in erster Linie mit Fleisch in Verbindung. Den Honig indes betrachten viele Menschen als ein wertvolles Naturprodukt. Er enthält viele gesunde Inhaltsstoffe und ist ernährungsphysiologisch wertvoller als konventioneller Zucker. Neben Zuckerverbindungen sind viele weitere natürliche Substanzen im Honig enthalten: Mineralien und Spurenelemente, Pollen, Aromastoffe und zahlreiche andere organische Verbindungen. Hin und wieder sind in den Medien Berichte über Antibiotika im Honig zu lesen. Was sind Antibiotika und wie kommen sie in den Honig?

Als Antibiotika bezeichnet man Substanzen, die Mikroorganismen abtöten oder deren Wachstum reversibel hemmen, ohne selbst Enzyme zu sein. Der Begriff wurde von dem amerikanischen Mikrobiologen Selman Abraham Waksman Anfang der 40er Jahre des 20. Jahrhunderts geprägt [FALBE und REGITZ, 1992]. Die Bezeichnung setzt sich aus den aus dem Griechischen entnommenen Begriffen „*anti*“ (= gegen) und „*biotikos*“ (= zum Leben gehörig) zusammen.

Während ursprünglich Substanzen als Antibiotika verstanden wurden, die als niedermolekulare Sekundärmetabolite von Mikroorganismen erzeugt wurden, sind heutzutage auch antibiotisch wirksame Substanzen aus Pflanzen und Tieren sowie die Gruppe aller synthetisch hergestellten antibiotisch wirksamen Substanzen hinzuzurechnen. Es wird geschätzt, dass derzeit mehr als 8.000 Antibiotika bekannt sind.

In der Humanmedizin wird der größte Teil der verwendeten Antibiotika zur Chemotherapie, d.h. zur Behandlung von Infektionskrankheiten mit chemischen Stoffen, eingesetzt. Daraus stellen die Tetracycline mit 63,1 Mio. DDD (defined daily dose) die zweitwichtigste Klasse von Antiinfektiva nach den β -Lactamantibiotika dar [SCHWABE und PAFFRATH, 2003]. Von den verordneten Tetracyclinen hat das Doxycyclin allein einen Anteil von über 90%.

Ebenso wie der Einsatz in der Humanmedizin gebietet auch der Tierschutz, erkrankte Tiere im Falle von Infektionskrankheiten mit Antibiotika zu behandeln. Aber auch zur

Prophylaxe von Krankheiten werden Antibiotika in der Tiermedizin eingesetzt, um eine bekannte Gefahr für den Tierbestand zu vermeiden.

Als Futterzusatzstoffe hatten die Antibiotika eine weitere Bedeutung in der Tierhaltung erlangt. Dazu wurden die Antibiotika als so genannte Leistungsförderer dem Futter in subtherapeutischen Dosen (unter 100 mg/kg Futter) beigemischt. Das erste Ziel war dabei nicht, krankmachende Keime abzutöten, denn das dauerhafte Keimfreimachen des Verdauungstraktes würde zu schweren Verdauungsstörungen des Tieres führen. Es sollte durch den Einsatz der antibiotischen Substanzen im Verdauungstrakt der Tiere eine günstigere Keimflora erzeugt werden, um dadurch eine bessere Futtermittelverwertung und schließlich eine kürzere Mastdauer zu erreichen. Allerdings birgt der anhaltende Einsatz von Antibiotika im Futter von Tieren die Gefahr der Ausbildung von Antibiotikaresistenzen bei human- oder tierpathogenen Mikroorganismen. Aus diesem Grunde hat die Europäische Union die Anzahl der zugelassenen Antibiotika als Wachstumsförderer schrittweise eingeschränkt und zum 1. Januar 2006 gemäß Artikel 11 Absatz 2 der Verordnung über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung gänzlich verboten [Verordnung (EG) Nr. 1831/2003]. Lediglich für die nicht als Leistungsförderer wirksamen Kokzidiostatika blieb die Zulassung bestehen [Verordnung (EG) Nr. 600/2005]. Da die Regelung spätestens seit Veröffentlichung der Verordnung am 18. Oktober 2003 im Amtsblatt der Europäischen Union bekannt war, ist eine Abverkaufs- bzw. Verwendungsfrist für etwaige vor diesem Datum hergestellte und in Verkehr gebrachte Zusatzstoffe, Vormischungen und Futtermittel nicht vorgesehen.

Die Menge der in der Bundesrepublik Deutschland eingesetzten Antibiotika im Jahre 2005 betrug 784 Tonnen [SCHNEIDERREIT, 2006]. Die Einsatzmenge der Tetracycline lag 2005 um ca. 35 Tonnen niedriger als zwei Jahre zuvor, was in dem Auslaufen von Zulassungen einiger tetracyclinhaltiger Veterinärarzneimittel begründet ist.

Von den im Jahre 1997 therapeutisch verabreichten 3.494 t Antibiotika in der Veterinärmedizin stellen die Tetracycline mit knapp 2.300 t die größte Gruppe dar, gefolgt von den Makroliden mit 424 t und den Penicillinen mit 322 t (Abbildung 1). Damit stellen die Tetracycline mengenmäßig die für die Veterinärmedizin bedeutendste Gruppe dar, während sie in der Humanmedizin Platz zwei nach den Penicillinen belegen [SCHWABE und PAFFRATH, 2003]. Das ist in erster Linie auf die relativ kostengünstigen Produktionsmöglichkeiten und ihr als Breitbandantibiotika weitreichendes Einsatzspektrum zurückzuführen.

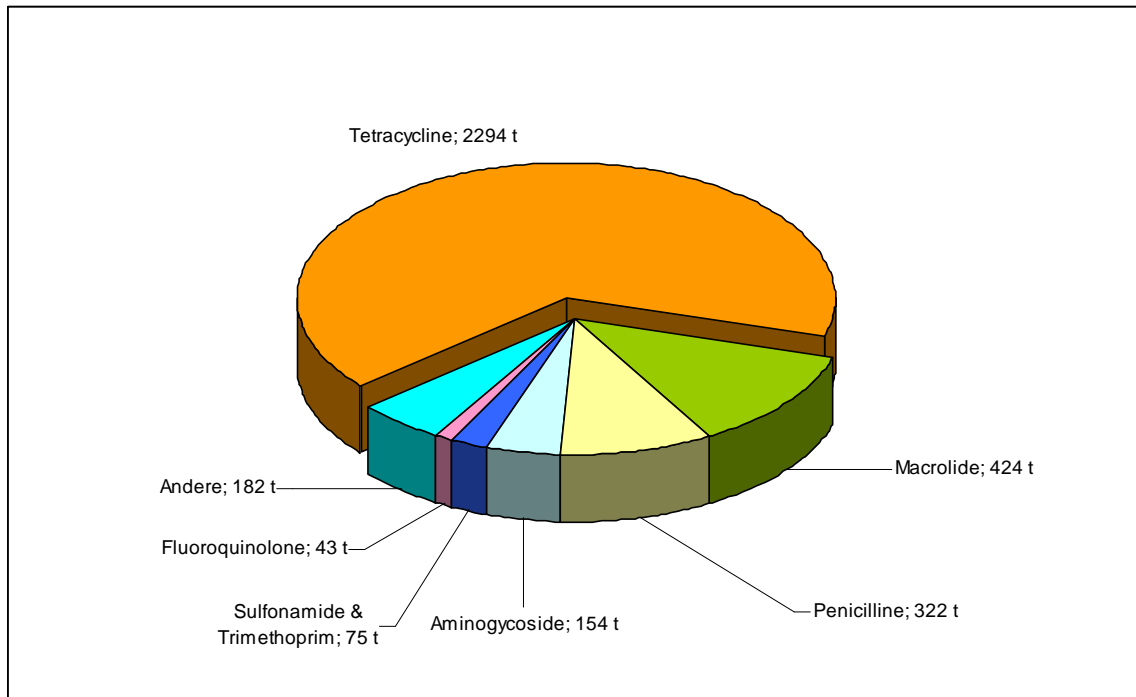


Abbildung 1 - Verbrauch der einzelnen Antibiotikagruppen im Jahre 1997 (EU plus Schweiz) für therapeutische Zwecke in der Veterinärmedizin [FEDESA, 1998].

Leider existieren nur sehr wenige aufgeschlüsselte Daten zum therapeutischen Einsatz der Tierarzneimittel nach der Tierart. Für beispielsweise sechs Landkreise in Niedersachsen stellt sich die Situation so dar, dass der größte Teil der therapeutisch verwendeten Antibiotika in der Nutztierhaltung für die Schweine- und Geflügelhaltung eingesetzt wird (Abbildung 2). [WINCKLER und GRAFE, 2000].

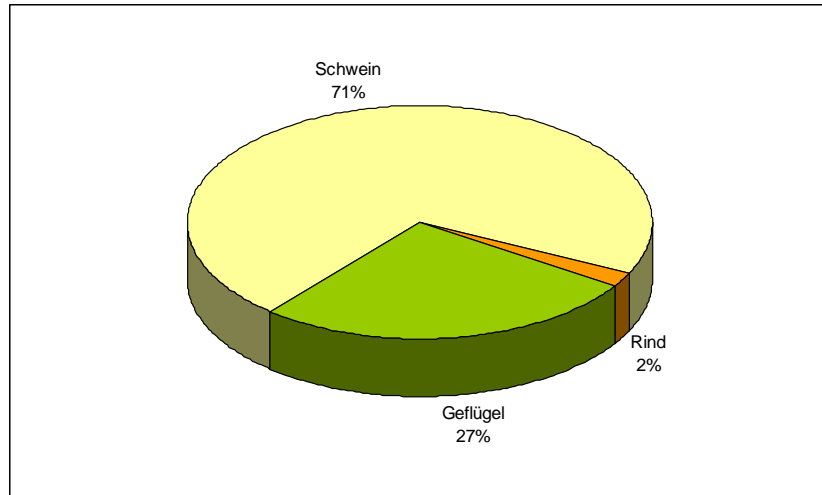


Abbildung 2 - Anteil der therapeutisch verwendeten Antibiotika in der Nutztierhaltung im Weser-Ems-Gebiet nach Tierart [WINCKLER und GRAFE, 2000]

Der Einsatz von Tierarzneimitteln bei der landwirtschaftlichen Produktion von lebensmittelliefernden Tieren kann zur Bildung von Rückständen in daraus gewonnenen Lebensmitteln führen. Somit besteht beim Verzehr derartiger Lebensmittel die Möglichkeit einer Gesundheitsgefährdung des Menschen. Zur Vermeidung derartiger Gesundheitsgefährdungen der Verbraucher existieren innerhalb der EU für Rückstände an Tierarzneimitteln und teilweise auch für ihre Metaboliten oder Abbau- und Umwandlungsprodukte festgesetzte maximale Rückstandshöchstwerte in Lebensmitteln tierischen Ursprungs [Verordnung EWG 2377/90]. Die Höchstwerte für die Tetracycline sind in der konsolidierten Fassung der Verordnung EWG 2377/90 [http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-5/reg_1990_2377_consol/reg_1990_2377_consol_de.pdf] zu finden:

Pharmakologisch wirksame(r) Stoff(e)	Marker-Rückstand	Tierart	MRL	Zielgewebe	Sonstige Vorschriften
Chlortetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	Alle zur Lebensmittel- und tierischen Erzeugung genutzten Arten	600 µg/kg	Nieren	
			300 µg/kg	Leber	
			100 µg/kg	Muskel	
			100 µg/kg	Milch	
			200 µg/kg	Eier	

Theoretischer Teil

Pharmakologisch wirksame(r) Stoff(e)	Marker-Rückstand	Tierart	MRL	Ziel-gewebe	Sonstige Vorschriften	
Doxycyclin	Doxycyclin	Rinder	100 µg/kg	Muskel	Nicht anwenden bei Tieren, von denen Milch für den menschlichen Verzehr gewonnen wird.	
			300 µg/kg	Leber		
			600 µg/kg	Nieren		
		Schweine, Geflügel	100 µg/kg	Muskel		Nicht anwenden bei Tieren, von denen Eier für den menschlichen Verzehr gewonnen werden.
			300 µg/kg	Fett + Haut		
			300 µg/kg	Leber		
Oxytetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	600 µg/kg	Nieren		
			300 µg/kg	Leber		
			100 µg/kg	Muskel		
			100 µg/kg	Milch		
			200 µg/kg	Eier		
Tetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	600 µg/kg	Nieren		
			300 µg/kg	Leber		
			100 µg/kg	Muskel		
			100 µg/kg	Milch		
			200 µg/kg	Eier		

Tabelle 1 - Auszug aus Anhang I der konsolidierten Fassung der Verordnung (EWG) 2377/90

Diese Höchstwerte dürfen bei den angegebenen Lebensmitteln, die in den Verkehr gelangen, nicht überschritten werden.

Zur Gewährleistung des Unterschreitens dieser Höchstwerte nach der Behandlung eines lebensmittelliefernden Tieres sind Wartezeiten einzuhalten. Die Länge dieser Wartezeiten richtet sich unter anderem nach der Art des applizierten Wirkstoffes, der Ausscheidung aus dem Organismus, der Art der Applikation und der Art des Tieres und ist definiert als der Zeitraum zwischen der letzten Anwendung des Arzneimittels beim Tier und dem Zeitpunkt, bis zu dem das Tier nicht zur Gewinnung von Lebensmitteln verwendet werden darf. Die Einhaltung der Wartezeit ist vom zuständigen Amtstierarzt zu überprüfen und stellt ein wesentliches Instrument zum Schutze des Verbrauchers vor rückstandshaltigen Lebensmitteln dar. Jedoch können auch bei redlichem Gebrauch von Tierarzneimitteln durch den Tierhalter und den Tierarzt mögliche Rückstände nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise kann aufgrund von Erkrankungen des Tieres eine verminderte Elimination des Wirkstoffes auftreten, für die die festgelegte Sicherheitsspanne nicht ausreichend ist.

Üblicherweise werden Ausscheidungskinetiken zur Festlegung der Wartezeiten an gesunden Tieren durchgeführt, denn eine gezielte Infektion von gesunden Tieren zum Zwecke der Untersuchung einer krankhaft veränderten Ausscheidung ist aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht statthaft. Auch eine Verschleppung von Wirkstoffen im Tiermastbetrieb durch die Fütterungsanlagen ist denkbar, denn vielfach werden die Tierarzneimittel mit dem Futter verabreicht. Ebenso ist die nicht erlaubte Anwendung von Tierarzneimitteln durch den Tierhalter ohne Konsultation eines Tierarztes ein denkbare Szenario, denn der wirtschaftliche Schaden, den beispielsweise ein Hühnereiproduktionsbetrieb erleidet, wenn über einige Tage keine Eier aus dem Betrieb verkauft werden dürfen, ist erheblich.

Die Untersuchung der Lebensmittel tierischen Ursprungs auf Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen erfolgt in Deutschland auf der Grundlage des Nationalen Rückstandskontrollplans (NRKP). Die rechtlichen Rahmenbedingungen für diesen Plan wurden auf europäischer Ebene festgelegt [Richtlinie 96/23/EG des Rates, 1996; Entscheidung 97/747/EG der Kommission, 1997] und stellen damit eine harmonisierte Rückstandsüberwachung in der EU sicher. Der Nationale Rückstandskontrollplan wurde seit 1989 von den Bundesländern zusammen mit dem Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) als koordinierende Stelle gemeinsam durchgeführt. Seit dem 1.1.2002 ist das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) anstelle des BgVV für den NRKP zuständig.

Bei der Berechnung der Untersuchungszahlen und für die Aufteilung auf die einzelnen Bundesländer wird die Schlachtstatistik des Statistischen Bundesamtes zugrunde gelegt. Die Ergebnisse des Nationalen Rückstandskontrollplans für die Jahre 1995 bis 2007 (Abbildung 3) zeigen eine Abnahme der positiven Rückstandsbefunde für die ersten Jahre seit 1995 [BVL NRKP, 2007].

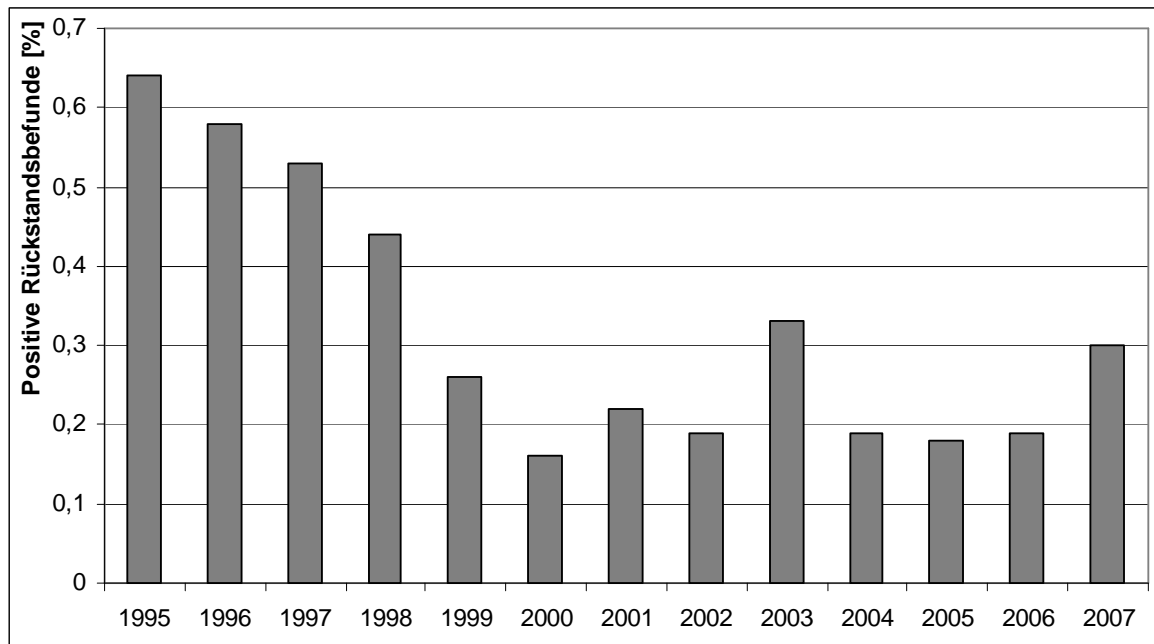


Abbildung 3 - Darstellung der positiven Rückstandsbefunde im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplans für die Jahre 1995 bis 2007 [BVL NRKP, 2007].

Im Jahre 2007 wurde bei 0,3% aller im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplans untersuchten Proben ein positiver Rückstandsnachweis geführt. Als positiver Rückstandsbefund gilt hier bei zugelassenen Stoffen und Kontaminanten alle mit einer Bestätigungsmethode abgesicherten quantitativen Befunde, bei denen eine Überschreitung der Höchstmengen vorliegt, bei verbotenen und nicht zugelassenen Stoffen alle mit einer Bestätigungsmethode abgesicherten qualitativen und quantitativen Befunde. Bei der Bewertung dieser Rückstandsbefunde ist zu beachten, dass diese Aufstellung keinen repräsentativen Charakter hat, da neben den zufällig ausgewählten Stichproben auch alle Verdachtsproben in dieser Statistik mit enthalten sind.

Für Honig stellt sich die Statistik wie Abbildung 4 zeigt dar. Dabei handelt es sich um Zahlen für die Proben, bei denen antibakterielle Stoffe in Honig nachgewiesen werden konnten. Der Anteil positiver Proben liegt mit im Mittel etwas über einem Prozent höher als der in der Gesamtstatistik.

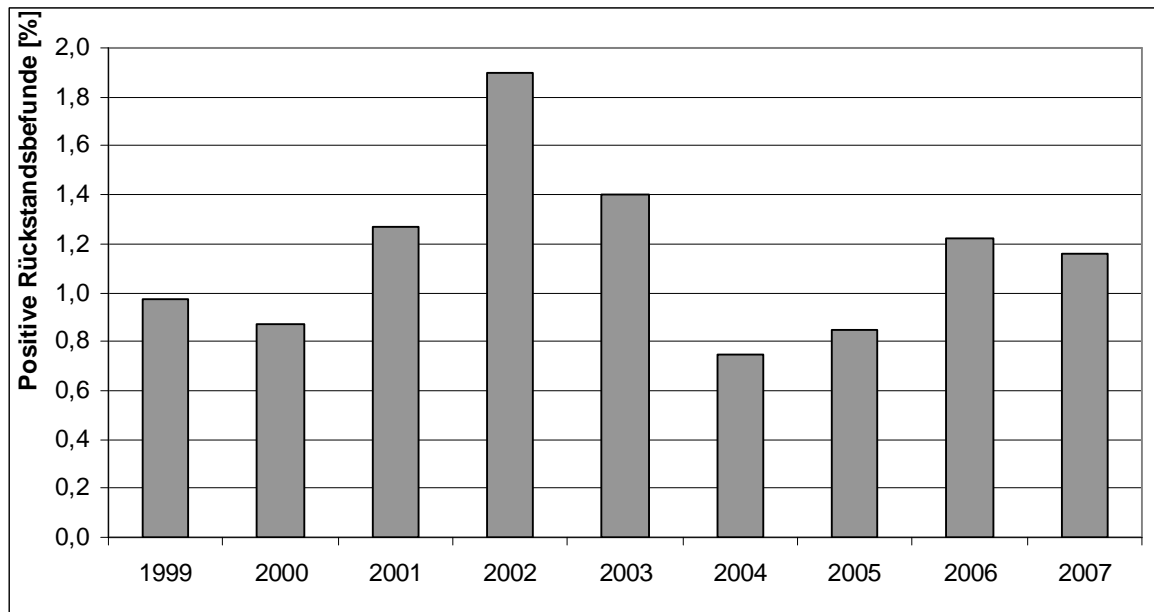


Abbildung 4 - Darstellung der positiven Rückstandsbefunde im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplans für Honig für die Jahre 1995 bis 2007 [BVL NRKP, 2007].

Laut Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit sind durch Lebensmittel mit den festgestellten Rückständen keine schwerwiegenden Gesundheitsgefahren zu erwarten. Allerdings besteht vor allem bei wiederholter Aufnahme von antibiotisch wirksamen Stoffen das Risiko einer Resistenzbildung und einer Sensibilisierung. Die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora beim Menschen wird durch kontinuierliche Aufnahme von antimikrobiell wirkenden Substanzen verändert [CERNIGLIA und KOTARSKI, 1999]. Resistenzen bilden Mikroorganismen insbesondere dann aus, wenn antibiotisch wirkende Substanzen nicht ausreichend lange oder in zu niedriger Dosierung eingesetzt werden, so dass einige Mikroorganismen die Anwendung überleben und sich an die Bedingungen anpassen können. Insbesondere die Entstehung von Kreuzresistenzen stellt ein ernsthaftes Problem für den Antibiotikaeinsatz in der Humanmedizin dar, denn die resistenten Keime sind dann auch gegen ein anderes, auf demselben Wirkprinzip beruhendes in der Humanmedizin eingesetztes Antibiotikum resistent.

Während für Muskelfleisch, Leber, Niere, Milch und Eier MRL-Werte (maximum residue limit) festgesetzt worden sind, existiert bisher kein MRL-Wert für Tetracycline in Honig. Andere Länder haben aber Grenzwerte definiert. So ist in Spanien ein Grenzwert von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in Honig festgelegt [Plan CREHA, 2004]. Die britische Food Standards Agency hat einen Aktionslevel von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ festgelegt. In der Schweiz wurde ein Toleranzwert von 0,02 mg/kg für alle Tetracycline in Honig festgelegt [Verordnung des EDI über Fremd-

und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln, 1995]. Dabei darf die Summe der einzelnen Tetracycline den Toleranzwert von 0,02 mg/kg nicht überschreiten.

Während für Tetracycline allgemein anerkannt ist, dass diese als sicher für die Anwendung bei Nutztieren gelten, existieren keine MRL für Honig, da für die Hersteller der Arzneimittel der Markt für imkerliche Anwendung zu klein erscheint und sie deshalb keine Daten bei der Europäischen Arzneimittelagentur EMA eingereicht haben [MARTIN, 2003].

Die Untersuchung der Lebensmittel tierischen Ursprungs auf Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen ist notwendig und erfordert leistungsfähige Analyseverfahren, die auch eine illegale Anwendung von pharmakologisch wirksamen Stoffen sicher nachweisen können. Bei den dazu notwendigen rückstandsanalytischen Verfahren handelt es sich aufgrund der notwendigen aufwändigen Aufarbeitung der Proben und Reinigung von störenden Begleitstoffen sowie der häufig notwendigen Aufkonzentrierung der gesuchten Wirkstoffe oft um sehr langwierige Verfahren. Es werden daher verstärkt Schnellverfahren eingesetzt, die ein schnelles Screening der Proben, d.h. ein schnelles Auffinden aller auffälligen Proben aus einer großen Menge von Proben mit negativem Befund, ermöglichen. Nur noch diese im Screening auffälligen Proben müssen der aufwändigen Analyse aus Gründen der genauen Bestimmung der Art und Menge des Rückstands zur Bestätigung unterzogen werden. Aber auch für die zur Bestätigung genutzten Verfahren sollten aus Gründen der Wirtschaftlichkeit und der Reduzierung der Fehlerquellen möglichst einfache Verfahren zur Anwendung gelangen, wobei häufig eine weitgehende Automatisierung angestrebt wird.

Die vorliegende Arbeit stellt die Ergebnisse eines Medikationsversuchs von Honigbienen mit Antibiotika aus der Gruppe der Tetracycline vor und zeigt die Leistungsfähigkeit zweier Screening-Verfahren zur schnellen Analyse von Tetracyclinrückständen in Honigen im Vergleich zu einer klassischen chromatographischen Methode. Weiter wird die Entwicklung einer weitgehend automatisierten Analysemethode zur Analytik von Rückständen an Tetracyclinen in Honigen aufgezeigt.

1.2 Tetracycline

1.2.1 Geschichte

Die Geschichte der Tetracycline begann 1948, als im Boden vorkommende Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, antimikrobiell wirksame Substanzen bilden zu können. Zuerst wurde das Chlortetracyclin (CTC) aus Kulturfiltraten von *Streptomyces aureofaciens* gewonnen und als Aureomycin[®] bezeichnet, kurze Zeit später konnte auch das zunächst als Achromycin[®] bezeichnete Tetracyclin (TC) aus der gleichen Kultur gewonnen werden. Später gelang die Isolierung von Oxytetracyclin (OTC), auch als Terramycin[®] bekannt, aus *S. rimosus*. [MITSCHER, 1978; HLAVKA u. BOOTHE, 1985]. Daraufhin wurden noch andere Varianten der Tetracycline, teils durch spezielle Kulturtechniken und damit einhergehender bevorzugter Bildung eines Tetracyclins, teils durch anschließende chemische Modifikation der mikrobiologisch gewonnenen Wirkstoffe entwickelt [GOODMAN, 1985].

1.2.2 Eigenschaften

Den verschiedenen Tetracyclinen liegt als gemeinsames Strukturmerkmal ein aus vier linear kondensierten Sechseringen bestehendes Grundgerüst zugrunde (Abbildung 5). Diese Struktur ist auch für die Namensgebung dieser Klasse antibiotisch wirkender Substanzen verantwortlich, da es sich um vier (griechisch = tetra) zyklische Ringe handelt. In Tabelle 2 in Verbindung mit Abbildung 5 - Grundstruktur der Tetracycline sind die vier für veterinärmedizinische Anwendung zugelassenen Tetracycline mit ihren jeweils unterschiedlichen Strukturelementen dargestellt.

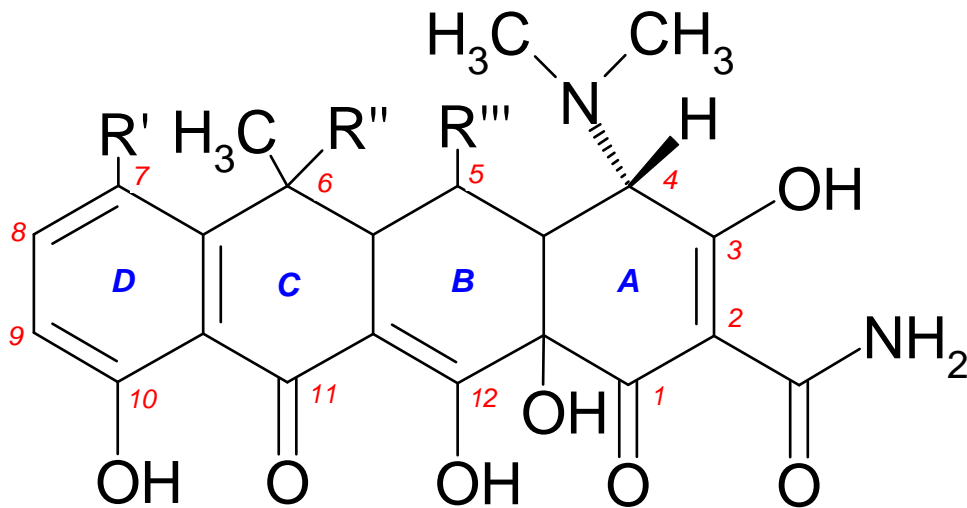


Abbildung 5 - Grundstruktur der Tetracycline

Name	R'	R''	R'''
Tetracyclin	—H	—OH	—H
Oxytetracyclin	—H	—OH	—OH
Chlortetracyclin	—Cl	—OH	—H
Doxycyclin (DC)	—H	—H	—OH

Tabelle 2 - Substituenten der verschiedenen Tetracycline

Die vier Ringe des dem Naphthacen ähnlichen Grundgerüsts werden, wie in Abbildung 5 dargestellt, zur Unterscheidung mit A bis D bezeichnet.

1.2.2.1 Physikalische Eigenschaften

Die Tetracycline liegen bei Raumtemperatur als gelbe kristalline Verbindungen vor [FALBE und REGITZ, 1989]. Aufgrund der goldgelben Farbe des Chlortetracyclins erhielt es den Handelsnamen Aureomycin®. Sie sind im Allgemeinen wenig löslich in Wasser, wobei die Löslichkeit des Oxytetracyclins am größten ist. In niederen Alkoholen, Aceton, Chloroform oder Essigsäureethylester sind sie gut löslich, während sie in unpolaren Lösungsmitteln wie Petrolether, Benzol oder Hexan sehr wenig oder nicht löslich sind. Die Löslichkeit nimmt mit steigender Polarität des Lösungsmittels zu [SALVATORE und KATZ, 1993]. Die Schmelzpunkte liegen zwischen 165 und 185 °C, wobei jedoch bereits die Zersetzung eintritt. In trockenem Zustand sind die Tetracycline bei Raumtemperatur einige

Zeit lagerungsstabil. Bei erhöhten Temperaturen tritt auch unter Sauerstoffabschluss ein beschleunigter Abbau ein [RAY und HARRIS, 1989].

UV-Absorption und Fluoreszenz

Die Tetracycline weisen zwei Absorptionsmaxima im Bereich 270 und 360 nm [MCCORMICK et al., 1957] auf. Tetracyclin zeigt in wässriger Lösung zwei Absorptionsmaxima bei 363 nm und 268 nm, für das Oxytetracyclin liegen diese bei 357 nm und 267 nm und das Chlortetracyclin hat seine Maxima bei 355 nm und 270 nm [BLACKWOOD R. K., zit. in: MITSCHLER, 1978]. Generell sind die molaren Extinktionskoeffizienten bei den niedrigeren Wellenlängen etwas größer.

Die natürliche Fluoreszenz der Tetracycline kann durch Änderung des pH-Wertes und die Anwesenheit von Metallkationen deutlich verstärkt werden. So ist zum Beispiel die Fluoreszenzemission des Chlortetracyclins bei pH-Werten niedriger als 7,5 und einer Anregungswellenlänge von 400 nm bei 530 nm am größten [MATHEW und BALARAM, 1980]. Oberhalb von pH 7,5 zeigt das Chlortetracyclin eine zusätzliche, schwächere Fluoreszenz bei 430 nm mit einer Anregungswellenlänge von 345 nm. Die Bildung von Chelatkomplexen mit Mg^{2+} oder Ca^{2+} führt zu einer weiteren Verschiebung der Emissionswellenlänge von 430 nm zu 530 nm.

1.2.2.2 Chemische Eigenschaften

In wässriger Lösung zeigen die Tetracycline in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedliche Stabilität. Aufgrund der basischen Dimethylaminofunktion und der sauren Gruppen zeigen die Tetracycline amphoteren Charakter. Die Tetracycline stellen ein dreibasisches System mit drei pK_a -Werten dar [STEPHENS et al., 1956; HÜTTENRAUCH und KEINER, 1968]. Tabelle 3 zeigt die drei pK_a -Werte und Abbildung 6 die dazugehörigen Bereiche im Molekül.

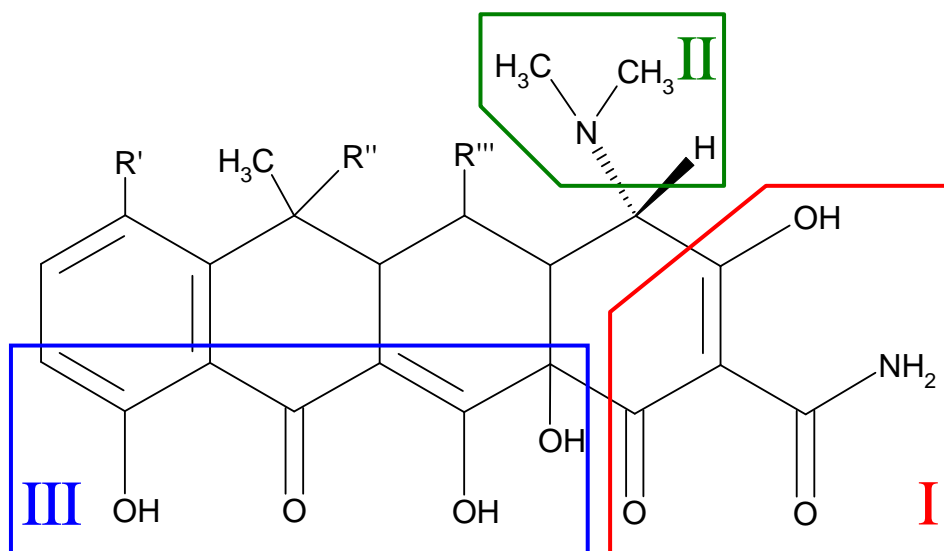


Abbildung 6 - Darstellung der drei basischen Bereiche des Tetracyclinmoleküls [nach STEPHENS, 1956]

Name	pK _a (I)	pK _a (II)	pK _a (III)
Oxytetracyclin	3,27	7,32	9,11
Chlortetracyclin	3,30	7,44	9,27
Tetracyclin	3,30	7,68	9,69

Tabelle 3 - pK_a-Werte von drei Tetracyclinhydrochloriden in wässriger Lösung [STEPHENS, 1956]

Der niedrigste pK_a wird von dem mit I bezeichneten Bereich im Molekül verursacht. Dabei ist ein Mechanismus wahrscheinlich (Abbildung 7), in dem sich durch den Verlust eines Protons ein Carbanion bildet, dessen Ladung über den Bereich der Kohlenstoffatome 1, 2, 3 und das Kohlenstoffatom des primären Säureamids delokalisiert ist [MITSCHER, 1978].

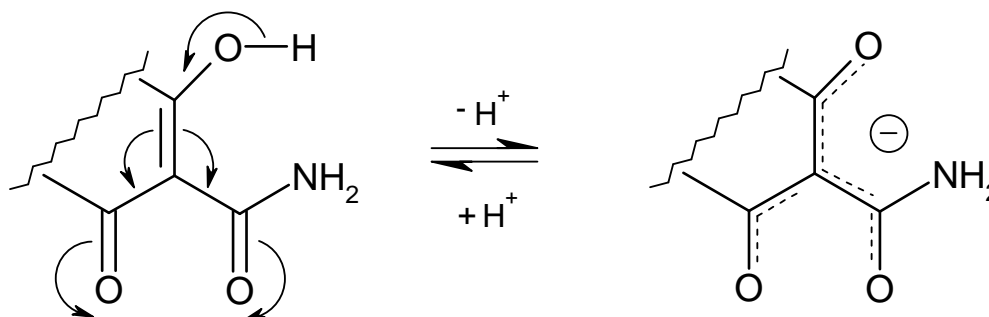


Abbildung 7 - Mechanismus für pK_aI

Der mittlere pK_a ergibt sich aus dem vinylogenen Dicarbonsystem der Ringe B und C, der ebenfalls zu einem resonanzstabilisierten System führt:

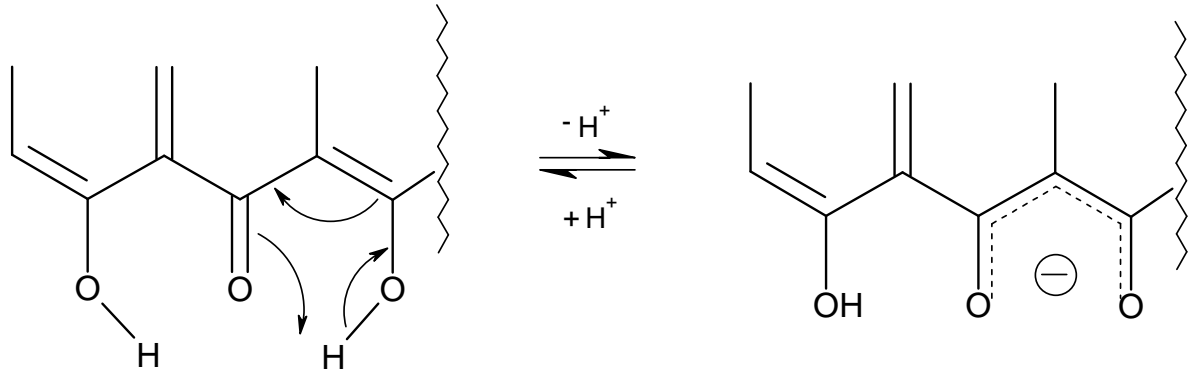


Abbildung 8 - Mechanismus für pK_a III

Für den höchsten pK_a -Wert ist die protonierte Dimethylaminofunktion am Kohlenstoffatom 4 verantwortlich.

Die Tetracycline können mit Säuren und Basen wasserlösliche Salze bilden, wobei die Hydrochloride aufgrund der guten Wasserlöslichkeit auch therapeutisch die größte Bedeutung haben.

Umlagerungsprodukte

Epimerisierung

Die Tetracycline besitzen mit dem Kohlenstoffatom 4 ein asymmetrisches Zentrum, an dem sich eine Umkehr der Konfiguration vollziehen kann (Abbildung 9). Diese durch Protonen katalysierte, reversible Isomerisierung wird in der Tetracyclin-Literatur als Epimerisierung bezeichnet [MCCORMICK et al., 1957; REMMERS et al., 1963; HUSSAR et al., 1968].

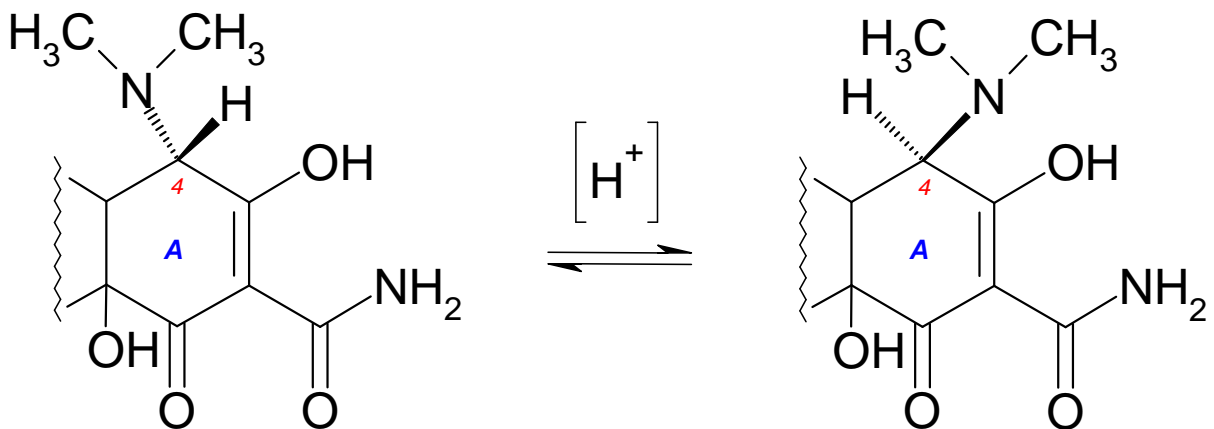


Abbildung 9 - Epimerisierung der Tetracycline

Die Epimerisierung folgt bei pH 4 einer Reaktion erster Ordnung und hat bei pH 3,2 ein Maximum, während die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichts unter anderem von der Art des Puffers, der Pufferkonzentration, dem pH-Wert und der Temperatur abhängig ist. Durch eine höhere Konzentration eines Phosphatpuffers bei konstantem pH-Wert kann eine deutlich schnellere Einstellung des Gleichgewichtszustands erreicht werden [REMMERS et al., 1963]. Auch Komplexbildner wie Thioharnstoff, Harnstoff oder Polyethylenglycol (siehe Seite 26) können einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Epimerisierung haben [NAGGAR et al., 1974b]. Die Tetracycline mit den höchsten pK_a -Werten in der zweiten Dissoziationsstufe zeigen die geringste Epimerisierungstendenz [HÜTTENRAUCH und KEINER, 1968]. Zwar findet Epimerisierung bereits mit geringer Geschwindigkeit in wässrigen Lösungen statt, jedoch zeigen Untersuchungen, dass eine Epimerenbildung im Organismus über das im wässrigen Medium gebildete Maß hinaus stattfindet [ZURHELLE et al., 1999; KÜHNE und WENZEL, 2001].

Isomerisierung

Wird Chlortetracyclin bzw. Tetracyclin alkalisch behandelt, bilden sich je nach Ausgangsverbindung Isochlortetracyclin oder 4-Epi-Isochlortetracyclin bzw. Isotetracyclin oder 4-Epi-Isotetracyclin (Abbildung 10). Diese Reaktion ist irreversibel. Das gebildete Isochlortetracyclin ist lichtempfindlich [KENNEDY et al., 1998b] und weist im alkalischen Bereich eine verstärkte Fluoreszenz im Wellenlängenbereich 380-420 nm auf [BRYAN et al., 1992]. Das Isochlortetracyclin weist im gesamten pH-Bereich Fluoreszenz auf. Die optimalen Bedingungen für die Fluoreszenz sind 350 nm als Anregungswellenlänge und 415 nm als Emissionswellenlänge im alkalischen Medium ($pH > 10$) [AHMED und JEE, 1984]. Vom Oxytetracyclin ist bisher keine Iso-Verbindung bekannt, lediglich eine Arbeit vermutet das Vorhandensein eines Iso-Oxytetracyclin als Abbauprodukt [HALLING-SØRENSEN et al., 2002].

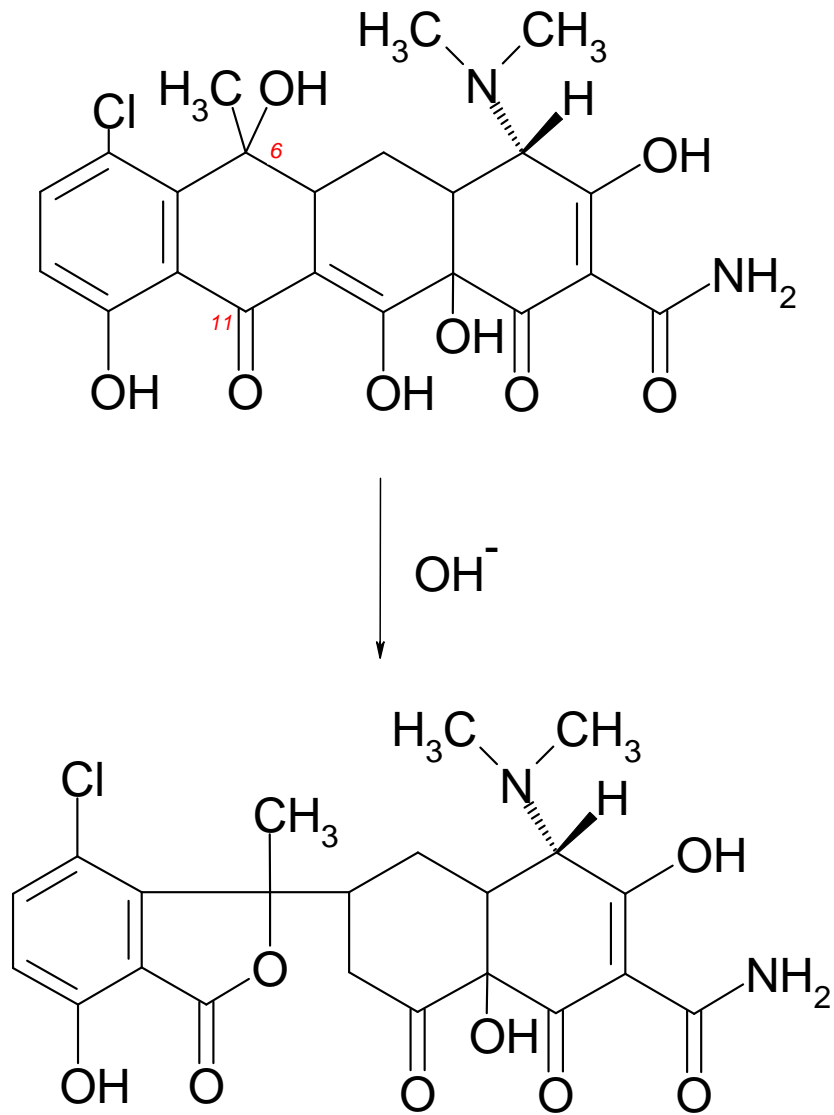


Abbildung 10 - Bildung von Isochlortetracyclin

Dehydratation

In stark sauren Lösungen werden die Tetracycline unter Ausbildung eines aromatischen Systems im Ring C des Tetracyclinmoleküls zu Anhydrotetracyclinen dehydratisiert (Abbildung 11) [McCORMICK et al., 1957].

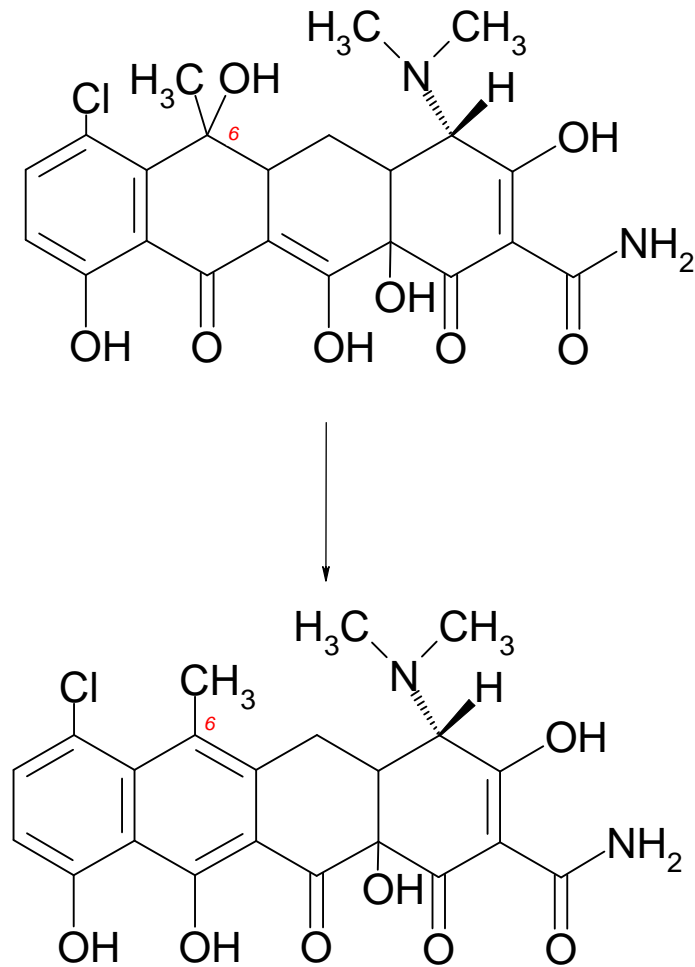


Abbildung 11 - Dehydratisierung von Chlortetracyclin

Während sich aus Tetracyclin und Chlortetracyclin die jeweiligen Anhydrotetracycline bilden, reagiert das Oxytetracyclin in wässriger Lösung weiter zu α - und β -apo-Oxytetracyclin (Abbildung 12) [DÜRCKHEIMER, 1975].

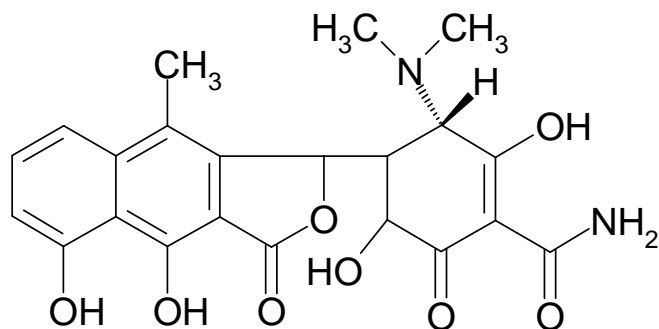


Abbildung 12 - Chemische Struktur von apo-Oxytetracyclin

Komplexbildung

Die Tetracycline zeigen eine ausgeprägte Neigung, mit polyvalenten Kationen Chelat-Komplexverbindungen zu bilden. Besonders die Metallkationen Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Zr^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Be^{2+} sowie die Seltenen Erden werden von Tetracyclinen

komplexiert. Die Tetracycline bilden mit den Metallkationen zunächst 1:1-Komplexe, bei höheren pH-Werten auch 2:1-Komplexe [ALBERT, 1953]. Die Zusammensetzung der gebildeten Komplexe variiert mit dem pH-Wert [BRION et al., 1981]. Das Tetracyclinmolekül hat drei prinzipielle Bindungsstellen für die Komplexbildung mit Metallkationen, das Säureamid-System (siehe Abbildung 6, Bereich I), das Dimethylammonium-Kation (II) und den phenolischen β -Diketonbereich (III). Die erste Dissoziationskonstante für die Metallkationen gehört zum Bereich I, gefolgt von dem β -Diketonbereich (III) und dem Dimethylammonium-Kation (II) [SHARMA und JOSEPH, 1996]. Das Fe^{3+} geht mit Oxy-, Chlor- und Tetracyclin eine festere Komplexbindung ein als Fe^{2+} [ALBERT und REES, 1958]. Ein Nachweis einer Anwendung von Tetracyclinen bei Säugetieren aufgrund der Einlagerung in den Knochen ist noch lange Zeit nach Beendigung der Applikation z.B. durch Fluoreszenzanalyse möglich [MILCH et al., 1957; BUYSKE, et al., 1960]. Ebenso ist ein Nachweis in den Schalen von Eiern behandelten Geflügels möglich [LINDGREN et al., 1970; ZURHELLE, 2000b].

Auch Anionen wie Citrat, Phosphat, Polyphosphat, Salicylat und neutrale Verbindungen wie Harnstoff, Thioharnstoff, Barbituraten und Coffein können Komplexbindungen mit den Tetracyclinen eingehen [NAGGAR, 1974a; NAGGAR 1974b]. Die Fähigkeit der Tetracycline, mit Calciumionen und Barbituraten ternäre Komplexe zu bilden, kann für die Extraktion der Tetracycline genutzt werden [KOHN, 1961a]. Ein zusätzlicher Vorteil bei dieser Art der Extraktion ist die starke Fluoreszenz der ternären Komplexe, die auch analytisch genutzt werden kann [DAY et al., 1978]. Isochlortetracyclin bildet mit Calcium keine Chelate [BUYSKE et al., 1960], wohl aber mit Kupfer, Nickel und Zink [DOLUISIO und MARTIN, 1963].

1.2.2.3 Antibiotische Eigenschaften

Wirkungsmechanismus

Die Aufnahme der Tetracycline durch die Bakterienzelle erfolgt durch passive Überwindung der Zellmembran an bestimmten, kationenselektiven Poren, während die Überwindung der Cytoplasmamembran sowohl passiv (energieunabhängig) als auch energieabhängig erfolgen kann [KROKER 1996]. Die Tetracycline wirken primär durch Hemmung der Proteinbiosynthese als Folge ihrer Bindung an die 30 S-Untereinheit der 70 S-Ribosomen. Auch ihre starke Affinität zu mehrwertigen Kationen wird für ihre

bakteriostatische Wirkung mit verantwortlich gemacht. Die Affinität der Tetracycline zu den 80 S–Ribosomen der Eukaryonten ist dagegen deutlich geringer.

Wirkungsspektrum

Die Tetracycline sind Breitbandantibiotika, die bei geringer Toxizität bakteriostatische Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Rickettsien, Mycoplasmen, Leptospiren, Spirochäten, einige große Viren und Protozoen besitzen.

Pharmakokinetik

Die Tetracycline können oral aufgenommen werden und behalten dabei ihre antibiotischen Eigenschaften, wobei die Bioverfügbarkeit stark vom Füllungsgrad des Magens und der Art der aufgenommenen Nahrung abhängt. Aufgrund der großen Affinität der Tetracycline zu Metallkationen sollten sie nicht mit Milchprodukten oder Eisenpräparaten eingenommen werden, da die gebildeten Chelatkomplexe die Resorption im Magen-Darm-Trakt behindern. Der Gehalt im Serum erreicht bereits 2 bis 4 Stunden nach einer einzelnen Aufnahme seinen Höchststand und nimmt langsam über die nächsten 12 bis 24 Stunden ab [MERCER, 1975].

In Tabelle 4 sind pharmakokinetische Daten der für veterinärmedizinische Anwendung zugelassenen Tetracycline zusammengefasst [KROKER et al., 1996].

Tetracyclin	Enterale Re-	Halbwertszeit	Protein-	Urinaus-
	sorption [%]	[h]	bindung [%]	scheidung [%]
Tetracyclin	bis 50 (Hund)	5 (Hund)	36 (Rind)	56–85 (Hund)
	bis 80 (Mensch)	10 (Kalb)	70–80 (Hund)	40 (Mensch)
		10 (Mensch)	25–55 (Mensch)	
Chlortetracyclin	24 (Hund)	5 (Hund)	38 (Rind)	20 (Mensch)
	47 (Kalb)	9 (Kalb)	61 (Hund)	
	25–30 (Mensch)	5–6 (Mensch)	50 (Mensch)	
Oxytetracyclin	60 (Mensch)	3 (Huhn)	< 30	30 (Mensch)
		11 (Pferd)		
		8–10 (Mensch)		
Doxycyclin	70 (Hund)	10 (Hund)	80–90 (Mensch)	25 (Mensch)
	45 (Katze)	8 (Katze)		
	> 90 (Mensch)	12–18 (Mensch)		

Tabelle 4 - Pharmakinetische Daten von Tetracyclinen [KROKER et al., 1996]

Die Tetracycline werden kaum metabolisiert und die Exkretion erfolgt in aktiver Form durch glomeruläre Filtration oder via Faeces. Signifikante Mengen werden auch über die Galle ausgeschieden und wieder resorbiert [MERCER, 1975]. Chlortetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin werden teilweise zu mikrobiologisch inaktiven Verbindungen metabolisiert [MARZO und DAL BO, 1998].

Die anti-mikrobielle Wirksamkeit der 4-Epimere der Tetracycline ist deutlich geringer als die der Ausgangssubstanzen [MCCORMICK et al., 1957]. Aufgrund der Reversibilität der Epimerisierung (siehe Seite 23) können sich die Epimere wieder zur Muttersubstanz rückbilden und weisen somit eine dem Gleichgewicht entsprechende mikrobiologische Aktivität auf. Die geringere mikrobielle Aktivität ist auch den Epimeren der Isotetracycline und Anhydrotetracycline zu Eigen. Einige biologische Effekte der Tetracycline werden vermutlich durch Komplexbildung mit Makromolekülen über Metallkationen erzeugt [KOHN, 1961b].

1.2.3 Analytik

Für die Analytik von Tetracyclinen existiert bereits eine Vielzahl unterschiedlichster Methoden. Neben den Untersuchungsverfahren zur Analytik pharmazeutischer Formulierungen und der prozessbegleitenden Analytik bei der Herstellung von Tetracyclinen und

daraus hergestellten Präparaten interessiert im Rahmen dieser Arbeit vor allem die Analytik von Tetracyclinrückständen in Lebensmitteln. Bei Lebensmitteln handelt es sich in der Regel um sehr komplex zusammengesetzte Stoffmischungen, in denen die gesuchten Analyten häufig in sehr niedriger Konzentration vorliegen. Zur Analytik von Rückständen pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln sind daher vielfach aufwändige Probenvorbereitungen erforderlich [AERTS et. al., 1995].

Die Wahl des anzuwendenden Verfahrens richtet sich neben der vorliegenden Matrix insbesondere nach der Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens und der erforderlichen Sicherheit der erhaltenen Ergebnisse. Prinzipiell lassen sich die hauptsächlich verwendeten Analyseverfahren in drei große Gruppen einteilen:

- mikrobiologische Verfahren
- Rezeptortests
- physiko-chemische Verfahren

1.2.3.1 Mikrobiologische und immu-chemische Analyseverfahren

Mikrobielle Hemmstofftests

Die mikrobiellen Hemmstofftests basieren auf der von antibiotisch wirksamen Stoffen ausgehenden Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen. Aufgrund ihrer unkomplizierten Durchführung, des geringen labortechnischen Aufwandes und des hohen Probendurchsatzes eignen sich viele Hemmstofftests gut als Screeningmethoden. Eine Hemmung des Wachstums kann auf vorhandene Antibiotika hinweisen, wobei diese nur unspezifisch detektiert werden können. Allerdings kann eine Hemmung des Wachstums auch durch andere Probeninhaltsstoffe oder Kontaminanten, z.B. Desinfektionsmittel, bewirkt werden. So kann es notwendig sein, beispielsweise das im Eiklar enthaltene Lysozym durch Erhitzen der Probe vor der Durchführung des Tests zu inaktivieren. Bei der Untersuchung von Geflügel auf Tetracyclinrückstände hat sich beispielsweise bei den verwendeten Testkeimen die Untersuchung von Nierengewebe infolge unspezifischer Wachstumshemmung als nicht möglich erwiesen [MULDER et al., 1977]. Ebenso ist Rohmilch aufgrund des großen Anteils an organischen und anorganischen Bestandteilen sowie somatischen Zellen und Bakterien ein schwierig zu analysierendes Untersuchungsmaterial, da diese Bestandteile geeignet sind, die mikrobiologische Untersuchung zu stören [KURITTU et al., 2000].

Angehts der Tatsache, dass mit diesen Tests nur mikrobiologisch aktive Substanzen erfasst werden können, ist ein Nachweis beispielsweise der Epi-Tetracycline (0, Seite 23) nicht möglich, da diese keine mikrobiologische Aktivität besitzen. Da die Epimere bei der Prüfung auf Unterschreitung des MRL mit einbezogen werden, besteht hier die Gefahr, dass Proben mit hohem Anteil an Abbau- oder Umwandlungsprodukten nicht mit erfasst werden. Auch die Empfindlichkeit des Testkeims gegen die verschiedenen Hemmstoffe und die Testbedingungen sind bedeutende Einflussgrößen eines Hemmstofftests. So können die aus Oxytetracyclin in bereits nach fünf bis neun Wochen entstandenen Metaboliten nicht mehr nachgewiesen werden [DINKOV, 2005].

Agardiffusionstests

Bei dem Agardiffusionstest wird auf einen mit dem Testkeim beimpften Testagar die zu untersuchende Probe aufgebracht und der Agar bebrütet. Bildet sich um die aufgebrachte Probe ein nicht bewachsener Bereich, so kann davon ausgegangen werden, dass diese Probe einen das Bakterienwachstum hemmenden Stoff enthält. Dabei kann die Größe des so genannten Hemmhofes einen Hinweis auf die Konzentration des Hemmstoffes in der Probe geben. Gleichzeitig stellt die semiquantitative Auswertung eines Agardiffusionstests große Anforderung an die Herstellung der Medien. Die Größe der Hemmhöfe variiert mit den Schichtdicken und der Qualität des Agars, der Gleichmäßigkeit der Verteilung der Sporen und den Temperaturschwankungen während der Inkubierzeit. Eine Verbesserung der Probenvorbereitung durch Optimierung auf die verschiedenen zu untersuchenden Proben kann die Nachweisempfindlichkeit der mikrobiologischen Methoden noch erhöhen [KATZ und FASSBENDER, 1972]. Mit einer Probenaufarbeitung mittels Ionenaustauscher kann auch für Agardiffusionstests eine Nachweisgrenze von unter 10 mg/kg erreicht werden [FRIESER et al., 1986].

In der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung nach dem Fleischhygienegesetz und Geflügelfleischhygienegesetz ist der Dreiplattentest vorgeschrieben, bei dem mit *Bacillus subtilis* BGA beimpfte und auf die jeweiligen pH-Werte 6, 7,2 und 8 eingestellte Agarplatten zum Test verwendet werden. Die Nachweisgrenzen des Dreiplattentests betragen je 100 µg/kg für Oxytetracyclin und Tetracyclin und 30 µg/kg für Chlortetracyclin [LIPPOLD, 2001]. Als Weiterentwicklung des Dreiplattentests ist der EG-Vierplattentest anzusehen. Der EG-Vierplattentest hat eine zusätzliche vierte Platte mit dem pH-Wert 8 und dem Testbakterium *Micrococcus luteus*, der jedoch kein Sporenbildner ist und somit aufwändig gezüchtet werden muss. Durch Ver-

wendung von 18 verschiedenen Platten mit 8 unterschiedlichen Testkeimen bei sechs pH-Werten und mit diversen Zusätzen kann eine Unterscheidung von Antibiotikaklassen gelingen [MYLLYNIEMI et al., 1999]. Weiterhin kann durch eine Vergrößerung der Vertiefungen in den Agarplatten auf den doppelten Durchmesser eine deutliche Erhöhung der Empfindlichkeit bei der Untersuchung von Tetracyclinen in Honig erreicht werden [KHISMATOULLIN et al., 2003].

Brillantschwarzreduktionstest

Das Testmedium enthält Sporen von *Bacillus stearothermophilus* und das als Redoxindikator eingesetzte Brillantschwarz. Nach der Aufgabe der Probe wird die Kultur bei 65 °C inkubiert. Wenn Hemmstoffe in der Probe vorhanden sind, verhindern diese das Wachstum der Keime und der Redoxindikator behält seine schwarze Farbe. Bei negativen Proben, d.h. wenn keine Hemmstoffe enthalten sind, färbt sich der Indikator durch die von den wachsenden Keimen abgegebenen Stoffwechselprodukte gelb. Die Nachweisgrenze für den Brillantschwarzreduktionstest (BRT) liegt im Bereich von 400 bis 500 µg/L [HEESCHEN und SUHREN, 1986].

Immunchemische Tests (Rezeptortests)

Bei den Rezeptortests handelt es sich im Gegensatz zu den mikrobiellen Hemmstofftests nicht um Screening-Tests zur Entdeckung eines allgemeinen antimikrobiellen Rückstands. Den Immunoassays liegt als grundsätzliches Prinzip die Bindung eines Antigens an einen Antikörper zugrunde. Dabei ist die hohe Spezifität der Antigen-Antikörper-Erkennung der große Vorteil der immunchemischen Nachweisverfahren gegenüber den mikrobiellen Hemmstofftests. Prinzipiell kann man die Erkennung der Antikörper durch die Antigene als Schlüssel-Schloss-Prinzip erklären, wobei das Schloss so gestaltet ist, dass nur der gesuchte Schlüssel passt. Dadurch wird eine hohe Spezifität erreicht, die aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten mitunter auch für eine gesamte Substanzklasse vergleichbar ist, allerdings werden die einzelnen, strukturell ähnlichen Stoffe häufig mit unterschiedlicher Empfindlichkeit bestimmt, was ein Nachteil dieser Messmethodik sein kann.

Dabei kann der gesuchte Analyt je nach Testgestaltung das Antigen oder der Antikörper sein. Diese Tests werden häufig sequentiell oder kompetitiv durchgeführt. Während bei der sequentiellen Abfolge der Tests die Bindung der Antikörper an die Antigene aus der Probe vollständig erfolgt, konkurrieren die Antikörper aus der Probe beim kompetitiven Test mit

zur Detektion genutzten Antikörpern um die Bindungsstellen. Prinzipiell unterscheiden sich die Immunoassays durch die Detektionsart. Die beiden wichtigsten Detektionsarten sind durch nachgeschaltete Reaktionen mittels Enzymen beispielsweise beim ELISA (siehe 2.3, Seite 79), und durch Messung radioaktiv markierter Antigene oder Antikörper beispielsweise beim CHARM-Test (siehe Seite 71). Beim kompetitiven Charm[®] II-Test wird der Probe zusätzlich radioaktiv markierter Wirkstoff (¹⁴C oder ³H) zugesetzt, der dann mit einem möglicherweise in der Probe enthaltenen Rückstand um die Bindungsstellen konkurriert. Der Anteil der markierten Analyten gibt dann das Maß der enthaltenen Rückstände an; als Nachweisgrenze wird für die Tetracycline 10 µg/L angegeben [CHARM und CHI, 1988].

1.2.3.2 Physikalisch-chemische Verfahren

Chromatographische Verfahren

Gaschromatographie

Obwohl die Gaschromatographie als analytisches Verfahren zur Untersuchung der Tetracycline aufgrund der geringen Flüchtigkeit der Tetracycline denkbar ungeeignet ist, wurde 1973 eine Methodik beschrieben, die eine gaschromatographische Analytik nach Derivatisierung zu den Trimethylsilylderivaten erlaubt [TSUJI und ROBERTSON, 1973]. Diese Methodik wurde von anderen Autoren experimentell nicht bestätigt.

Dünnschichtchromatographie

Die ersten flüssigchromatographischen Methoden zur Analytik von Tetracyclinen waren papier- und dünnschichtchromatographische Verfahren.

Bei den dünnschichtchromatographischen Analysen von Tetracyclinen ist die genaue Zusammensetzung der stationären Phase ein entscheidender Faktor. So waren DC-Platten, deren Phase mit Gips auf der Platte aufgebracht wurden, aufgrund des hohen Anteils Ca²⁺ untauglich, während Platten mit anderen Bindern nach Vorbehandlung mit Citronensäure und EDTA verwendet werden konnten [ASHWORTH, 1985]. Durch die Vorbehandlung von Kieselgel HPTLC-Phasen mit gesättigter Na₂EDTA-Lösung ließ sich die Trennung der Tetracycline verbessern [IKAI et al., 1987]. Es existieren derzeit eine Menge dünnschichtchromatographischer Verfahren zur Analytik von Tetracyclinen. Durch die Verwendung von Densitometern auf CCD-Basis können dünnschichtchromatographische

Platten nahezu quantitativ ausgewertet werden [LIANG et al., 1999]. Allerdings hat ihre Verwendung durch die zunehmende Verbreitung der flüssigchromatographischen Verfahren, die neben dem qualitativen Ergebnis auch eine präzisere quantitative Aussage ermöglichen, stark nachgelassen.

Flüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist mittlerweile die am weitesten verbreitete Trennmethode zur Analytik von Tetracyclinen. Dabei sind bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Trennsäulen verwendet worden [ASHWORTH, 1985]. Neben den deutlich dominierenden Umkehrphasen sind auch Aminophasen unter Verwendung eines Ionenpaarreagenzes verwendet worden [EKSBERG, 1981]. Auch PGC-Säulen (porous graphitic carbon) finden Verwendung, bringen jedoch gegenüber klassischen Umkehrphasen außer einer veränderten Elutionsreihenfolge keine Vorteile [MONSER und DARGHOUTH, 2000].

Der Einsatz von Ionenpaarreagenzien kann zu einer besseren Trennung von durch Matrixbestandteile ausgehenden Interferenzen bei der analytischen Trennung auch an Umkehrphasen genutzt werden [HERMANSSON und ANDERSSON, 1982; MOATS, 2000; ARANDA, 2006]. Auch die Trennung des Oxytetracyclins von seinen Umwandlungsprodukten ist durch einen Zusatz von Ionenpaarreagenzien möglich [MOURROT et al., 1980]. Als Trennmaterial für die Chromatographie von Tetracyclinen können auch Ionenaustauscher eingesetzt werden [REEUWIJK und TJADEN, 1986]. Teilweise werden diese Methoden auch als Hochleistungsflüssigionenchromatographie (HPIC) bezeichnet [DING und MOU, 2000]. Es wurden sowohl Anionenaustauscher- wie auch Kationenaustauschermaterialien als Trennphase für die HPLC der Tetracycline eingesetzt [BUTTERFIELD et al., 1973; SHARMA et al., 1977].

Bei der flüssigchromatographischen Untersuchung der Tetracycline werden, um andere sterische Veränderungen als die Epimerisierung im Tetracyclinmolekül zu unterdrücken, überwiegend Eluenten mit saurem pH-Wert eingesetzt [ASZALOS, 1985]. Dabei gelangen unter anderem Phosphorsäure [BOATTO et al., 1999], Essigsäure, Perchlorsäure und Oxalsäure zur Anwendung. Es existieren aber auch Methoden, die zur Trennung der Tetracycline basische Eluenten verwenden [CHAPPELL et al., 1986; HORII, 1994]. Häufig handelt es sich bei den Methoden, die einen basischen Eluenten verwenden, um chromatographische Methoden, die zur Detektion die Fluoreszenz der Tetracycline im Basischen ausnutzen.

Bei Umkehrphasen hat sich die erstmalige Konditionierung der Säule durch mehrstündiges Durchpumpen einer EDTA-Lösung zur Minimierung des Peaktailings als zweckmäßig erwiesen [TSUJI und MOROZOWICH, 1978]. Bei einigen Verfahren wird zur Erzielung einer besseren Peakform durch den Zusatz von EDTA zum Eluenten die Komplexbildung der Tetracycline mit Metallkationen unterdrückt [KNOX und JURAND, 1979; ASZALOS et al., 1982; KHAN et al., 1987; CARSON et al., 1992; HORII, 1994; KAWATA et al., 1996; STUBBINGS et al., 1996]. Dieser positive Einfluss des EDTA ist nicht auf die Phasen auf Kieselgelbasis beschränkt, er lässt sich auch bei anderen Phasen beobachten und ist vermutlich bei allen Säulen mit Edelstahlummantelung vorhanden [REEUWIJK und TJADEN, 1986].

Die Einführung von Säulenfüllungen auf Polymerbasis zur Tetracyclinanalytik brachte durch die Abwesenheit von Silanolgruppen und daran unspezifisch gebundenen Metallkationen einige Vorteile gegenüber der Analytik mit silika-basierten Trennsäulen [HOOGMARTENS et al., 1989 und 1990; BRYAN et al., 1992; NAIDONG et al., 1992 BRYAN und STEWART, 1994a; DE RUYCK et al., 1999]. Am weitesten verbreitet sind Polymersäulen auf Basis eines Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymers (PS-DVB), aber auch Polymethacrylat wurde verwendet [BRYAN und STEWART, 1994b].

Auch wenn bei den Polymerphasen eine Beeinflussung der Trennung durch unspezifisch gebundene Metallkationen nicht möglich ist, hat sich gezeigt, dass durch die Edelstahlummantelung des Trennmaterials eine Störung der Trennung möglich ist und dass eine Verringerung dieses Einflusses durch Zugabe von EDTA auch bei Verwendung einer Polymerphase (PRP-1) erreicht werden kann [REEUWIJK und TJADEN, 1986].

Der Tendenz der Tetracycline, irreversibel an freien Silanolgruppen der stationären Phase zu binden, und damit ein deutliches Tailing der Peaks zu verursachen, kann durch die Zugabe von Oxalsäure zum Eluenten begegnet werden [Long et al., 1990]. Durch den Einsatz von Oxalsäure im Eluenten kann aufgrund der komplexierenden Eigenschaft der Oxalsäure gegenüber Metallkationen eine weitere Verbesserung der Trennleistung von Trennsäulen mit Silikagel als Trägermaterial erreicht werden. Dadurch ist ein Verzicht auf den Einsatz von EDTA bei der analytischen Trennung möglich. Wie sehr sich die Verwendung von Oxalsäure im Eluenten bereits durchgesetzt hat, zeigt eine Untersuchung von Referenzmaterial auf den Chlortetracyclinegehalt [JUHEL-GAUGAIN et al., 2000]. Bei den verwendeten 13 Methoden nutzen 12 Verfahren einen oxalsäurehaltigen Eluenten.

Die oxalsäurehaltigen Eluenten sind auch in Kombination mit Ionenpaarreagenzien an Polymer-Phasen einsetzbar [WHITE et al., 1993]. Aufgrund der besseren Stabilität der

Polymer-Säulen gegenüber den Silikagel-Säulen im höheren pH-Bereich, ist es möglich, die Tetracycline auch im pH-Bereich oberhalb 7 zu messen. Allerdings ist auch die einer Isomerisierung bei höheren pH-Werten gegeben und diese Möglichkeit hat daher bisher noch keinen weiten Eingang in die Analytik gefunden.

Die Trennung der einzelnen Epimere von den Muttersubstanzen gelang unter Verwendung einer einen Meter langen Trennsäule [TSUJI et al., 1974]. Allerdings bieten die erprobten Chromatographiebedingungen mit den heutzutage erhältlichen Trennsäulen hoher Trennleistung die Möglichkeiten der Epimerentrennung auf kurzen Säulen.

Probenaufarbeitung für die HPLC

Die Probenaufarbeitung hat für die Analyse der Rückstände eine sehr große Bedeutung. Unterschiedliche Aufarbeitungstechniken können bei dotierten rückstandsfreien Proben ein einheitliches Ergebnis aufweisen, bei Proben mit gewachsenen Rückständen, die aus einer Medikation stammen, können die ermittelten Gehalte aber dennoch zu unterschiedlichen Resultaten führen [MCCRACKEN et al., 2000]. Für die Probenaufarbeitung sind eine Vielzahl von unterschiedlichsten Verfahren publiziert worden. Die für Honige denkbar einfache Aufarbeitung durch Lösung bzw. Verdünnung des Honigs und anschließende chromatographische Bestimmung mittels UV-Detektion ist aufgrund der in der Regel nicht ausreichenden Nachweisgrenze und die auftretenden Störungen aus der Matrix häufig nicht für die Überprüfung einer nicht erlaubten Anwendung anwendbar. So ist das Verfahren von Jürgens für eine sichere quantitative Aussage im Bereich von 0,01 mg/kg nicht empfindlich genug [JÜRGENS, 1981].

Die Möglichkeit, die Tetracycline durch Ausschütteln mit einer organischen Phase aus Dichlormethan zu extrahieren, wurde bei der Analytik von Eiern praktiziert [BOTSOGLOU et al., 1984].

Eine häufig zu findende Methodik basiert auf der Anreicherung und der Aufreinigung der Tetracycline mittels Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE). Dabei finden unterschiedlichste Materialien Anwendung. Häufig zu finden sind Umkehrphasen (C_8 , C_{18}) [IKAI et al., 1987; OKA et al., 1987a, 1987b; ROGSTAD et al., 1988; TOURAKI et al. 1995], polymere Materialien wie z.B. XAD-2, ein Polystyroldivinylbenzol [ONJI et al., 1984] oder Mischphasen wie z.B. OASIS[®] HLB [CARSON et al., 2002]. Mit der Silylierung der C_{18} -Festphasen konnte die Wiederfindung deutlich gesteigert werden [MULDERS und VAN DE LAGEMAAT, 1989].

Auch eine Kombination einer Festphasenextraktionen an einer Umkehrphase gefolgt von einer Festphasenextraktion mit einem Kationenaustauscher ist beschrieben [HORII, 1994]. Bei der Verwendung von Umkehrphasenmaterial auf Silikabasis können Minderbefunde aufgrund der Fähigkeit der Tetracycline, an den freien Silanolgruppen des Trägermaterials irreversibel zu binden, auftreten. Durch die Vorbehandlung der Anreicherungsäulen mit EDTA kann diesen Problems begegnet werden [OKA et al., 1994].

Durch geschickte Wahl eines Eluentengradienten besteht die Möglichkeit, die Tetracycline auf der Säule anzureichern und diese anschließend durch einen ansteigenden Lösungsmittelanteil im Eluenten chromatographisch zu trennen [WHITE et al., 1993; MOATS und HARIK-KHAN, 1995].

Die Fähigkeit der Tetracycline, mit Metallkationen Chelatkomplexe zu bilden, eröffnete die Möglichkeit, die Tetracycline spezifisch an immobilisierten Metallkationen zu binden und somit aus der Probematrix zu extrahieren [FARRINGTON et al., 1991; CARSON 1993; DEGROODT et al., 1993; STUBBINGS et al., 1996; CROUBELS et al., 1997]. Andererseits ist es genau diese Eigenschaft der Tetracycline, die eine Extraktion aus calciumreichen Matrices, zum Beispiel Knochen, erschwert. Durch eine wiederholte Extraktion kann der Anteil des analytisch verfügbaren Tetracyclins erhöht werden [POMP und BÜNING-PFAUE, 1996]. Die Tetracycline können auch unter Verzicht auf eine manuelle Festphasenextraktion direkt auf der Trennsäule angereichert werden [MOATS, 1986]. Bei dieser on-column–Aufreinigung wird ein wässriger Probenextrakt direkt auf die Trennsäule gegeben und einige Zeit mit einem überwiegend wässrigen Eluenten von den Begleitstoffen gereinigt. Nachdem die Matrixbestandteile von der Säule gespült sind, wird mittels Gradientenelution der Anteil an organischem Lösungsmittel im Eluenten erhöht und somit die eigentliche Trennung der Analyten durchgeführt. Nachteilig ist bei dieser Vorgehensweise die Tatsache, dass die Begleitstoffe die gesamte Säule passieren müssen, was im Gegensatz zur off-column–Aufreinigung die Trennsäule stärker belastet.

Eine Anwendung einer Proteinfällung mittels Carrez-Klärung gefolgt von einer Entfettung mittels Diethylether wurde ebenfalls beschrieben [SOKOLOVA und CHERNAEV, 2001].

Die MSPD-Technik (matrix solid phase dispersion) findet als Probenvorbereitungstechnik für die Untersuchung von Milch [LONG et al., 1990a] und Katzenwels [LONG et al., 1990b] Anwendung. Bei dieser Technik wird eine kleine Menge der zu untersuchenden Probe mit dem festen, trockenen Festphasenextraktionsmaterial sehr fein zerrieben, bis eine homogene, rieselfähige Mischung entstanden ist. Diese wird in eine Extraktionssäule

gegeben und die Analyten mit einem geeigneten Elutionsmittel eluiert. Häufig gelangt auch hier Umkehrphasenmaterial (C_{18}) zur Anwendung.

Die Extraktion der Tetracycline aus Milch mittels Ultrafiltration erfordert den Einsatz von EDTA bei der Probenvorbereitung, gefolgt von einer mit einer Ultrafiltration mit einem cut-off von 25.000 Da [THOMAS, 1989]. Eine relativ einfache Aufarbeitung ist die Extraktion der Tetracycline aus Milch mittels Acetonitril [White et al., 1993]. Dabei zeigte sich, dass der Zusatz von Ionenpaarreagenzien bei der Analyse auf einer Polymersäule ausreichte, um eine deutliche Verbesserung der Chromatographie durch Erhöhung der Retentionszeiten und somit eine Trennung von den Matrixinterferenzen zu erreichen. Dadurch konnte auf eine aufwändige Probenaufarbeitung verzichtet werden. Während die Wahl des Puffers eine weniger große Rolle spielte, ist die Konzentration der verwendeten Oxalsäure im Eluenten, und damit der pH-Wert des Eluenten sehr entscheidend. Eine Probenaufarbeitung mittels online-Dialyse wurde für die Analyse von Tetracyclinen in Blut und Plasma entwickelt [AGASØSTER und RASMUSSEN, 1991] und später für die Analytik von Fisch [AGASØSTER und RASMUSSEN, 1992] sowie Muskelfleisch, Leber, Milch und Eiern angepasst [AGASØSTER, 1992]. Später wurde diese Technik speziell für die Analytik von Eiern optimiert [ZURHELLE, 2000; ZURHELLE et al., 2000a; ZURHELLE et al., 2000b].

Detektion

Bei der größten Zahl der veröffentlichten Arbeiten zur Analytik von Tetracyclinen mittels HPLC kommt die UV-Detektion zur Anwendung. Auch sind einige Verfahren unter Ausnutzung der Fluoreszenz der Tetracycline in Einsatz. Da die natürliche Fluoreszenz der Tetracycline für eine empfindliche Detektion in der Regel nicht ausreichend ist, werden Metallkationen zugesetzt, die die Fluoreszenzverstärkung bewirken. Dabei werden neben Calcium- [IWAKI et al., 1992], Aluminium- [MCCRACKEN et al., 1995] und Magnesiumionen [KAWATA et al., 1996; PENA et al., 1999] auch Zirkonyl- [CROUBELS et al., 1994, 1995 und 1997] und Europiumsalze [WENZEL et al., 1988; ARNAUD und GEORGES, 2001] eingesetzt. Durch einen im alkalischen Medium einsetzenden Abbau kann die natürliche Fluoreszenz der Tetracycline in Verbindung mit Erdalkali-Ionen um ein Vielfaches gesteigert werden und steht somit als empfindliches Detektionsverfahren zur Verfügung [ZHAO et al., 1997]. Die Fluoreszenz der Calciumkomplexe kann auch zur Detektion der Abbauprodukte wie Epi-Tetracyclin und Anhydrotetracyclin eingesetzt werden [PENA, 1998]. Auch die Nachsäulenderivatisierung durch Zupumpen von Natronlauge und

anschließender Bestrahlung mit UV-Licht zur Intensivierung der Fluoreszenz wurde beschrieben [AGASØSTER und RASMUSSEN, 1992]. Vermehrt hat besonders die massenspektrometrische Detektion Eingang in die Rückstandsanalytik von Tetracycline Einzug gehalten. Eine Methode zur Bestimmung von Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin in Milch mittels LC-MS wurde bereits 1991 veröffentlicht [KIJAK et al., 1991]. Mittlerweile ist eine Fülle an Methoden für die Analytik von Tetracyclinen in verschiedenen Matrices per LC-MS oder LC-MS/MS veröffentlicht worden [CARRASCO-PANCORBO et al., 2008; DEBAYLE et al., 2008; LOPEZ et al., 2008].

1.3 Bienenkrankheiten

Die Honigbiene (*Apis*) ist in erster Linie als Honigproduzent bekannt. Aber die Honigbiene hat neben der Produktion von Honig, Pollen, Wachs, Propolis und Gelée Royale auch die bedeutende Funktion als Bestäuber von Wild- und Kulturpflanzen. Bereits Albert Einstein sah in einem Satz, den er einmal gesagt haben soll, diese Funktion der Bienen als Garant für das Gleichgewicht der Natur:

„Wenn die Biene von der Erde verschwindet, dann hat der Mensch nur noch vier Jahre zu leben. Keine Bienen mehr, keine Bestäubung mehr, keine Pflanzen mehr, keine Tiere mehr, keine Menschen mehr.“

Wie alle Lebewesen, kann auch die Honigbiene krank werden und nur gesunde Bienen können ihre Aufgaben ausreichend erfüllen. Krank bedeutet bei Bienen, dass sie entweder an einer Infektion durch Mikroorganismen oder unter Parasiten leiden. Während die häufigste Erkrankung der Honigbienen, die Varroose (zuvor: Varroatose), durch eine Milbe (*Varroa destructor*), verursacht wird, werden andere häufig vorkommende Erkrankungen von Mikroorganismen bewirkt. Während die Kalkbrut eine Erkrankung durch einen Pilz (*Ascosphaera apis*) und die Sackbrut, gelegentlich auch Schiffchenbrut genannt, durch ein Virus (Sackbrut-Virus) ausgelöst wird, können die bakteriellen Erreger der Faulbrut durch Antibiotika bekämpft werden.

1.3.1 Faulbrut

Bei der Faulbrut handelt es sich um eine bakterielle Infektion der Bienenbrut. Man unterscheidet dabei zwischen der bösartigen Faulbrut und der Sauerbrut. Während die Sauerbrut auch als „europäische Faulbrut“ oder ungerechtfertigter Weise als „gutartige Faulbrut“ bezeichnet wird, ist die bösartige Faulbrut in englisch und französisch sprechenden Ländern überwiegend als „amerikanische Faulbrut“ bekannt. Der Namen der Erkrankung begründet sich darauf, dass die Bakterien die Brut innerhalb kurzer Zeit in eine faulige Masse zersetzen. Diese Krankheiten, insbesondere die bösartige Faulbrut, kommen überall wo Bienenzucht betrieben wird vor [Zander und Böttcher, 1984 S. 40]. Der Erreger der europäischen Faulbrut (*Melissococcus pluton*) kann ebenso wie der Erreger der amerikanischen Faulbrut mit antibiotisch wirksamen Stoffen bekämpft werden. Im

Folgendes ist aber, wenn von Faulbrut gesprochen wird, immer die amerikanische Faulbrut gemeint.

1.3.2 Erreger

Der Erreger der amerikanischen Faulbrut ist der *Paenibacillus larvae larvae*. Er ist ein grampositiver Sporenbildner und liegt entweder in Form von vegetativen Stäbchen oder von Sporen vor [Zander und Böttcher, 1984 S. 43]. Die Stäbchen haben eine Größe von 2,5 bis 5,0 μm und sind peritrich begeißelt. Die Sporen sind außerordentlich widerstandsfähig. Sie können über 60 Jahre infektiös bleiben, überstehen trockene Hitze von 100 °C stundenlang, im Wasser erfolgt die Abtötung bei 90 °C erst nach 120 Minuten.

1.3.3 Verbreitung

Zur Verbreitung der Faulbrut tragen folgenden Faktoren bei: Verflug, Räuberei und Wabentausch. Der Verflug ist eine normale Erscheinung in der Imkerei. Insbesondere bei dicht stehenden Völkern kehrt ein kleiner Teil der ausgeflogenen Sammelbienen nicht zu „ihrem“ Bienenstock, sondern zu einem anderen zurück. Hat diese Biene Kontakt mit infiziertem Material gehabt, kann sie Sporen in das andere Volk übertragen. Nach gleichem Prinzip kann eine Infektion eines anderen Volkes geschehen, wenn ein Volk bei einem anderen Volk Honig raubt. Die größte Infektionsgefahr geht allerdings vom Menschen aus. Durch Austausch von Waben von einem Volke zum nächsten ist das Risiko einer Infektion insbesondere bei einer nicht erkannten Faulbrutinfektion relativ groß. Andererseits entspricht es der üblichen imkerlichen Praxis, ein schwaches Volk mit Brutwaben aus einem starken Volk zu verstärken. Bei der Faulbrut handelt es sich um eine meldepflichtige Tierseuche. Um den befallenen Bienenstand wird eine Sperrzone von einem Kilometer Umkreis gezogen, in den keine Bienvölker verbracht werden dürfen. Eine auf dem amtlichen Tierseuchenbericht erstellte aktuelle Karte aller Sperrbezirke zur Faulbrut bei Honigbienen kann im Internet eingesehen werden [<http://www.imkerbund.org/sperrbezirke/karte.php>].

1.3.4 Bekämpfung

In vielen Teilen der Welt werden Tetracycline zur Bekämpfung der Faulbrut eingesetzt [JÜRGENS, 1981; KOCHANSKY, 2000]. Gemäß § 9 Absatz 1 Bienenseuchen-Verordnung

ordnet in Deutschland die zuständige Behörde die Tötung der seuchenkranken Bienenvölker an. Die Behörde kann hiervon absehen und die Behandlung durch ein Kunstschwarmverfahren zulassen, wenn nach dem Gutachten des beamteten Tierarztes dadurch die Tilgung der Seuche zu erwarten ist. Da eine Infektion anderer, benachbarter Völker wahrscheinlich ist, ist eine genaueste Beschau und Diagnose unerlässlich. Eine Behandlung der erkrankten Bienenvölker mit Heilmitteln ist in Deutschland nicht erlaubt. Allerdings kann der Amtstierarzt unter bestimmten Bedingungen Tierarzneimittel einsetzen. Da kein antibiotisch wirksames Arzneimittel eine Zulassung für die Behandlung von Honigbienen hat, entsteht ein so genannter Therapienotstand. Dieser ermöglicht die Umwidmung eines Arzneimittels, welches aber für andere zur Lebensmittelgewinnung genutzte Tierarten oder für eine andere Indikation zugelassen sein muss, gemäß § 56a Abs. 1 Arzneimittelgesetz [Arzneimittelgesetz, 2005]. Der Tierarzt trägt dann die Verantwortung für alle Folgen, die aus der Umwidmung resultieren, auch für mögliche Schäden von Verbrauchern, die den gewonnenen Honig als Lebensmittel konsumiert haben. Die Produkthaftung des Herstellers des Arzneimittels entfällt. Generell dürfen aber nur die Arzneimittel umgewidmet werden, die für den Einsatz an lebensmittelliefernden Tieren zugelassen sind. Da für eine Arzneimittelanwendung an dieser Tierart keine Wartezeit festgelegt ist, muss der verantwortliche Tierarzt selbst eine angemessene Wartezeit bestimmen, um sicherzustellen, dass die für die zugelassene Zieltierart festgelegten Rückstandshöchstmengen nicht überschritten werden. Dies ist jedoch die Ausnahme, in der Regel werden befallene Völker hierzulande vernichtet. Nur in Ausnahmefällen darf der Amtstierarzt von der Tötung des befallenen Volkes absehen und eine Behandlung durch das Kunstschwarmverfahren zulassen, wenn nach seinem Gutachten die Tilgung der Seuche zu erwarten ist [Bienenseuchen-Verordnung, §9].

Der wirtschaftliche Schaden für den Imker ist dabei enorm, da alle Teile und Werkzeuge, die nicht desinfiziert werden können, ebenfalls vernichtet werden müssen. Auch wenn Honig aus Faulbrutvölkern für den Menschen vollkommen ungefährlich ist, gebietet die hohe Infektionsgefahr für die Bienenvölker eine Vernichtung auch des Honigs aus befallenen Völkern.

1.4 Honig

1.4.1 Definition

Gemäß der Definition des § 1 in Verbindung mit Anlage 1, Abschnitt I der Honigverordnung [Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (BGBl. I S. 92)] 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 befindliche Exkrete von Pflanzen saugenden Insekten aufnehmen, durch Kombination mit eigenen spezifischen Stoffen umwandeln, einlagern, dehydratisieren und in den Waben des Bienenstockes speichern und reifen lassen.“ Die Honigverordnung entspricht der Umsetzung der Richtlinie 2001/110/EG des Rates vom 20. Dezember 2001 über Honig (ABl. EG 2002 Nr. L 10 S. 47) in nationales Recht.

Aufgrund dieser Definition für Honig kann es nur zwei mögliche Quellen für den Honigrohstoff geben. Sammeln die Bienen die süßen, an lebenden Pflanzenteilen befindlichen Säfte, die floral oder extrafloral von den Pflanzen abgesondert werden und im allgemeinen als Nektar bezeichnet werden, entsteht daraus der so genannte Blütenhonig oder Nektarhonig. Werden von den Bienen die sich an Nadel- oder Laubbäumen befindlichen süßen Säfte gesammelt, die sich als Ausscheidungen von kleinen an Pflanzen saugenden Insekten ansammeln, so spricht man von Honigtau Honig.

Die Definition der Honigverordnung lässt keine andere Quelle für Honig zu. Somit kann beispielsweise durch eine Zufütterung von Zuckerlösungen kein Honig im Sinne der Honigverordnung entstehen, selbst wenn dieser Zucker in der Regel aus Pflanzen hergestellt worden ist.

1.4.2 Honigarten

1.4.2.1 Blütenhonig

Die Honigbienen sammeln den von lebenden Pflanzenteilen abgesonderten Nektar. Damit ist in der Regel der von den Blüten, seltener auch außerhalb der Blütenstände, dargebotene Zuckersaft gemeint. Dieser enthält verschiedene Zucker, welche sich von Pflanzenart zu Pflanzenart aber auch innerhalb einer Pflanzenart aufgrund ihrer Lebensbedingungen unterscheiden. Häufig ist Saccharose der Hauptzucker, aber auch Fructose, Glucose,

Galactose oder Mannose kommen im Pflanzennektar vor [DUISBERG, 1967]. Da Honigbienen eine Trachtstetigkeit zeigen, d.h. nur eine Blütenart anfliegen bis der Nektarvorrat erschöpft ist, besteht die Möglichkeit, relativ sortenreine Honige, so genannte Trachthonige, zu erhalten. Diese Honige dürfen dann auch gemäß § 3 Honigverordnung mit der Herkunft der Honige bezeichnet werden, wenn der Honig vollständig oder überwiegend den genannten Blüten oder Pflanzen entstammt und die entsprechenden organoleptischen, physikalisch-chemischen und mikroskopischen Merkmale aufweist [Honigverordnung, 2004].

1.4.2.2 Honigtauhonig

Als Honigtau bezeichnet man die zuckerhaltigen Ausscheidungen verschiedener pflanzen-saugender Insekten (Blatt- und Rindenläuse). Die Läuse (z.B. Lachniden) saugen den Siebröhrensaft der Blätter und Nadeln der Bäume, der neben Zuckern auch Proteine, stickstoffhaltige Verbindungen und Mineralien enthält. Die stickstoffhaltigen Verbindungen werden von den Lachniden herausgefiltert, der nicht benötigte überschüssige Zucker wird ausgeschieden und überzieht die Blätter bzw. Nadeln mit einem klebrigen Film, von wo ihn die Bienen aufnehmen. Daher wird für Honigtauhonig auch manchmal die Bezeichnung „Blatthonig“ verwendet.

1.4.3 Zusammensetzung

Laut Abschnitt I der Anlage 1 der Honigverordnung besteht Honig im Wesentlichen aus verschiedenen Zuckerarten, insbesondere aus Fructose und Glucose, sowie aus organischen Säuren, Enzymen und beim Nektarsammeln aufgenommenen festen Partikeln.

Bereits während des Nektar- oder Honigtausammelns der Honigbienen werden den in der Honigblase gesammelten Pflanzensäften bieneneigene Kopfdrüsensekrete zugegeben. Diese Sekrete enthalten Enzyme wie beispielsweise α -Glucosidasen (Invertase, Saccharase), α - und β -Amylase und Katalase [BELITZ und GROSCH, 1992, S. 800]. Die im Honig vorhandene Saccharase stammt ausschließlich aus den Bienensekreten [EDELHÄUSER und BERGNER, 1989]. Bereits in der Honigblase der Sammelbiene beginnt der Entzug des Wassers durch die Biene. Nach der Rückkehr der Sammelbienen in den Stock wird der Honigblaseninhalte an andere Stockbienen mittleren Alters abgegeben. Dieser als Trophallaxis bekannte Vorgang führt neben einer weiteren Eindickung des Honigs auch

zur weiteren Erhöhung des Bienensekretanteils. Der Honigblaseninhalt wird von den Stockbienen rhythmisch ausgestoßen und wieder eingesaugt. Zudem wird der Honigblaseninhalt an der inneren Wandung der Honigzellen abgelagert und verliert durch Verdunstung weiter Wasser. Die Stockbienen tragen diesen Honig mehrfach in andere Zellen um. Dieser Vorgang kann mehrere Stunden oder Tage dauern. Zusammen mit der im Bienenstock herrschenden Temperatur von ca. 33 °C, dem durch Flügelschlag der Bienen erzeugten Luftstrom im Bienenstock und der Wirkung der Enzyme wird der Honig relativ schnell eingedickt. Dabei ist als bedeutendste Umwandlung neben dem Wasserentzug die als Inversion bezeichnete Spaltung der Saccharose zu Fructose und Glucose zu nennen. Wenn der Wassergehalt unter ca. 19% liegt, wird der Honig endgültig in die Honigwaben eingetragen und die Wabe anschließend mit Wachs verdeckelt. Dadurch ist der Honig allseitig von Wachs umschlossen und kann kein Wasser aufnehmen oder abgeben. Insbesondere der hohe Zuckergehalt ist für die Konservierung des Honigs verantwortlich, während der pH-Wert sowie die in Spuren vorkommende Ameisensäure oder das mit Hilfe der Glucoseoxidase gebildete Wasserstoffperoxid eine untergeordnete konservierende Wirkung ausüben [ACKER et al., 1967]. Die dabei ebenfalls entstehende Gluconsäure führt zu einer leichten Absenkung des pH-Wertes. Mit diesem Eindickungsprozess geht in der Regel eine Farbvertiefung des Honigs einher. Zwar existiert ein gewisser Zusammenhang zwischen der Trachtpflanze und der Honigfarbe, jedoch können viele andere Einflüsse wie die geographische Lage, die Bienenrasse, die Jahreszeit, die klimatischen Einflüsse, die Gewinnungsart und der Alter des Honigs einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Farbe des Honigs ausüben.

1.4.4 Honiganalytik

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass Honige heller Natur analytisch leichter zu bearbeiten sind, da der Anteil der störenden Substanzen geringer ausfällt. Besondere Herausforderung an die Analytik von Rückständen in Honigen stellen die sehr dunklen bis schwarzen Honigtauhonige dar. Insbesondere die Rückstandsanalytik in Honigen mit flüssigchromatographischen Methoden steht häufig vor der Problematik, dass eine Methodik, die mit einem Honig gute Ergebnisse brachte, mit einem anderen Honig zu gänzlich unbefriedigenden Ergebnissen führen kann. Die Störungen in der Detektion des UV-Detektors können erheblich sein und erfordern entweder eine deutlich spezifischere Aufarbeitung oder eine spezifischere Detektion. Dabei ist der massenspektrometrischen

Detektion gegenüber der teilweise ebenfalls möglichen Fluoreszenzdetektion eindeutig der Vorzug zu geben. Allerdings handelt es sich derzeit noch um ein Messprinzip mit hohen Investitionskosten, das nicht jedem Labor zur Verfügung steht. Daher hat die Entwicklung preiswerterer Analysemethoden eine klare, wenn auch finanziell induzierte, Daseinsberechtigung. Allerdings können die dafür notwendigen aufwändigen Aufarbeitungen über längere Sicht aufgrund der gegenüber der HPLC-MS/MS deutlich höheren laufenden Kosten für das Verbrauchsmaterial und durch den Arbeitsaufwand und den damit verbundenen Personalkosten kostenintensiver ausfallen.

1.5 Zielsetzung

In Deutschland wurden im Jahr 2005 20.783 Tonnen Honig geerntet [ANONYMOUS, 2006]. Diese Erntemenge deckt etwa 20 % des inländischen Honigkonsums [ANONYMOUS, 2005]. Im gleichen Jahr wurden 93.709 Tonnen Honig im Wert von 134 Millionen Euro importiert, wobei die drei größten Lieferanten Argentinien (37%), Mexiko und Brasilien sind. Es ist bekannt, dass besonders die Bienenzüchter in zentralamerikanischen Ländern verbreitet das preiswerte Oxytetracyclin zur Behandlung ihrer Bienenvölker einsetzen.

Werden Tierarzneimittel appliziert, kommt es immer zu Wechselwirkungen mit anderen Stoffen oder zur Veränderungen der Wirkstoffe durch den Organismus des Tieres. Auch wenn die Honigbiene nicht in der Lage ist, Stoffe zu entgiften [mündliche Mitteilung Fr. Dr. RADEMACHER, 2002], ist eine Veränderung der Tetracycline durch Inhaltsstoffe des Honigs bzw. durch Zusätze von der Biene wahrscheinlich. Bisher ist darüber allerdings wenig bekannt. Insbesondere der Abbau des häufig eingesetzten Oxytetracyclins im Honig war näher zu untersuchen. Eine Medikationsstudie, mit deren Hilfe die Rückstandsgehalte im Honig nach der Applikation von Oxytetracyclin und Chlortetracyclin ermittelt und deren Abbau untersucht werden können, sollte durchgeführt werden. Als Modellsubstanzen wurden Oxytetracyclin, da es sich um das polarste der verwendeten Tetracycline handelt und zur Behandlung von Honigbienen am häufigsten eingesetzt wird, und Chlortetracyclin, da es sich um ein im Vergleich zum Oxytetracyclin unpolares Tetraacyclin handelt, für die Durchführung der Medikationsstudie ausgewählt.

Neben den schnellen Screening-Tests sind für die amtliche Lebensmittelkontrolle und Handelslaboratorien auch Methoden zur sicheren Identifizierung und Quantifizierung unentbehrlich. Die Screening-Tests ELISA und CHARM II sollten auf ihre Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit im Vergleich zu einer etablierten chromatographischen Methode an authentischem Material verglichen werden. Als Ausgangspunkt für eine chromatographische Analytik von Tetracyclinen in Honig wurde die unkomplizierte Methodik von Zurhelle [ZURHELLE, 200a] für die Analytik von Tetracyclinen in Ei gewählt. Auch die Möglichkeit, die Honige aus der Medikationsstudie durch ein auf Honiganalytik spezialisiertes Handelslabor zum Vergleich mit zu untersuchen sollte genutzt werden.

Weiterhin sollten die durch die Medikationsstudie gewonnen Honige für eine Untersuchung der Stabilität der Tetracyclinrückstände im Honig über einen Zeitraum von 10 Monaten genutzt werden.

Mittels einer durchzuführenden Marktstudie mit Honigen aus verschiedenen Quellen sollte weiterhin die aktuelle Belastungssituation von Honigen mit Tetracyclinrückständen festgestellt werden.

2 Experimenteller Teil und Diskussion

2.1 Methodenentwicklung

2.1.1 On-line Dialyse

Die von Zurhelle [ZURHELLE et al, 2000a] zur Analytik von Tetracyclinrückständen in Ei entwickelte Analysenmethode wurde auf ihre Anwendbarkeit zur Analytik von Honigen untersucht. Auch wenn eine Dialyse zur Aufarbeitung von Honigen aufgrund der im Honig zu erwartenden Moleküle mit relativ geringer Molekülmasse zunächst nicht sinnvoll erscheint, wurde die Möglichkeit, diese Methode ohne apparative Veränderungen neben der Probenmatrix Ei auch für Honig verwenden zu können, als reizvoll angesehen. Daher wurde der Versuch unternommen, dieses System in unverändertem Zustand für die Analyse von Honigen zu verwenden.

Diese Methode basiert auf einer zweistufigen Reinigung der mit einem geeigneten Puffer verdünnten, homogenisierten Eier. Die erste Stufe besteht aus einer Dialyse gefolgt von einer Festphasenextraktion an einer Polymerphase und anschließender flüssigchromatographischer Trennung der Analyten. Diese Aufreinigungs- und Anreicherungs-schritte werden von dem ASTED-System (automated sequential trace enrichment of dialysates) vollautomatisch ausgeführt. Das kommerzielle, von Oeser [OESER, 1994] für die Analytik von Nitrofuranen verwendete ASTED-System, wurde für die Analytik von Tetracyclinen von Zurhelle in mehreren Punkten modifiziert (Abbildung 13). Dabei wurde das System von Zurhelle derart umgestaltet, dass die bei der Dialyse erhaltenen Dialysate in einer Dialysat-Sammelschleife gesammelt werden und erst nach Abschluß aller Dialyseschritte vereint zur Anreicherungssäule gefördert werden. Diese Vorgehensweise war durch die Wahl des Anreicherungs-materials in der Anreicherungssäule (TEC, trace enrichment column) erforderlich geworden, da dieses Material einen erhöhten Rückdruck produzierte. Bei Drücken größer als 7 bar öffnete im Dilutor 1, eine elektromotorisch betriebene Gaskolbenpipette, ein Überdruckventil. Diese Änderung im System wurde beibehalten, da sich das von Zurhelle verwendete Anreicherungs-material für die Anreicherung von Tetracyclinen als geeignet erwiesen hatte. Zudem konnte durch die notwendig gewordenen zu-

sätzliche Pumpe (Pumpe 2) das Dialysat zur Anreicherungssäule gefördert und die Anreicherungssäule gespült werden, während die Dilutoren bereits die nächste Dialyse vorbereiten und durchführen können.

Da dieses automatisierte Analysensystem den Ausgangspunkt für die weiteren Entwicklungsschritte darstellt, wird es im Folgenden kurz erläutert. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in der Dissertation von Zurhelle [ZURHELLE, 2000].

2.1.1.1 Funktionsweise

In Abbildung 13 ist der Aufbau des automatisierten Analysensystems schematisch dargestellt. Es handelt sich dabei um ein erheblich modifiziertes kommerzielles ASTED[®]-System der Firma Abimed Analystechnik. Das Analysenprinzip besteht prinzipiell aus den fünf unterschiedlichen Analysenschritten

- Probenaufgabe,
- Dialyse,
- Sammeln der Dialysate,
- Anreicherung an einer Festphase und
- Transfer zur Trennsäule mit Trennung und Detektion.

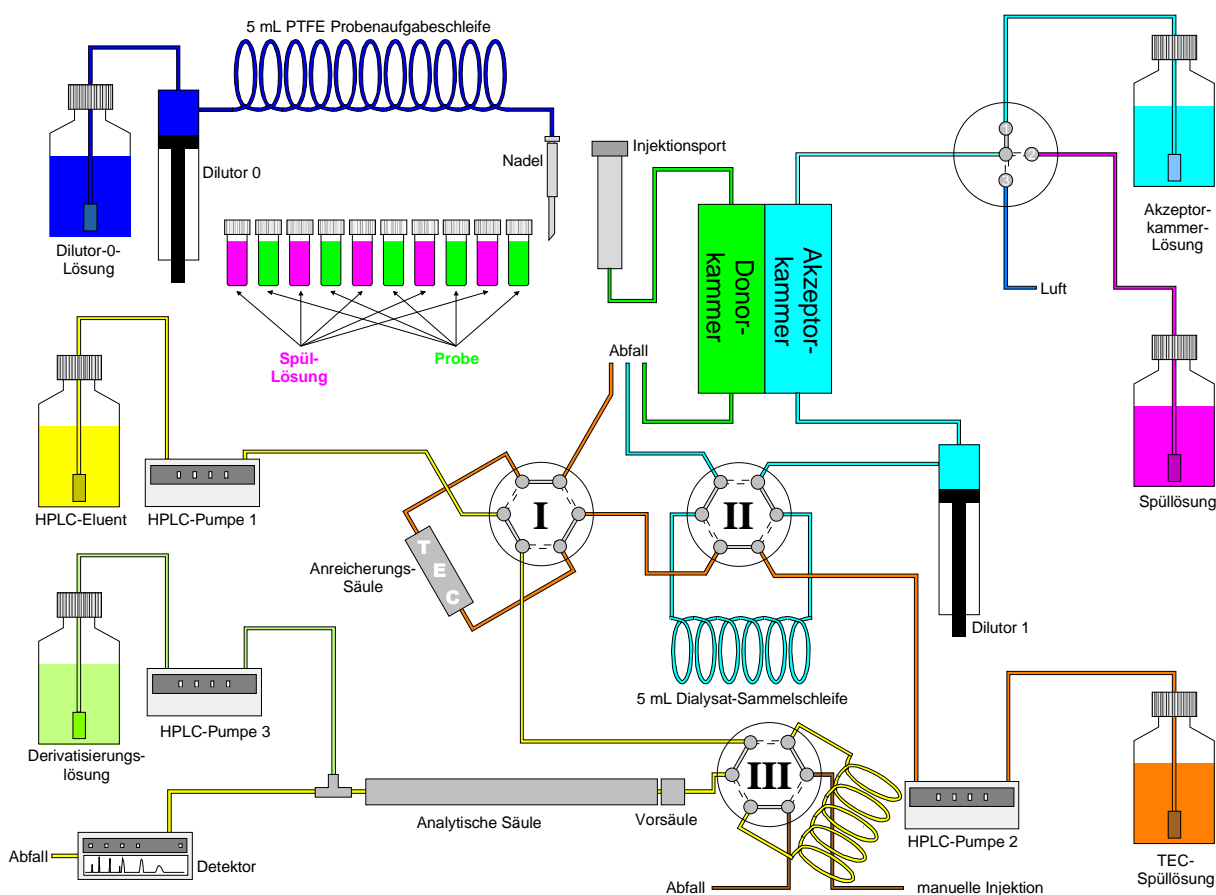


Abbildung 13 Das ASTED®-System mit den von Zurhelle eingebauten Modifikation

(Anmerkung: Die verwendeten Farben dienen ausschließlich der Illustration)

Der Ablauf der Analyse im Einzelnen:

Der Dilutor 0 zieht die Probe in die 5 mL PTFE-Probenaufgabeschleife auf und füllt mit der Probenlösung die Donorkammer der Dialysezelle. Dabei wird die Dialysezelle, die aus zwei in Reihe geschalteten Dialyseblöcken mit je 370 μL Volumen besteht, überfüllt. In Abbildung 13 ist, da es zum Verständnis des Funktionsprinzips nicht beiträgt, zur Vereinfachung die Unterteilung in zwei Dialysezellen nicht dargestellt. Die vom Dilutor 0 in die Donorkammer eingebrachte Probenlösung wird statisch dialysiert, d.h. sie verbleibt dort statisch während des gesamten Dialysevorganges. Im Gegensatz dazu wird die Akzeptorkammerlösung dynamisch in Zeitabständen von 225 Sekunden gegen eine frische Lösung ausgetauscht. Die Analyten treten aufgrund des osmotischen Druckes durch die Dialysemembran hindurch während alle Matrixbestandteile mit einer Molekülmasse größer als 15.000 Dalton nicht durch die Dialysemembran treten können und somit in der Donorlösung zurückbleiben. Durch den wiederholten Austausch der Akzeptorkammerlösung wird der Konzentrationsgradient für die Erzeugung des osmotischen Druckes aufrechterhalten und somit eine größere Ausbeute erzielt. Die auf der Akzeptorseite

erhaltenen Lösungen bezeichnet man als Dialysat und der Austauschvorgang der Akzeptorkammerlösung wird im nachfolgenden Puls genannt. Die bei den vier Pulsen erhaltenen Dialysate werden vom Dilutor 1 angesaugt und nach Beendigung des letzten Pulses vereinigt zur Dialysat-Sammelschleife gefördert. Die drei ersten Pulse haben ein Volumen von 1,35 mL, der letzte Puls ein Volumen von 1,45 mL, wodurch sich insgesamt ein Volumen von 5,5 mL ergibt. Die 5,5 mL Dialysat werden vom Dilutor 1 in die Dialysat-Sammelschleife mit einem Volumen von 5 mL gefördert, wobei diese ebenfalls überfüllt wird. Das jetzt in der Dialysat-Sammelschleife befindliche Dialysat wird durch Umschalten des Schaltventils II mittels der HPLC-Pumpe 2 zur Anreicherungssäule (TEC) gefördert. Dort werden die Analyten adsorbiert, während Begleitstoffe, die an dem Anreicherungsmaterial nicht gebunden werden, die Anreicherungssäule passieren und in den Abfall gepumpt werden. Nachdem die Dialysate über die Anreicherungssäule gegeben worden sind, wird die Anreicherungssäule noch für vier weitere Minuten von der Pumpe 2 mit der TEC-Spüllösung gespült um damit die Anreicherungssäule weiter zu spülen und von den Salzen der Akzeptorkammerlösung zu befreien. Anschließend schaltet das Schaltventil I um, so dass der von HPLC-Pumpe 1 geförderte Eluent die angereicherten Analyten wieder von der Anreicherungssäule eluiert, zur Trennsäule transferiert und dort chromatographisch trennt. Bei dem Schaltventil III handelt es sich um ein manuell zu betätigendes Ventil, welches nur für die direkte Injektion von Lösungen auf die Trennsäule Verwendung findet. Im automatisierten Betrieb war es stets in der abgebildeten Stellung.

Während die Anreicherung des Dialysates an der Anreicherungssäule stattfindet, beginnt das System mit der Spülung des Systems durch die in dem folgenden Probenfläschchen enthaltenen Spüllösung. Diese Lösung ist notwendig, um die Dialysezelle und insbesondere die Dialysemembran von anhaftenden Proteinen zu reinigen. Die Spülvials sind im Probenhalter immer wechselweise mit den Probenvials angeordnet und enthalten eine detergenzienhaltige Lösung. Diese Lösung wird vom Dilutor 0 durch die Dialysezelle gespült, während Dilutor 1 diese Spüllösung über das Niederdruckventil (in Abbildung 13 rechts oben dargestellt) und die Akzeptorkammer entgegennimmt. Abschließend wird zur Entfernung der Spüllösungen die Donorkammer mit 25 mL Dilutor-0-Lösung und die Akzeptorkammer mit 15 mL Akzeptorkammerlösung gespült. Während dieses Spülvorganges ist das Schaltventil 1 wieder in die Stellung geschaltet, die es ermöglicht, dass die HPLC-Pumpe 1 die Anreicherungskartusche wieder mit Wasser konditioniert.

Die Trennung der Tetracycline erfolgte isokratisch bei Raumtemperatur an einer reversed-phase Trennsäule (Superspher[®] C₈, 4 μ m, 250 \times 3 mm I.D., Merck, Darmstadt) mit einem

Eluenten aus einer wässrigen 0,01 mol/L Oxalsäurelösung und Acetonitril (50 + 50, v+v). Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 360 nm. Insgesamt dauert die Analyse einer Probe ca. 90 Minuten; somit konnten 16 Proben innerhalb von 24 Stunden vom System analysiert werden. Die Laborarbeit reduziert sich durch die weitgehende Automatisierung auf das Herstellen der zur Analytik benötigten Lösungen und das Homogenisieren und Verdünnen der jeweiligen Proben. Soweit entspricht das System exakt dem von Zurhelle übernommenen Analysensystem. Die ersten Analysen wurden mit Eiprobe durchgeführt und zeigten Übereinstimmung mit den von Zurhelle in seiner Dissertation vorgestellten Chromatogrammen.

Technische Probleme

Bei der weiteren Arbeit mit diesem System zeigten sich jedoch einige technische Probleme. So lief beispielsweise der Injektionsport des Öfteren über. Normalerweise sollte die Dichtung im Injektionsport die Nadel komplett abdichten. Dass bei direkter Aufnahme von Lösungen auf die Anreicherungssäule Undichtigkeiten am Injektionsport auftreten, liegt an dem höheren Gegendruck den diese Anreicherungssäule bewirkt. Bei der Aufnahme von Proben oder Spüllösungen in die Dialysekammer sollte dieses aufgrund der relativen Druckfreiheit des offenen Systems aber nicht zu beobachten sein. Obwohl die Dialysekammer zwar systematisch überfüllt wurde und somit das genaue abgegebene Volumen nicht relevant war, konnte nicht abgeschätzt werden, welcher Anteil der Probe den Weg in die Dialysekammer gefunden hatte. Da das Überlaufen trotzdem vermehrt auftrat und mit Reinigungen nicht zu beherrschen war, wurde auf der Suche nach der Ursache für dieses Problem die Programmierung des Systems, die bisher unverändert gelassen wurde, genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass dieses Programm aus einigen offenbar älteren Programmteilen bestand, in die später andere Teile eingefügt worden waren. Aufgrund der damit zu erwartenden Probleme bei einer späteren möglicherweise notwendigen Änderung des Programms bei einer Veränderung des Gesamtsystems, wurde das Programm von Grund auf neu geschrieben und dokumentiert. Dadurch konnte eine deutlich schlankere Programmierung unter Verzicht der im bisher verwendeten Programm genutzten Unterprogramme erreicht werden. Da der technische und apparative Ablauf genau übernommen wurde, führt dieses Programm alle Schritte der automatisierten Online-Dialyse exakt in der Weise aus, wie es das bis dahin verwendete Programm tat. Dieses Programm ist in 5.2.6 einschließlich der Kommentare einzusehen.

2.1.1.2 Überprüfung des Analysensystems

Eine exakte Überprüfung im Sinne einer Validierung wurde für dieses System nicht durchgeführt, da es dem von Zurhelle verwendeten System entspricht und dort bereits eine ausführliche Überprüfung des Analysensystems mit Standards und Ei-Proben durchgeführt wurde.

2.1.1.3 Untersuchung von Honigproben

Zunächst wurden sowohl das bestehende Analysensystem wie auch das Analysenverfahren auf die Anwendbarkeit von Honigen als Probenmatrix untersucht. Dazu wurden Honige mit dem von der Ei-Analytik bewährten Probenverdünnungspuffer im Mischungsverhältnis von 1 g Honig zu 2 g Probenverdünnungspuffer verdünnt und zur Analyse eingesetzt. Der Probenverdünnungspuffer besteht aus einem 0,3 mol/L Citratpuffer mit einem pH-Wert von 5,75. Da Honige in der Regel einen sauren pH-Wert im Bereich von 3 bis 4 aufweisen und die Tetracycline ebenfalls im sauren Bereich analysiert werden sollten, wurde dieser Parameter zunächst nicht verändert. Die Chromatogramme für dialysierte Standards und Ei-Proben zeigten eine gute Basislinientrennung der drei Tetracycline (Abbildung 14). Auch die in dem verwendeten älteren Standard bereits entstandenen Epimere der Tetracycline konnten von den Muttersubstanzen getrennt werden, lediglich der Oxytetracyclinpeak besteht aus der Summe von Oxytetracyclin und epi-Oxytetracyclin.

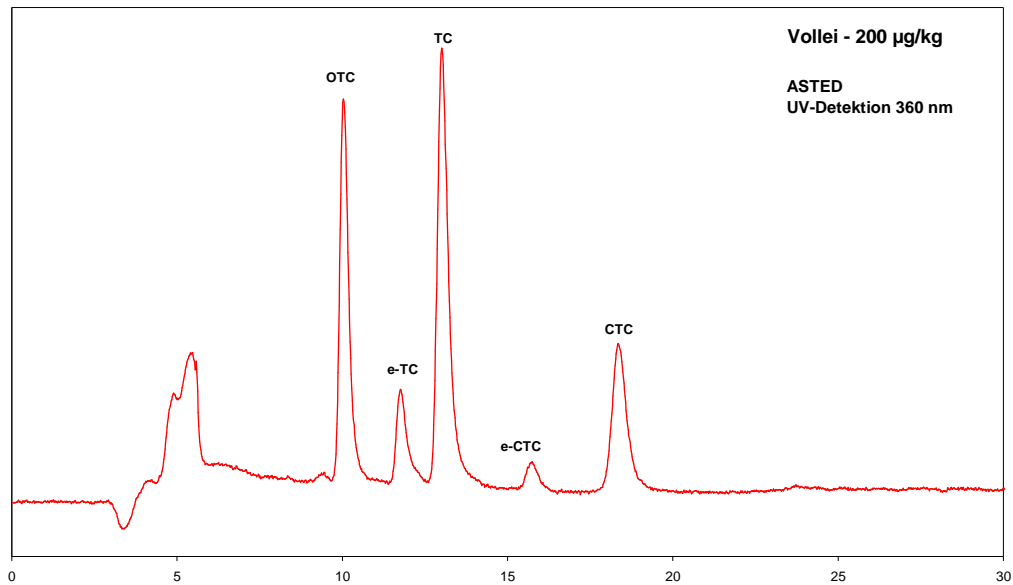


Abbildung 14 - Chromatogramm einer Volleiprobe (Dialyse gegen Akzeptorkammerlösung).

Die erhaltenen Chromatogramme für dotierte Honigproben (Abbildung 15) zeigten bei identischen Bedingungen jedoch Chromatogramme, welche in dem Retentionsbereich der Tetracycline deutliche Störpeaks aufwiesen und dadurch eine Auswertung des Oxytetracyclins bzw. epi-Oxytetracyclins unmöglich werden ließen. Die Wiederfindungsraten waren zudem deutlich kleiner, was sich schon durch die Größe der Peaks zeigte.

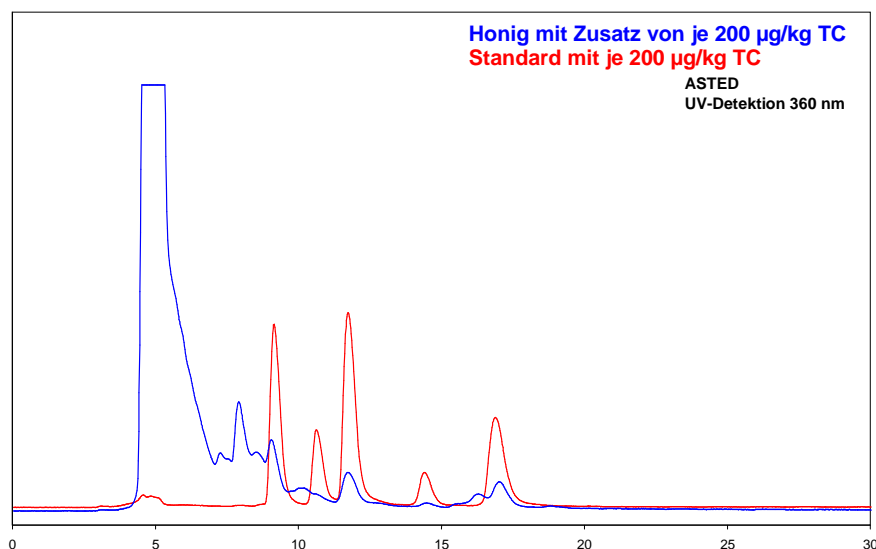


Abbildung 15 - Chromatogramm einer Honigprobe mit Zusatz von OTC, TC und CTC und einer Standardlösung mittels ASTED (Dialyse gegen Akzeptorkammerlösung).

Nach einigen Analysedurchgängen mit Honigen zeigte sich zudem eine Zunahme des Drucks im Analysensystem bis zu einem Maß, dass eine Probenaufnahme ohne Austritt einer

erheblichen Menge Probenlösung aus dem Injektionsport nicht mehr möglich war. Das ist auf die im Honig natürlicherweise vorhandenen Partikel (Pollen, Wachspartikel etc.) zurückzuführen. Deshalb wurde als zusätzlicher Reinigungsschritt eine Filtration der verdünnten Honige über einen Spritzenvorsatzfilter (Celluloseacetat, 0,45 μm) durchgeführt. Die Druckzunahme im System konnte darauf nicht mehr beobachtet werden. Auf das Aussehen der Chromatogramme hat das Filtrieren keinen Einfluss gehabt.

Tetracycline besitzen neben der für Rückstandsanalysen prinzipiell günstigeren Wellenlänge um 360 nm ein weiteres, größeres Absorptionsmaximum im Bereich von 272 nm. Messungen bei dieser Wellenlänge brachten für Honig aber keinen Vorteil hinsichtlich der Signalverhältnisse von Analyten zu Matrixkomponenten. Gegenüber 360 nm als Detektionswellenlänge ergab sich bei 272 nm sogar noch ein weiterer Nachteil, da das für die Spülung der Dialysekammer eingesetzte Triton X-100 zu einer homologen Reihe von Störsignalen führte, die ab einer Retentionszeit von ca. 17 Minuten auftraten (Abbildung 16).

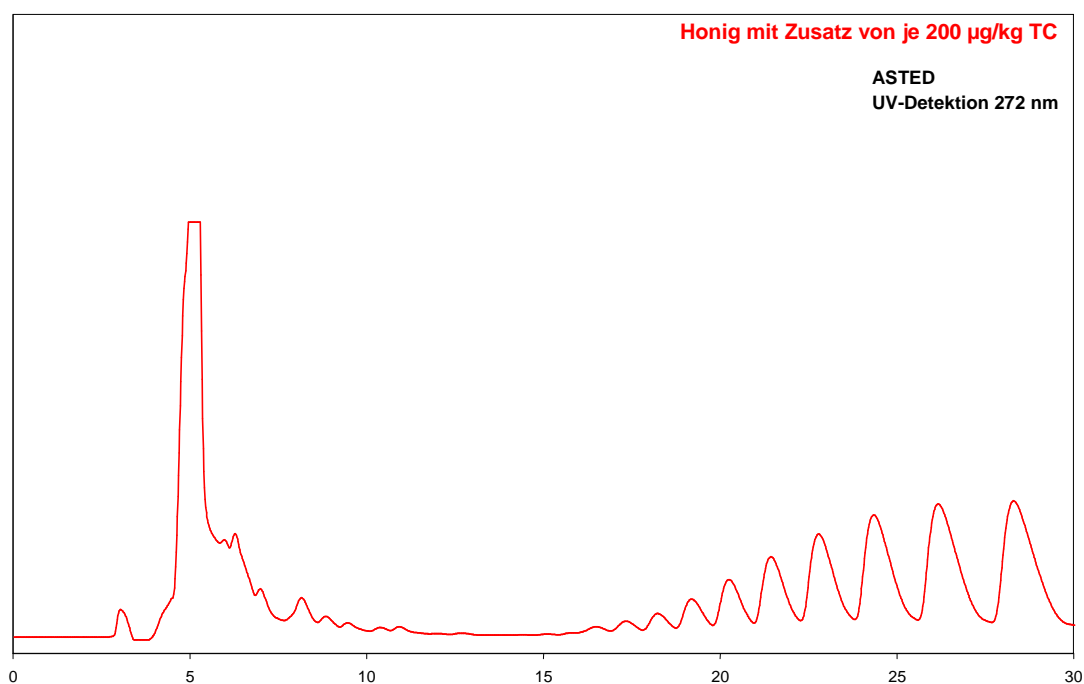


Abbildung 16 - Chromatogramm einer Honigprobe mit Zusatz von OTC, TC und CTC mittels ASTED (Dialyse gegen Akzeptorkammerlösung) mit Störsignalen aus der zum Spülen verwendeten Triton-X-Lösung.

Diese vom Triton X-100 stammenden Signale ließen sich durch Ersatz der Spüllösung durch destilliertes Wasser eliminieren (Abbildung 17). Diese Vorgehensweise ist bei Ho-

nig als Lebensmittelmatrix vertretbar, da anders als bei Ei oder Gewebeextrakten keine Lipide und Lipoproteine entfernt werden müssen.

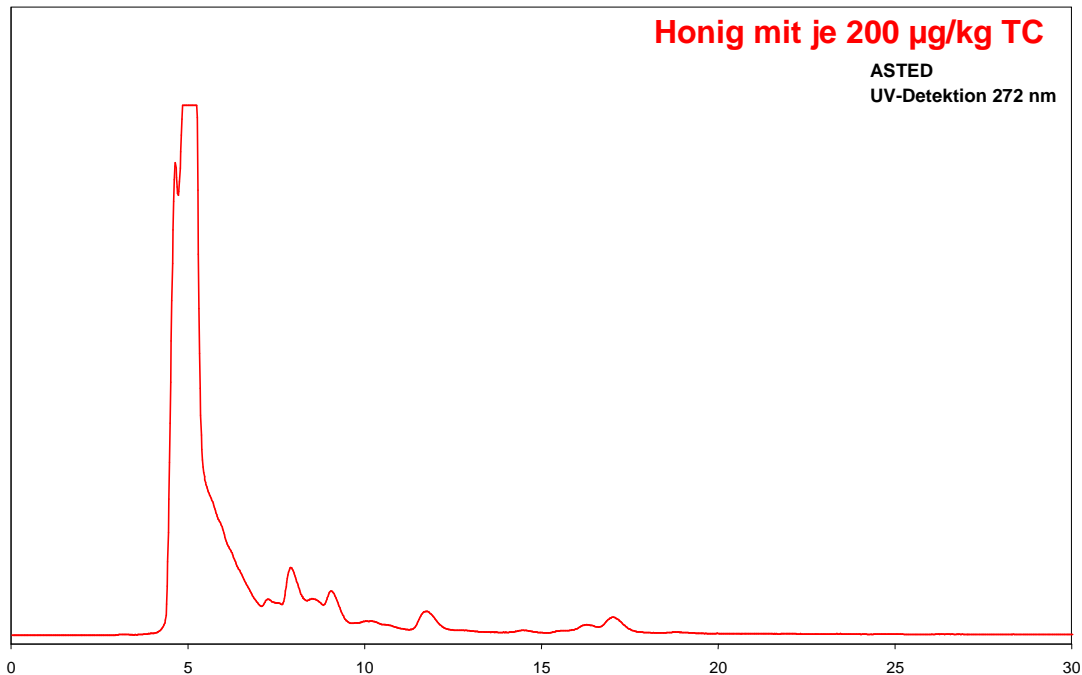


Abbildung 17 - Chromatogramm einer Honigprobe mit Zusatz von OTC, TC und CTC mittels ASTED (Dialyse gegen Wasser).

Eine Veränderung der Detektionswellenlänge zeigte keine Verbesserung und auch die Anpassung des ASTED-Systems an die von Bäckman [BÄCKMAN und TÖRNQVIST, 2000] vorgeschlagenen Arbeitsbedingungen für die Honiganalytik zeigte trotz einer leichten Verbesserung der Wiederfindung keine Verbesserung der Selektivität der Bestimmung. Zur Erhöhung der Selektivität wurde eine online-Nachsäulenderivatisierung mit Magnesiumionen und anschließender Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Allerdings zeigten auch diese Chromatogramme mit Standards ansehnliche Chromatogramme, während es auch hier bei der Untersuchung von Honigen zu keinen brauchbaren Chromatogrammen kam. Zwar fielen die Störungen geringer aus, jedoch waren die Wiederfindungen weiterhin sehr gering. Da auch der pH-Wert für die Dialyse ein wichtiger Parameter darstellt [COOPER et al. 1988], wurden die Dialysen mit in verschiedenen Puffern gelösten Honigen und gegen Pufferlösungen durchgeführt. Leider brachten auch diese Versuche nicht den erwünschten Erfolg.

2.1.2 Einstufige online-Festphasenextraktion

Während sich die automatisierte Probenvorbereitung mit Dialyse für proteinhaltige Lebensmittel wie Ei als brauchbarer Probenvorbereitungsschritt erwiesen hatte, ist der Reinigungsgewinn bei Honigen aufgrund der überwiegend im Honig enthaltenen kleineren Moleküle ohnehin nur sehr begrenzt. Die größte Menge der Proteine im Honig wird durch Pollen geliefert [DUISBERG, 1967]. Die Größe der Pollenkörner variiert von $2\ \mu\text{m}$ bis maximal $250\ \mu\text{m}$ im Durchmesser, wobei je nach Reifegrad und Alter auch innerhalb einer Art Größendifferenzen auftreten können. Die Größe der Pollen der meisten einheimischen Pflanzen liegt in einer Größenordnung von $20\text{-}45\ \mu\text{m}$, so dass der größte Teil der im Honig enthaltenen Proteine ohnehin bei der notwendigen Filtration mit einem Filter der Porenweite von $0,45\ \mu\text{m}$ entfernt worden ist. Diese Tatsache und die unbefriedigenden Ergebnisse beim Einsatz der Dialyse führten zu der Entscheidung, die Dialyse als Probenvorbereitung für die Analytik von Honigen aufzugeben. Somit war es notwendig geworden, eine eigene, für die Analyse von Honigen optimierte Probenvorbereitung zu entwickeln. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die schlechte Wiederfindung auf eine nur unzureichende Dialyseausbeute zurückzuführen war, wurde das automatisierte Probenaufarbeitungssystem derart verändert, dass die filtrierte Probe nicht in die Dialysekammer sondern vom Dilutor 0 direkt in die Probenschleife gegeben wurde. Von dort wurde die Probe mittels HPLC-Pumpe 2 direkt auf die Anreicherungssäule aufgegeben und mit Wasser nachgespült. Die Dialysekammern, der Dilutor 1 und der gesamte Aufbau für die Akzeptorkammer entfallen bei diesem Aufbau (Abbildung 18). Der weitere apparative Aufbau wurde nicht verändert. Es handelt sich bei dem Aufbau prinzipiell um ein einstufiges online-Festphasenextraktionssystem.

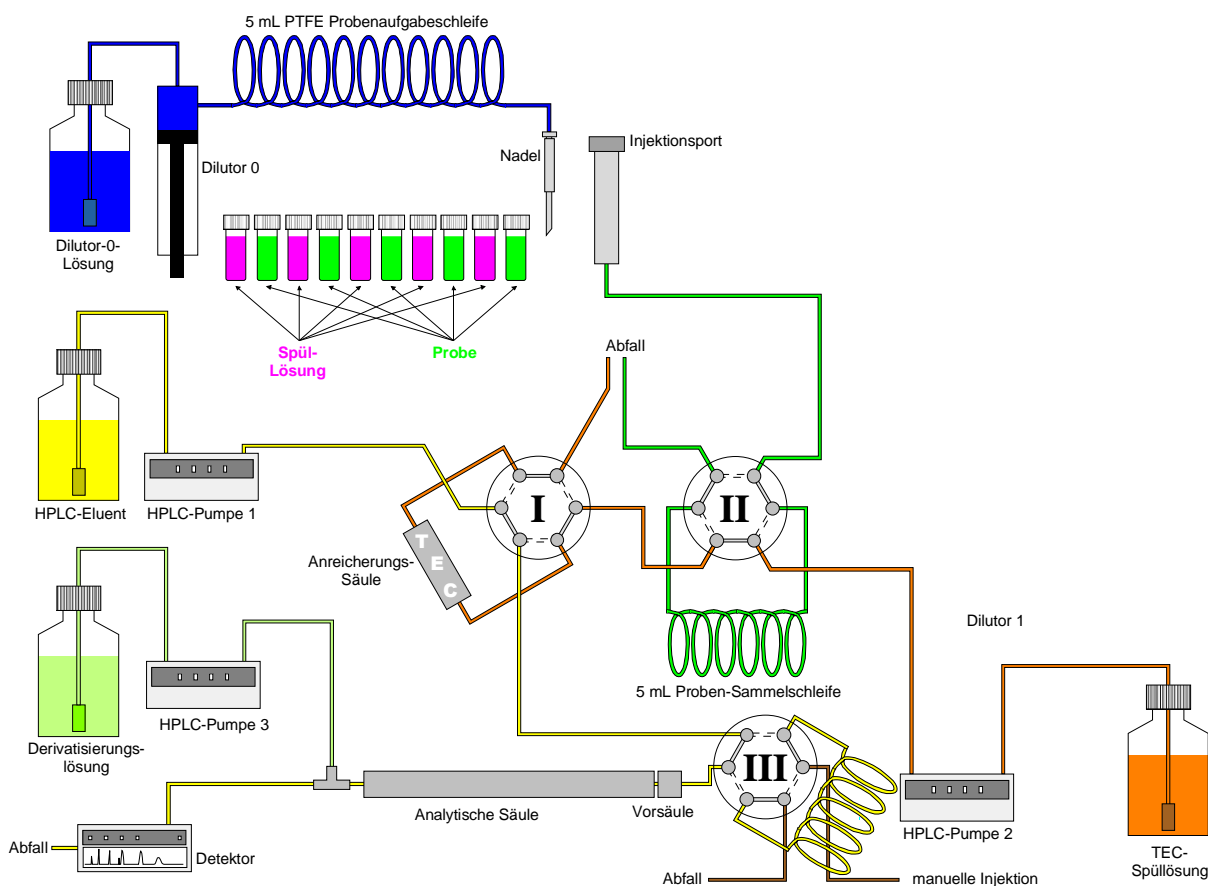


Abbildung 18 - Aufbau der online-Probenvorbereitung mit einstufiger Festphasenextraktion

Dieses System arbeitete technisch ohne Probleme und führte mit Standards zu Chromatogrammen, von denen eines mit einem 14 Tage alten Standardgemisch von OTC, TC und CTC in Abbildung 19 zu sehen ist. Die erkennbaren Peaks sind basisliniengetrennt und zeigen eine ausreichende Symmetrie mit schwachem Tailing. Der Peak für epi-OTC fällt mit dem OTC-Peak zusammen, da beide Substanzen coeluierten und mit dem hier verwendeten Eluenten (0,01 mol/L Oxalsäure : Acetonitril 1 : 1, v/v) nicht zu trennen waren. In jedem Fall ist eine Trennung der einzelnen Komponenten, insbesondere des OTC vom epi-TC erreicht worden, wie es in einer Publikation einer Methode zur Tetracyclinanalytik gefordert worden ist [Bundesgesundheitsblatt 10/95].

Die Wiederfindungen lagen für alle verwendeten Tetracycline zwischen 94 und 98 %. Zur Berechnung der Wiederfindungen wurden als Vergleich Standardlösungen verwendet, die direkt über das manuelle Injektionsventil III eingespritzt wurden. Bei den verwendeten Standards handelte es sich um Lösungen der jeweiligen Tetracycline in 0,01 mol/L Oxalsäure. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anreicherung an der Festphase zu ausreichenden Wiederfindungen führt, dass also sowohl das polarere Oxytetracyclin wie auch das unpolare Chlortetracyclin in ausreichender Menge an der Festphase gebunden und auch

wieder eluiert werden kann. Somit stand mit dem Füllmaterial (PLRP-S, 100 Å, siehe 2.8.1) ein Material zu Verfügung, das zur Anreicherung der Tetracycline aus wässrigen Matrices Verwendung finden konnte.

Die Aufarbeitung der Honige gestaltete sich zunächst sehr einfach: Es wurden jeweils 10 g Honig eingewogen und mit 20 mL Wasser verdünnt. Nachdem der Honig durch kräftiges Schütteln vollständig in Lösung gegangen war, wurde über zunächst einen Papierfaltenfilter und anschließend mittels Filtration über einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter eine für die automatisierte Aufarbeitung geeignete Lösung hergestellt. Von dieser Lösung wurden dann 4 mL in das Probenial gegeben und in das gekühlte Probenrack gestellt. Das automatisierte System entnahm diesem Probenial 3 mL, füllte diese Lösung in die Probenschleife und drückte durch Aufgabe von einem weiteren Milliliter Wasser aus dem Dilutor-0-Lösungsgefäß die restliche, in den Zuleitungen befindliche Probe in die Probensammelschleife. Die dort angekommene Lösung wurde durch Umschalten des Schaltventils II mittels der HPLC-Pumpe 2 zur Anreicherungssäule gefördert, 10 Minuten mit Wasser nachgespült und durch Umschalten des Schaltventils I durch Pumpe 1 von der Anreicherungssäule eluiert, zur Trennsäule gefördert und dort chromatographisch getrennt.

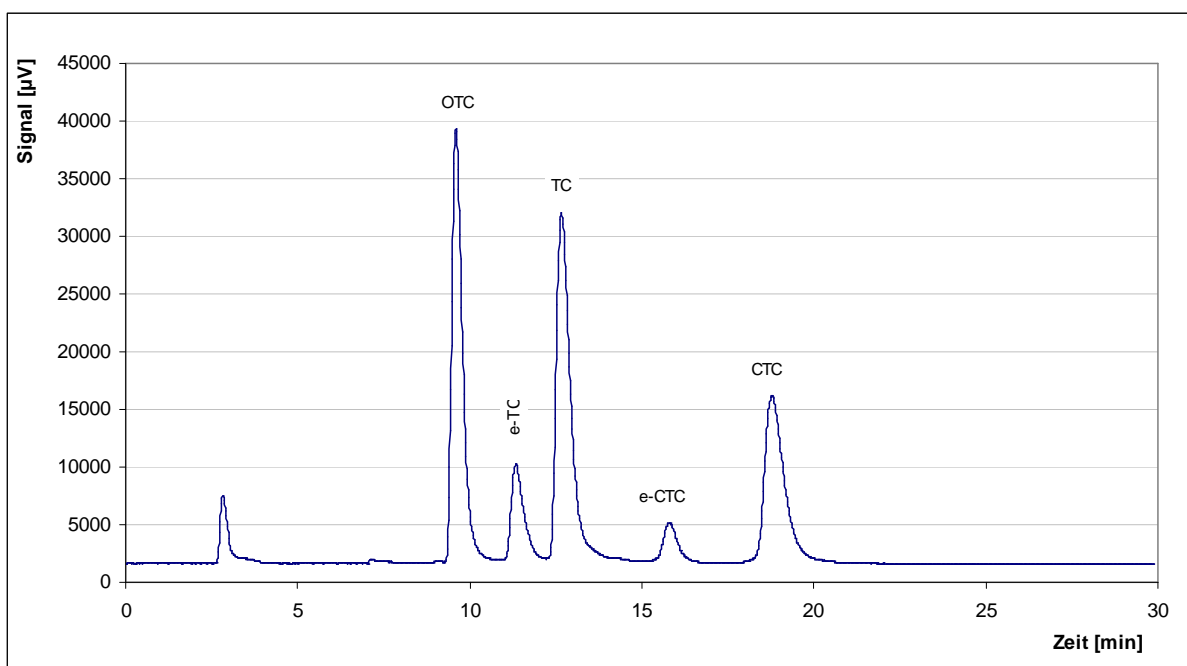


Abbildung 19 - Chromatogramm eines 14 Tage alten Standardgemischs von OTC, TC und CTC mittels Online-Festphasenanreicherung.

Das Chromatogramm eines mit dieser Methodik untersuchten dotierten Honigs (1 mg/kg) zeigt Abbildung 20. Wie zu erkennen, sind die Signale für die Analyten sehr klein und die

Retentionszeiten sind leicht verschoben. Die Basislinie des Standards wurde bei der Darstellung in Abbildung 20 zur Verbesserung der Erkennbarkeit etwas nach oben verschoben.

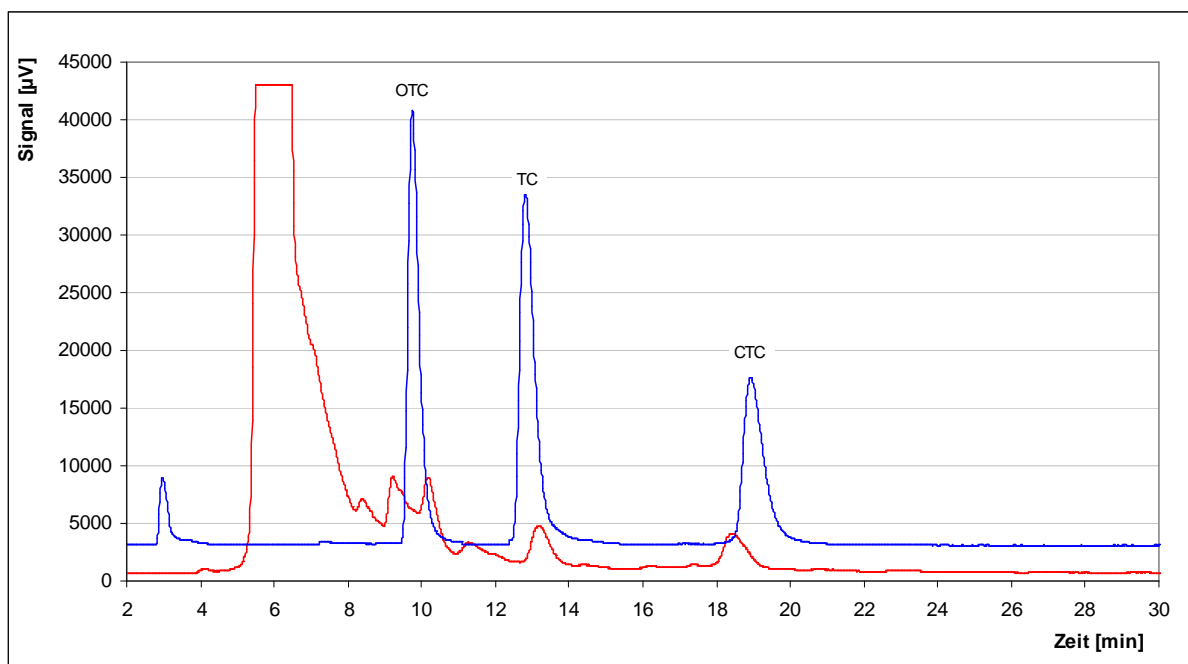


Abbildung 20 - Chromatogramm eines mit je 1 mg/kg OTC, TC und CTC dotierten Honigs (rotes Chromatogramm) mit einer Standardlösung gleicher Konzentration (blaues Chromatogramm).

Die Chromatogramme waren mit diesen sehr niedrigen Wiederfindungen reproduzierbar, wobei von Honig zu Honig deutliche Unterschiede zu sehen waren. Insbesondere dunklere Honige, z.B. Honigtauhonige zeigten eine große Anzahl von Störpeaks, die eine Auswertung teilweise gänzlich unmöglich werden ließen. Auch die Einstellung des pH-Wertes (2,6; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 und 5,5) durch Verwendung diverser McIlvaine-Puffer (siehe Anhang 5.3) zur Probenvorbereitung brachte keine Verbesserung der Wiederfindung. Weitere Untersuchungen zur Erhöhung der Kapazität der Anreicherungskartusche waren aufgrund der apparativen Gegebenheiten und des damit erforderlichen Geräteumbaus sowie der Aussicht, damit die Störungen in den Chromatogrammen nicht verringern zu können, nicht Erfolg versprechend und wurden somit nicht durchgeführt. Im Hinblick auf die Störpeaks war eine bessere Aufreinigung der Honigproben erforderlich, so dass eine einstufige Online-Anreicherung offensichtlich nicht ohne weitere Reinigungsschritte Erfolg versprechend war. Somit wurde die hier erläuterte einstufige Online-Anreicherung nicht weiter verfolgt. An andere Proben mit hohem wässrigem Anteil wie z.B. Trinkwasser oder Urin könnte diese Methodik sicherlich mit geringem Aufwand angepasst werden. Für

Proben mit hohem Proteinanteil wie z.B. Ei, Serum oder Blut ist hingegen die Online-Dialyse die Methode der Wahl.

2.1.3 Methode nach § 64 LFGB

Zur Analytik der Tetracycline im Honig wurde zunächst das Verfahren L 06.00-48 (V) aus der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB verwendet. Dieses Verfahren basiert auf dem von Farrington entwickelten Anreicherungsverfahren an einer mit Metallkationen beladenen Sepharose-Säule [FARRINGTON et al., 1991], die für die Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in Fleisch und Milch geeignet ist prävalidiert wurde. Darüber hinaus ist der Anwendungsbereich auf die Untersuchung von Fleisch anderer Tierarten, Ei, Honig sowie von Haut und Muskulatur von Fischen erweitert worden, ohne jedoch Angaben zur Zuverlässigkeit dieser Methode bei den letztgenannten Matrices zu machen.

Der wesentliche Schritt dieser Methode ist die Bindung der Tetracycline an einer mit Kupferionen beladenen Chelating-Sepharose. Das Probenmaterial wird homogenisiert und nach Filtration ohne weitere Reinigung direkt auf die mit Kupferionen beladene Chelating-Sepharose-Säule gegeben. Die Tetracycline binden selektiv an den Kupferionen unter Bildung von Chelatkomplexen. Bei dem darauf folgenden Waschschrift mit Wasser und Methanol werden unspezifisch gebundene Matrixbestandteile entfernt, während die Tetracycline, trotz ihrer sehr guten Methanollöslichkeit, weiter in Form des Kupferkomplexes an der Säule gebunden bleiben. Erst durch Elution mit einem EDTA-haltigen Puffer werden die gebildeten Chelate zerstört. Dabei werden die Kupferionen durch das EDTA komplexiert und somit sowohl die Bindung der Tetracycline an den Kupferionen gelöst, als auch die immobilisierten Kupferionen von der Chelating-Sepharose wieder entfernt. Diese Lösung aus Kupferionen, EDTA, Puffer und Tetracyclinen wird durch Festphasenextraktion an einer C₁₈-Säule nachgereinigt und dadurch von Kupferionen und EDTA befreit. Durch Aufgabe von Methanol werden die Tetracycline anschließend eluiert, am Rotationsverdampfer eingengt, im Eluenten aufgenommen und direkt per HPLC gemessen.

Die Entscheidung für dieses Verfahren wurde aufgrund der Tatsache getroffen, dass die Entwicklung eines gesicherten automatisierten Verfahrens für die Analytik von Tetracyclinen in Honig zum Zeitpunkt der Ernte noch weit genug fortgeschritten war und somit nicht zur Verfügung stand. Ein weiterer Aspekt, der zur Wahl dieser Methode führte, war

die Tatsache, dass es sich hierbei um ein validiertes Verfahren handelt, welches in vielen Laboratorien angewandt wird.

2.1.3.1 Durchführung

Diese „§ 64-Methode“ wurde mit Ausnahme der nachfolgend beschriebenen Abweichungen entsprechend der Vorschrift der amtlichen Sammlung durchgeführt:

- Auf den Zusatz des internen Standards gemäß Abschnitt 7.2 wurde verzichtet, da das in der Vorschrift als interner Standard gewählte Demeclocyclin bei den hier verwendeten chromatographischen Bedingungen nicht vom Tetracyclin getrennt werden konnte. Da für die Durchführung einer Medikationsstudie Oxytetracyclin und Chlortetracyclin vorgesehen waren, Tetracyclin aber durchaus als Verunreinigung des Chlortetracyclins auftreten kann, wurde von der Verwendung des Demeclocyclins als internem Standard abgesehen.
- Die Vorschrift der amtlichen Sammlung sieht vor, in die Kalibrierung nur den Eingangsschritt einzubeziehen. Hierbei werden jeweils 1,0 mL der Ethylenglycol-Methanol-Mischung mit den Dotierungslösungen dotiert, am Rotationsverdampfer eingengt, mit dem zu verwendenden Eluenten auf ein bestimmtes Gewicht gebracht und per HPLC analysiert. Durch den Wegfall eines internen Standards würden Korrekturen der gefundenen Gehalte über die Wiederfindungsverluste während der Probenaufarbeitung bei dieser Art der Kalibrierung nicht möglich sein. Daher wurde die Kalibrierung abweichend derart durchgeführt, dass dotierte Honige exakt wie die analysierten Proben nach Vorschrift aufgearbeitet und analysiert wurden. Diese Methodik ist deutlich aufwändiger als die in der § 64-Vorschrift vorgesehene Kalibrierung, hat jedoch den Vorteil, eine Kalibrierung über das gesamte Verfahren zu ermöglichen. Damit sind Einflüsse der Probenaufarbeitung auf die Analyten bei den Proben identisch zu denen der Kalibrierungsstandards und somit leichter feststellbar.
- Die Standardarbeitsanweisung der Methode gibt unter Punkt 5.1 an, dass das C₁₈-Füllmaterial der jeweils verwendeten Charge der Festphasenextraktionskartuschen auf ihre Eignung zu prüfen ist. Darauf konnte bei diesen Untersuchungen durch die Verwendung von fertig konfektionierten Extraktionskartuschen der Firma Macherey-Nagel GmbH, Düren, verzichtet werden. Diese Kartuschen der Marke

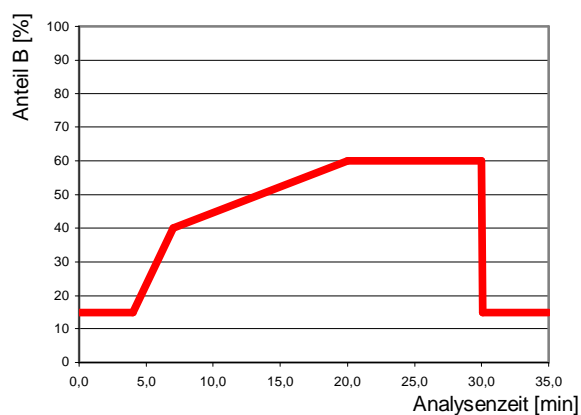
„CHROMABOND® Tetracycline“ sind bereits ab Werk auf ausreichende Wiederfindungsraten für die Tetracycline geprüft worden.

2.1.3.2 Chromatographie

Die Chromatographie wurde an einer RP-Phase (C₈) unter Gradientenelution durchgeführt. Die genauen chromatographischen Bedingungen sind folgender Aufstellung zu entnehmen:

Vorsäule	Merck LiChrospher® 100 C ₈ (5µm)
Trennsäule	Merck Superspher® 60 C ₈ - 5 µm, 250 × 3 mm
UV-Detektor	Merck L-4000A
Detektionswellenlänge	360 nm
Eluent A	0,01 mol/L Natriumpentansulfonat in 0,01 mol/L Oxalsäure, entgast
Eluent B	Acetonitril, HPLC-Qualität, entgast

Gradient



Fluss 0,35 mL/min

Temperatur Raumtemperatur

Aufgabevolumen 100 µL

Die Feststellung der Elutionsreihenfolge erfolgte mit Einzelstandards. Abbildung 21 zeigt ein Chromatogramm eines Mischstandards mit OTC, TC und CTC. Dieser Standard wurde

frisch hergestellt und zeigt keinerlei Anzeichen des Vorhandenseins von Epimeren. Bei der Ermittlung der Elutionsreihenfolge durch die Injektion von Einzelstandards konnte auch der Anteil Tetracyclin im verwendeten Chlortetracyclin bestimmt werden; er lag zwischen 1,5 und 2 Prozent.

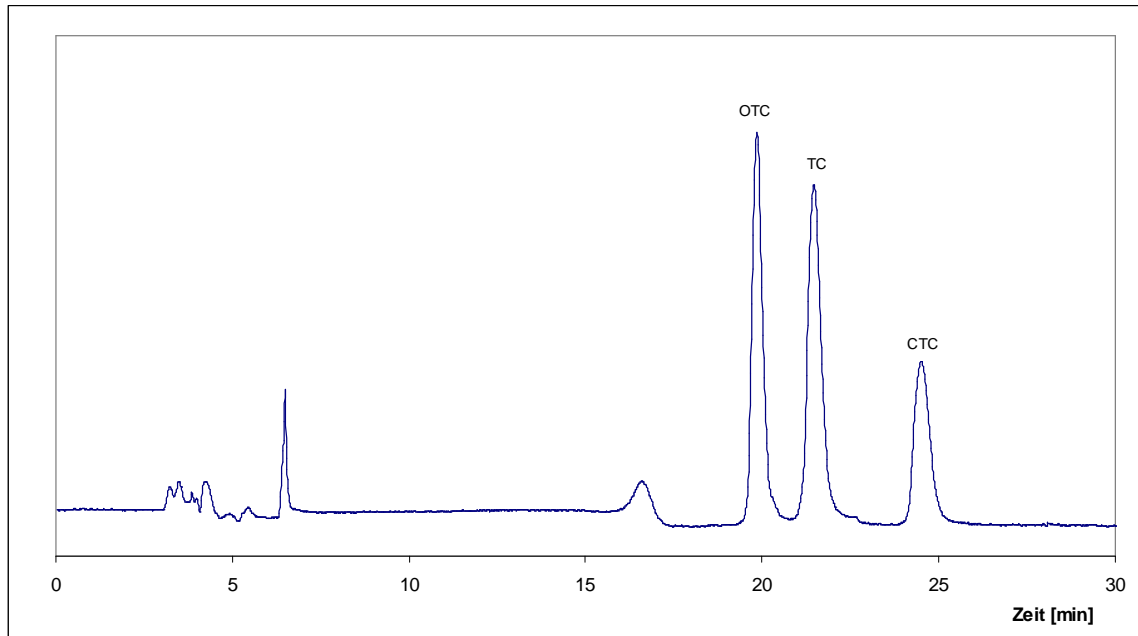


Abbildung 21 - Chromatogramm eines frischen Mischstandards aus OTC, TC und CTC (je 1 mg/L 0,01 mol/L Oxalsäure)

In Abbildung 22 ist ein Chromatogramm eines Mischstandards zu sehen. Dieser Mischstandard war zum Zeitpunkt der Chromatographie bereits drei Wochen alt und zeigt deutlich das Auftreten der Epimeren des Tetracyclins und des Chlortetracyclins. Eine Bestimmung des Epimers des Oxytetracyclins war bei dieser chromatographischen Trennung nicht möglich, da das epi-Oxytetracyclin mit dem Oxytetracyclin coeluiert. Für die Bestimmung der Tetracycline nach § 64 LFGB stellt dies kein Problem dar, da für die Festlegung der Verkehrsfähigkeit die Summe der Muttersubstanzen und der jeweiligen Epimere herangezogen wird.

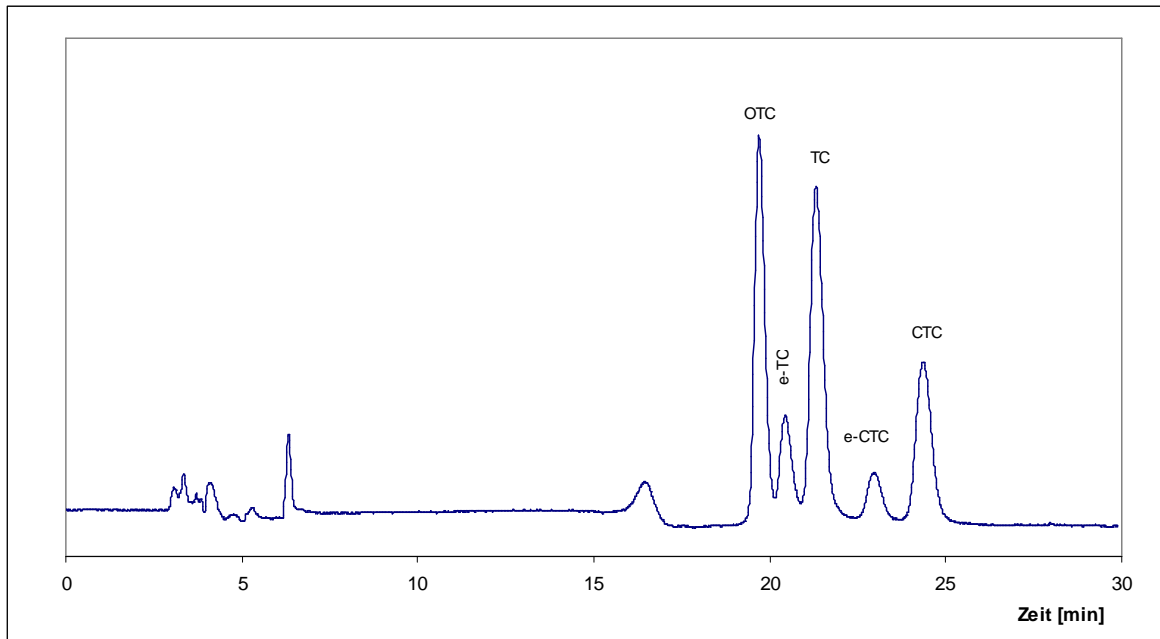


Abbildung 22 - Chromatogramm eines drei Wochen alten, bei 4 °C aufbewahrten Standardgemisches von OTC, TC und CTC (je 1 mg/L 0,01 mol/L Oxalsäure)

Die Aufarbeitung der rückstandsfreien Honige aus der Medikationsstudie führte zu Chromatogrammen wie in Abbildung 23 ersichtlich. In dem Bereich, in welchem die Analyten eluieren, ist eine von Störungen weitgehend freie Grundlinie zu sehen.

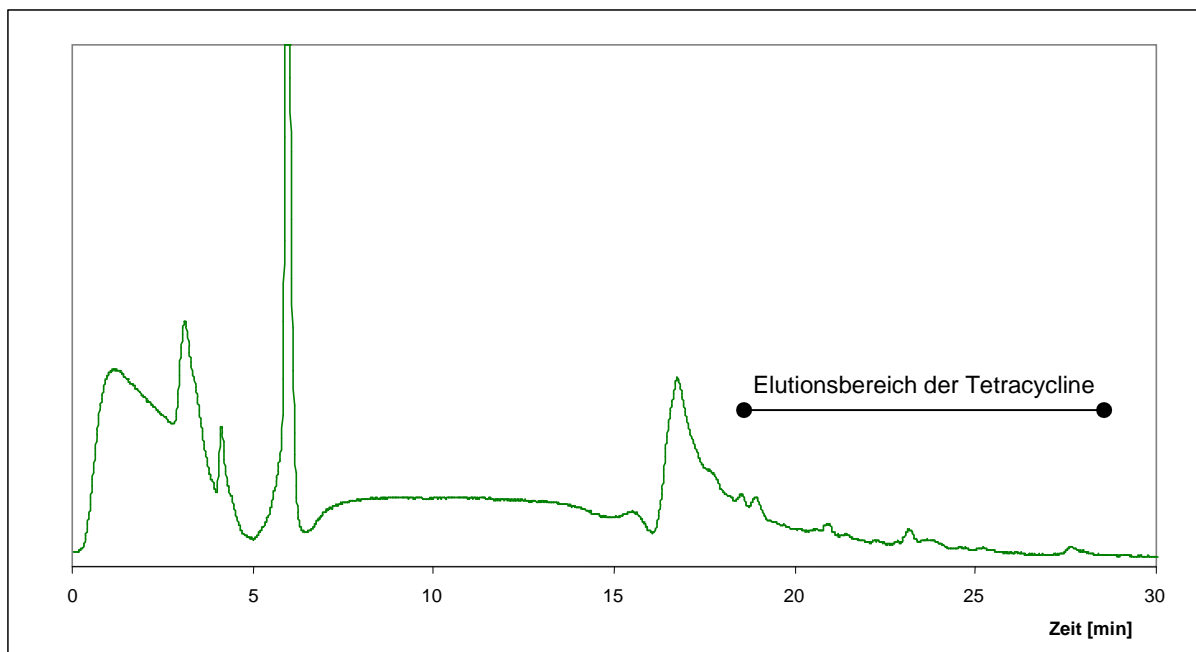


Abbildung 23 - Chromatogramm eines rückstandsfreien Honigs (Honig L3, siehe 2.4)

In Abbildung 24 ist ein Chromatogramm-Ausschnitt eines mit $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ dotierten Honigs (L3) dargestellt. Die Trennung der Muttersubstanzen TC und CTC von ihren jeweiligen Epimeren ist erfolgt, beim Oxytetracyclin liegt Coelution der Muttersubstanz und des Epimers vor.

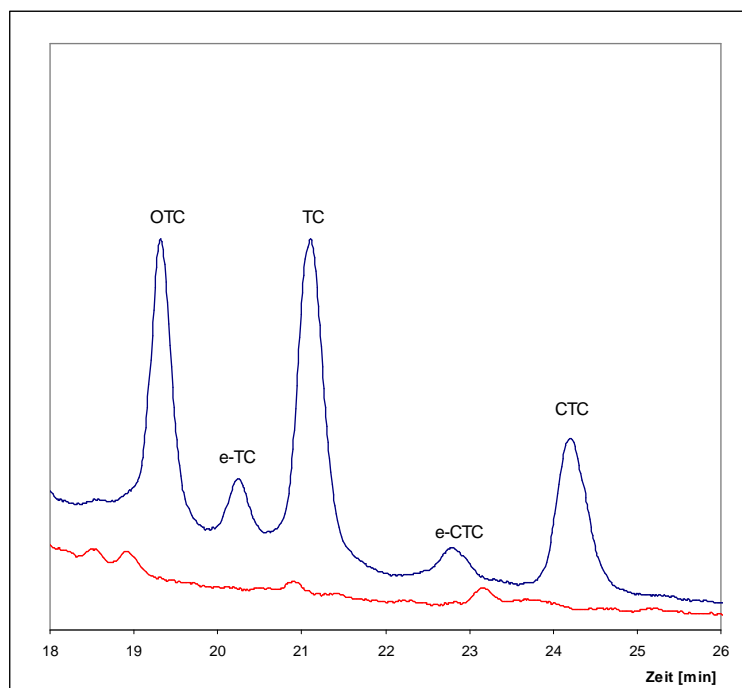


Abbildung 24 - Ausschnitt eines Chromatogramms von Honig L3 dotiert mit je $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ OTC, TC und CTC (oben) im Vergleich zu einem undotierten Honig (L3, unten)

Da es sich bei der hier verwendeten Methode um eine validierte Methode aus der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB handelt, konnte auf eine vollständige Validierung der Methode verzichtet werden. Es ist bei der Anwendung der Methode jedoch notwendig, sicherzustellen, dass die verwendete Methodik beherrscht und reproduzierbar angewendet wird. Zunächst wurde das chromatographische System auf seine Linearität geprüft. Dazu wurden wässrige, oxalsaure Standardlösungen ohne Probenaufarbeitung analysiert. Es zeigte sich eine gute Linearität der wässrigen Standards im Bereich von 10 bis $500 \mu\text{g}/\text{kg}$. Anschließend erfolgte eine Kalibrierung unter Verwendung dotierter Honige, welche die komplette Aufarbeitung erfuhren. Die Chromatogramme einer solchen Kalibrierung zeigt Abbildung 25:

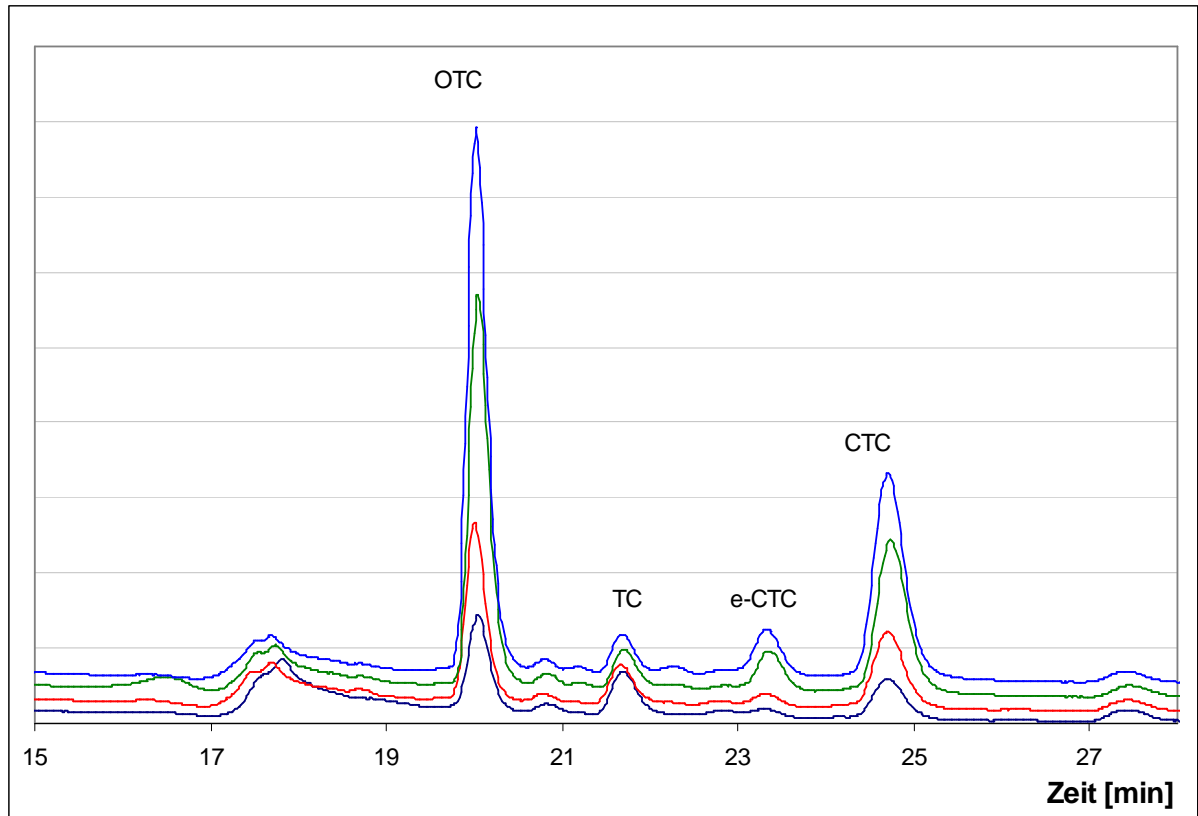


Abbildung 25 - Honig L3 dotiert mit je 100, 200, 300 bzw. 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTC und CTC und je 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TC

Aus den chromatographischen Flächendaten wurden mittels linearer Regression Kalibrierfunktionen aufgestellt. In Abbildung 26 sind die Funktionen für OTC und CTC (als Summe von Muttersubstanz und Epimer) dargestellt.

Zur Qualitätssicherung der Methode wurden neben der durchzuführenden Kalibrierung auch verdeckte Proben analysiert. Diese verdeckten Proben wurden von der Qualitätssicherungsbeauftragten des Faches Lebensmittelchemie der Bergischen Universität Wuppertal, Frau Dr. Müller-Seitz, hergestellt. Die Ergebnisse der Analysen dieser Proben zeigt Tabelle 5:

Probenbezeichnung	Gehalt, gemessen		Gehalt, dotiert		Wiederfindung	
	OTC	CTC	OTC	CTC	OTC	CTC
W	201,6	n.n.	200	-	101%	-
X	n.n.	154,5	-	150	-	103%
Y	53,1	20,1	50	50	106%	40%
Z	123,2	45,5	125	50	99%	91%

n.n. = Analyt nicht nachweisbar (kein Peak im Chromatogramm vorhanden).

Tabelle 5 - Wiederfindungen der zu Qualitätssicherungszwecken analysierten verdeckten Proben

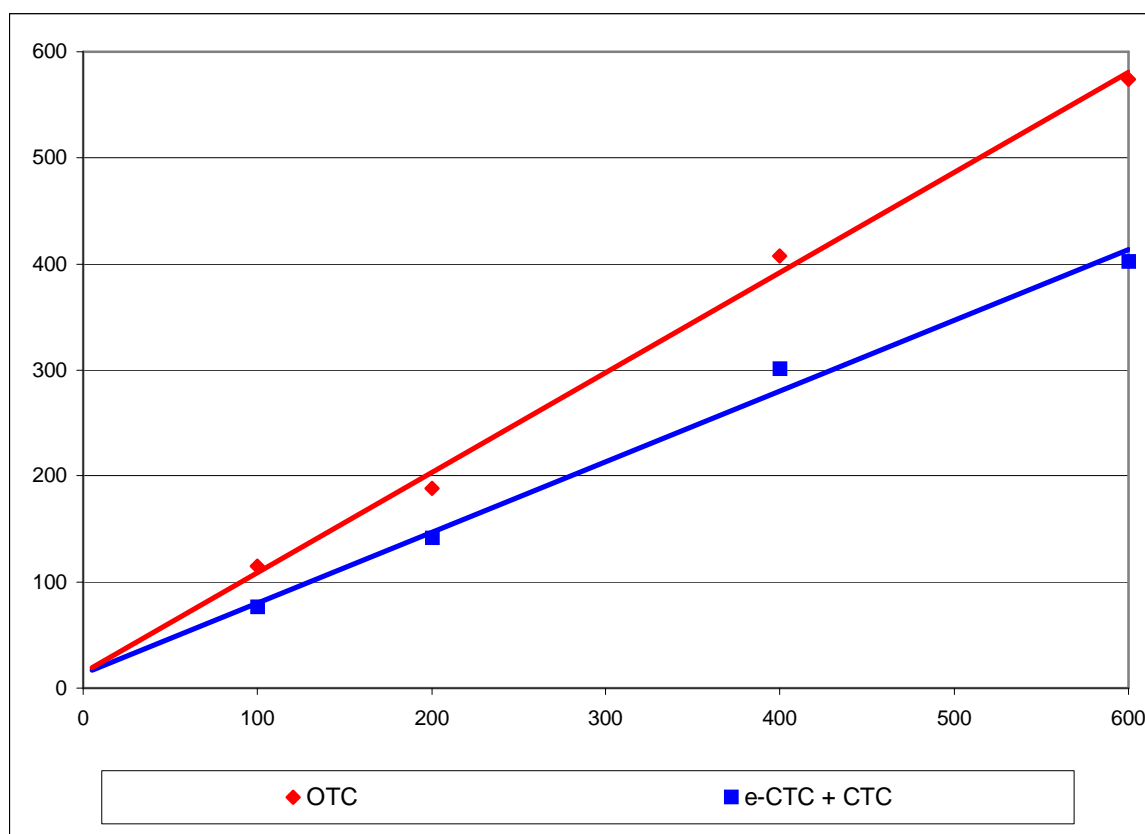


Abbildung 26 - Kalibrierfunktionen für OTC und CTC

Die in Tabelle 5 gezeigten Ergebnisse der untersuchten verdeckten Proben zeigt, dass das verwendete Verfahren beherrscht wird. Der Grund für die niedrige Wiederfindung der Probe Y konnte nicht geklärt werden; eine Wiederholung der Analyse dieser Probe be-

stätigte den in Tabelle 5 angegebenen Gehalt. Die Linearität ist, wie in Abbildung 26 zu sehen, in dem Konzentrationsbereich von 100 bis 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gegeben. Weitere Validierungsdaten wurden für diese Methodik nicht ermittelt, da es sich als amtliche Methode bereits um eine hinreichend validierte Methode handelt.

2.2 Radiorezeptortest (Charm[®] II)

Beim Charm[®]-Test handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen Rezeptortest, bei dem Test der Probe ein Antikörper (Rezeptorprotein) zugesetzt wird [CHARM und CHI, 1988]. Ist in der Probe ein entsprechendes Antibiotikum enthalten, wird dieses vom Antikörper gebunden. Da es sich bei dem Charm[®]-Test auf Tetracycline um einen kompetitiven Test handelt, wird zusätzlich mit Tritium (³H) markiertes Tetracyclin zugegeben. Dieses wird ebenfalls vom Rezeptormolekül gebunden und konkurriert während der Inkubationsphase mit dem in der Probe bereits vorhandenen Tetracyclin um die Bindungsstellen am Rezeptor. Je höher der Anteil des bereits in der Probe enthaltenen Tetracyclins, desto geringer ist der Anteil des am Antikörper gebundenen markierten Tetracyclins. Nach einer Zentrifugation werden die nicht gebundenen überschüssigen Tetracyclinmoleküle mit der überstehenden Lösung abgegossen und der Bodensatz mit Szintillationsflüssigkeit wieder aufgebrochen. Durch Messung der Szintillation kann nun der Anteil der gebundenen radioaktiv markierten Tetracycline bestimmt werden.

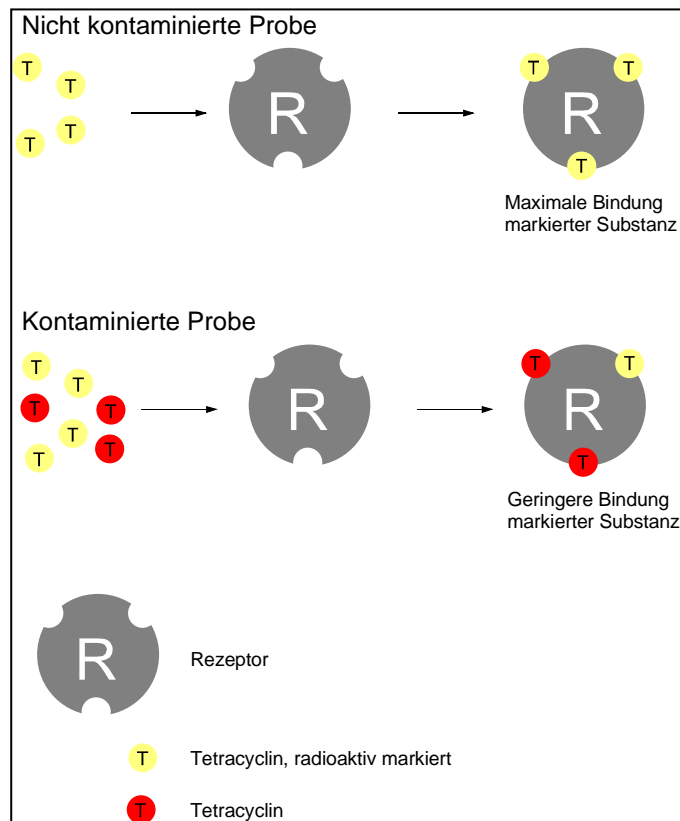


Abbildung 27 - Prinzip des Charm[®] II-Tests

Das in dem markierten Tetracyclin enthaltene Tritium (^3H) zerfällt unter Aussendung eines Elektrons zu ^3He (Beta-Zerfall). Dieses emittierte Elektron führt beim Auftreffen auf fluoreszierende Bestandteile der Szintillationslösung zu einem „Lichtblitz“. Dieser kommt dadurch zu Stande, dass durch Strahlung Atome auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Diese fallen wieder auf den Ursprungszustand zurück und geben dabei die aufgenommene Energie in Form eines Photons ab. Dieses emittierte Photon wird vom Szintillationszähler gemessen. Wie aus dem in Abbildung 27 schematisch dargestellten Messprinzip hervorgeht, führt eine Probe ohne Rückstände zu einem hohen Messwert (cpm = counts per minute), eine Probe mit einem Gehalt an Tetracyclinen hingegen zu einem niedrigeren Messwert.

Durchführung

Der Charm[®] II-Test wurde entsprechend der dem Test-Kit beiliegenden Arbeitsvorschrift durchgeführt [Manual CHARM II Analysis]. Der Arbeitsablauf lässt sich in zwei Teile trennen, die Probenvorbereitung und die eigentliche Messung. In Abbildung 28 ist der Ablauf der Vorbereitung als Fließdiagramm schematisch dargestellt.

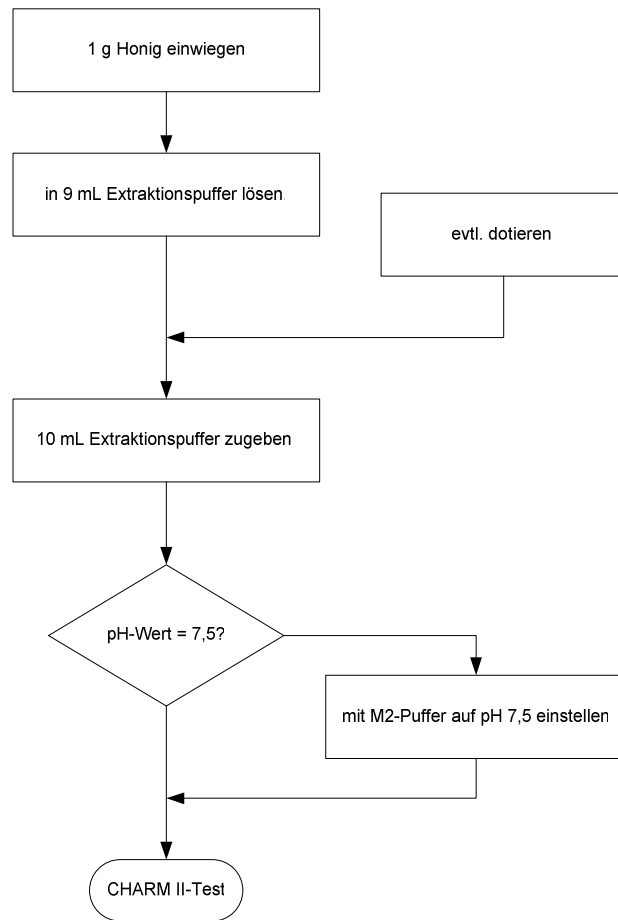


Abbildung 28 - Ablauf der Original-Probenvorbereitung zum Charm® II-Test

Im Zuge der weiteren Arbeiten wurden Honige verwendet, die, da diese auch bei anderen Verfahren verwendet werden sollten, bereits dotiert eingewogen worden waren. Aus diesem Grunde konnte auf die Möglichkeit, die Honige während der Probenvorbereitung zu dotieren, verzichtet werden. Zusätzlich haben alle Vorversuche gezeigt, dass eine weitere Einstellung des pH-Wertes bei Honigen nicht notwendig war, da offensichtlich die Pufferkapazität der zugegebenen 9 mL Extraktionspuffer für die nur schwach sauren Honige ausreichte. Demzufolge wurde die Aufarbeitung derart verkürzt, wie es in Abbildung 29 dargestellt ist. Auch mit allen untersuchten Honigproben wurde derart verfahren.

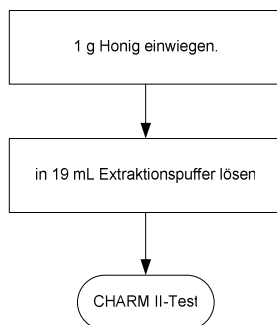


Abbildung 29 - Verkürzte Probenvorbereitung zum Charm[®] II-Test

Diese vorbereiteten Probenlösungen wurden gemäß dem in Abbildung 30 gezeigten Schema behandelt und gemessen:

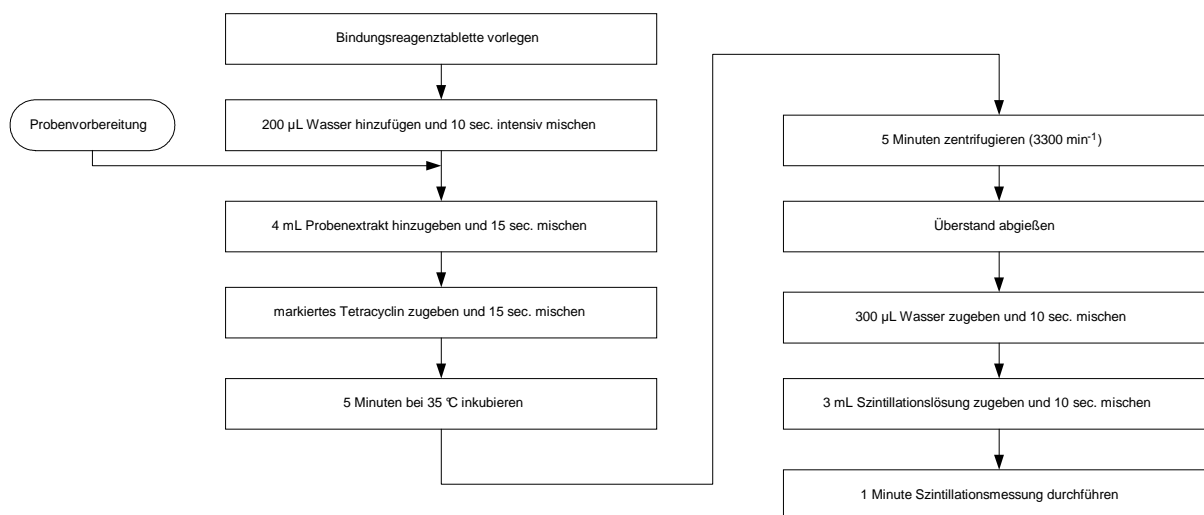


Abbildung 30 - Ablauf der Durchführung des Charm[®] II-Tests

Zunächst war es erforderlich, der Messbereich des Charm[®] II-Tests zu ermitteln. Dazu wurde rückstandsfreier Honig mit Tetracyclinen dotiert und per Charm[®] II-Test gemessen. Dabei zeigten sich starke Schwankungen der Messergebnisse. Wurden die präparierten Messlösungen nach einigen Minuten erneut gemessen, zeigten sich höhere Zählraten als bei der vorherigen Messung derselben Lösung. Laut Arbeitsvorschrift [Manual CHARM II Analysis] sollen die Szintillationslösungen unverzüglich nach der Herstellung im Szintillationsmessgerät vermessen werden. Da jedoch zur Erhöhung des Durchsatzes immer sechs bis acht Proben parallel aufgearbeitet wurden, lag zwischen der Messung der ersten Lösung und der letzten ein Zeitraum von sechs bis acht Minuten. Aufgrund dieser offensichtlichen Abhängigkeit vom Messzeitpunkt nach der Zugabe der Szintillationslösung wurde die Zeitabhängigkeit bestimmt. Dazu wurden im Zeitraum von 0 Minuten (erste

Messung) bis 173 Minuten 13 Messungen eines aufgearbeiteten rückstandsfreien Honigs sowie eines dotierten Honigs mit einem Gehalt von 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Tetracyclin durchgeführt.

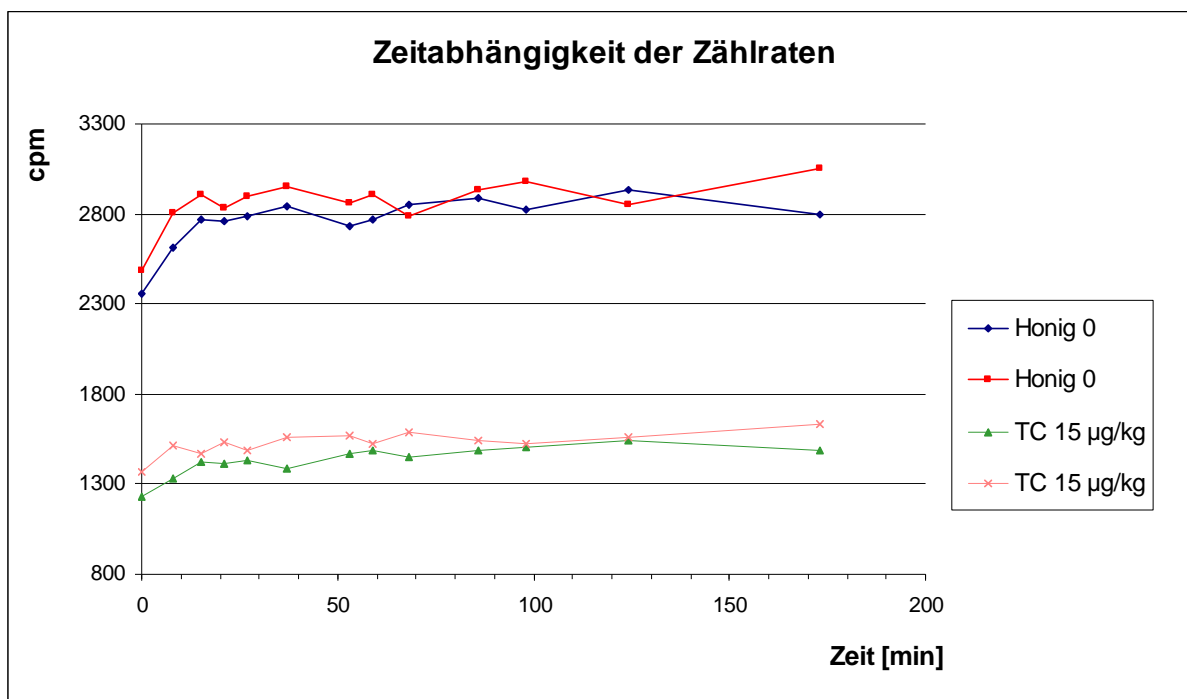


Abbildung 31 - Zeitabhängigkeit der Zählraten des Charm[®] II-Tests

Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, stieg die Zählrate (cpm) innerhalb der ersten 15 Minuten an, und blieb dann über den restlichen betrachteten Zeitraum konstant. Dieser Anstieg war bei einem rückstandsfreien Honig (Honig 0) und bei einem dotierten Honig (TC 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in gleicher Weise zu beobachten. Daher wurde bei den weiteren Untersuchungen zwischen der Zugabe der Szintillationslösung und der eigentlichen Szintillationsmessung eine Zeitspanne von 30 Minuten eingehalten. Weiterhin zeigte sich, dass die hergestellten Messlösungen über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten, ohne dass sich die Zählrate wesentlich änderte.

Zur Bestimmung des Messbereiches des Charm[®] II-Tests wurde rückstandsfreier Honig mit Tetracyclinen im Bereich von 10 bis 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dotiert und die Zählraten bestimmt.

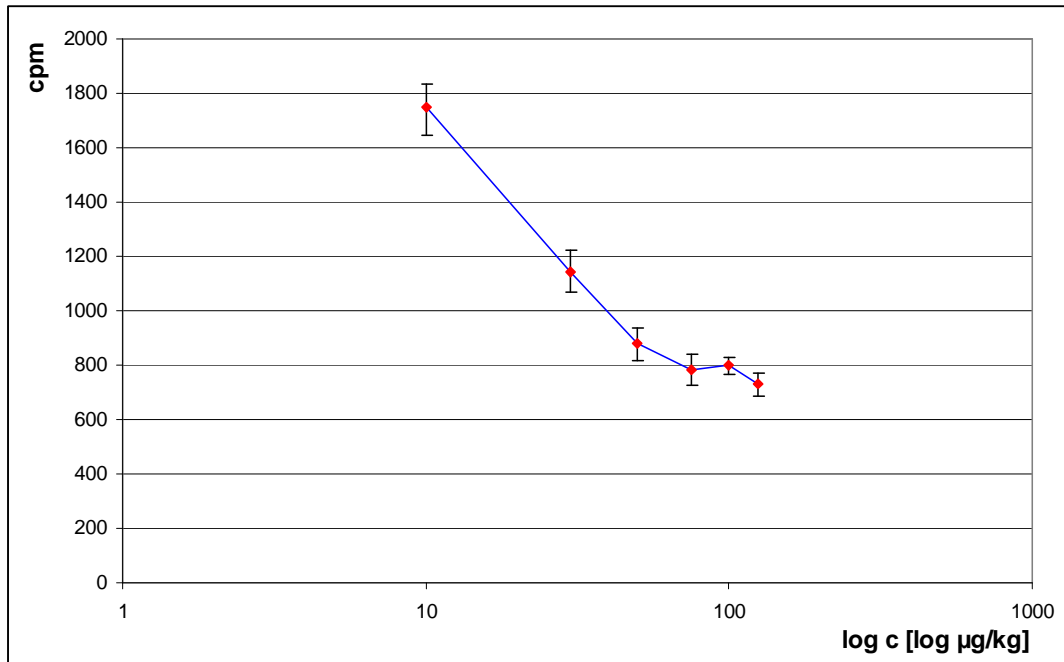


Abbildung 32 - Bestimmung des Messbereichs für Tetracyclin für den Charm[®] II-Test

In Abbildung 32 sind die Zählraten für Tetracyclin gegen die logarithmisch skalierten Konzentrationen aufgetragen. Der für eine semiquantitative Auswertung benötigte lineare Bereich erstreckt sich über einen Konzentrationsbereich von 10 bis 50 µg/kg, über den je eine Kalibrierung mit den drei Tetracyclinen durchgeführt wurde. Die Ergebnisse für Tetracyclin zeigt Abbildung 33.

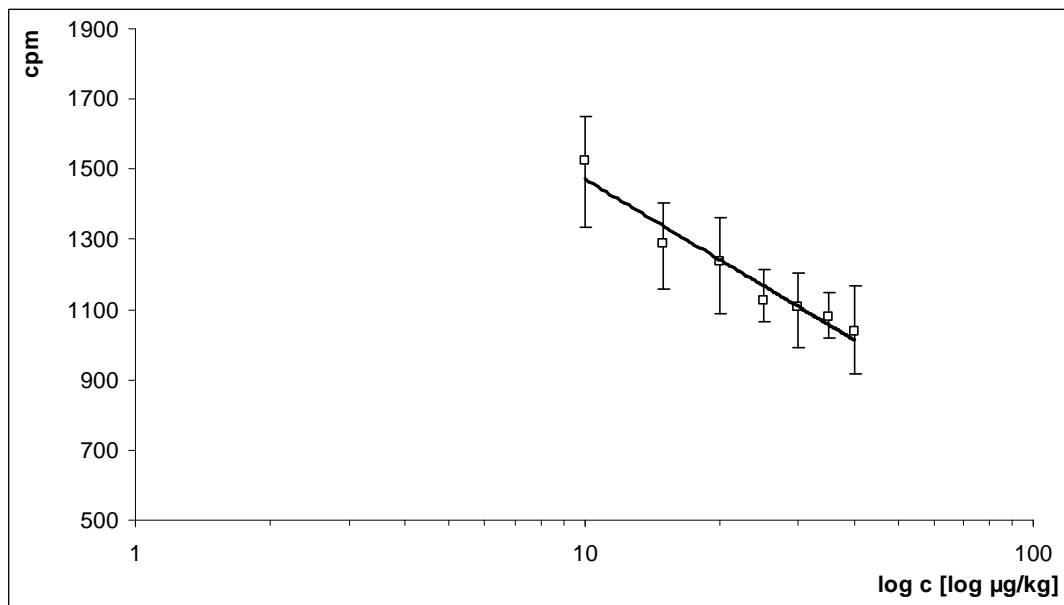


Abbildung 33 - Kalibriergerade mit Tetracyclin für den Charm[®] II

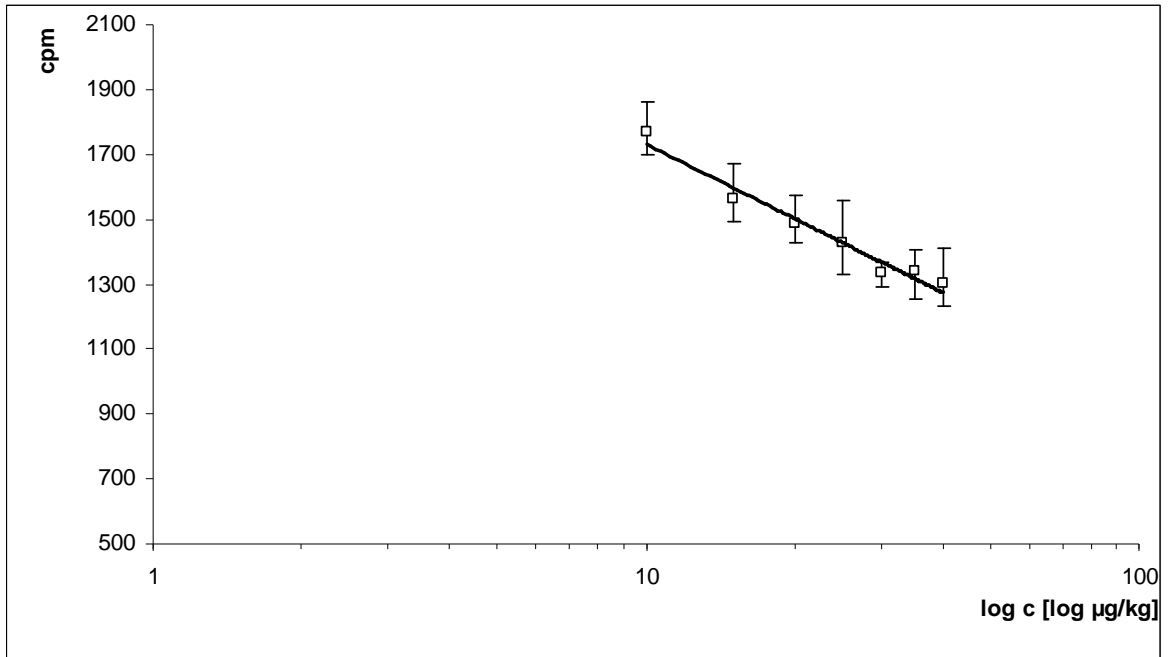


Abbildung 34 - Kalibriergerade mit Chlortetracyclin für den Charm® II

In Abbildung 34 und Abbildung 35 sind die entsprechenden Kalibriergeraden für Chlortetracyclin und Oxytetracyclin dargestellt.

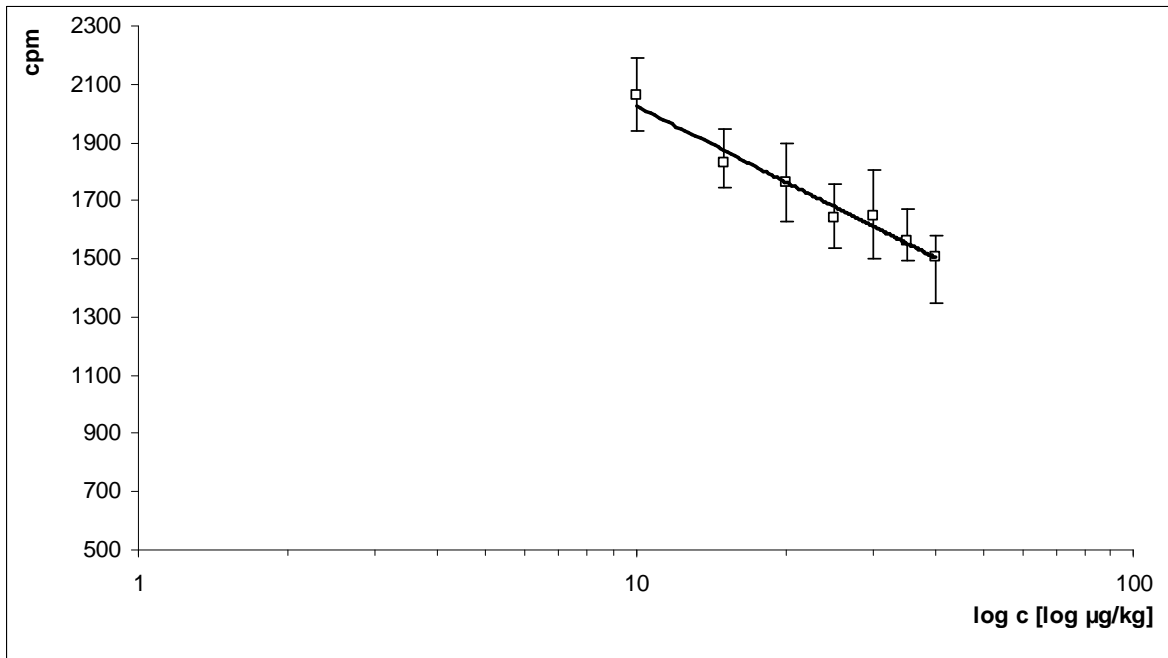


Abbildung 35 - Kalibriergerade mit Oxytetracyclin für den Charm® II

Die Qualitätskenndaten für den Charm[®] II-Test:

	TC	CTC	OTC
Anzahl Kalibrierpunkte	82	58	49
Korrelationskoeffizient	0,9514	0,9712	0,9447
Verfahrensvariationskoeffizient	6,4 %	4,7 %	4,8 %
Nachweisgrenze	8 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	16 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Tabelle 6- Qualitätskenndaten für den Charm[®]-Test für TC, OTC und CTC

Laut Angaben des Herstellers (Charm Science) beträgt die Nachweisgrenze für Chlortetracyclin und Oxytetracyclin 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und für Tetracyclin 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Die in Tabelle 6 angegebenen Nachweisgrenzen wurden empirisch über die relative Extinktion von 80 % abgeschätzt und sind für ein Screening von Honigen auf Tetracyclinrückstände gerade ausreichend. Leider ist die bestimmte Empfindlichkeit gerade für das in der Bienenhaltung eingesetzte Oxytetracyclin am geringsten.

2.3 Enzymimmunoassay

Für die Analytik von Tetracyclinen in Honig fanden bereits mehrfach immunchemische Testsysteme Anwendung. Ein für die Rückstandsuntersuchung in Serum und Gewebesaft von Schlachttieren entwickelter ELISA [UNGLAUB und MÄRTLBAUER, 1995] zeigte seine Anwendbarkeit auch für die Untersuchungen von Honigen [UNGLAUB et al., 1995]. Mittlerweile sind kommerziell erhältliche ELISA-Tests entwickelt worden.

Bei diesem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) werden zwei Typen von Antikörpern verwendet. Die Böden der Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit einem Tetracyclin-Protein-Konjugat beschichtet (Abbildung 36). Die vorbereitete Probe sowie anti-Tetracyclin-Antikörper werden zugegeben (Nr. 2), wobei die Tetracyclinmoleküle aus der Probe mit den immobilisierten Tetracyclin-Protein-Konjugat um die Bindungsstellen konkurrieren. (Nr. 3). Nach einem Waschschritt zum Entfernen der nicht gebundenen Antikörper wird ein enzymmarkierter Sekundär-Antikörper zugegeben (Nr. 4). Dieser bindet sich an den immobilisierten Antikörpern und setzt das anschließend zugesetzte farblose Chromogen zu einer gefärbten Substanz um (Nr. 5).

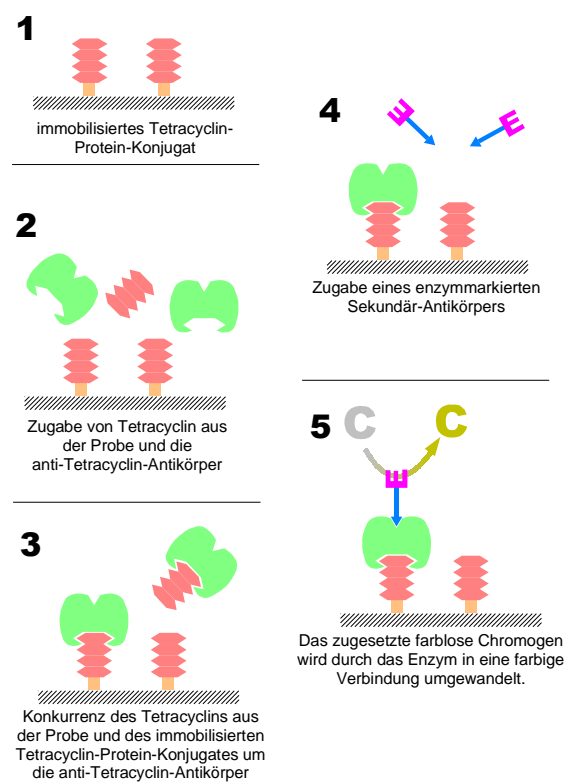


Abbildung 36 - Prinzip des verwendeten kompetitiven ELISA

Vorteilhaft ist bei dieser Art des Immunoassay die Tatsache, dass das stöchiometrisch gebundene Enzym in der Lage ist, eine große Zahl Chromogenmoleküle umzusetzen. Dadurch erhöht sich die Empfindlichkeit deutlich. Allerdings ist es notwendig, diese Reaktion nach einer bestimmten Zeit zu stoppen und diese Zeiten immer exakt einzuhalten.

Die Probenaufarbeitung beschränkt sich auf das Lösen und Verdünnen der Honige [UNGLAUB et al., 1995]. Die dabei ermittelten Nachweisgrenzen von 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Tetracyclin und Chlortetracyclin ist für die Überprüfung auf verbotene Anwendung ausreichend, während die Nachweisgrenze für Oxytetracyclin aufgrund der Kreuzreaktivität von nur 3 bis 4% mit 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dafür nicht ausreichend ist. Eine Steigerung der Empfindlichkeit des ELISA für Oxytetracyclin durch eine veränderte Aufarbeitung ist möglich [MASCHER et al., 1996]. Bei zwei der getesteten Aufarbeitungen (einfaches Verdünnen bzw. Festphasenextraktion an einer C_{18} -Umkehrphase) war nur eine qualitative Bestimmung des Oxytetracyclins möglich, während bei Einsatz einer zweistufigen Festphasenextraktion über eine C_{18} -Umkehrphase gefolgt von einer Diol-Phase eine quantitative Bestimmung möglich war. Damit konnte eine Nachweisgrenze von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Oxytetracyclin erreicht werden. Allerdings ist der Aufwand einer solchen zweistufigen Festphasenextraktion sehr hoch, und die erhaltenen, sehr sauberen Probenextrakte können auch problemlos für die Bestimmung mit der HPLC Verwendung finden. Unter dem Gesichtspunkt der Zeiteinsparung, welche bei einem Screening-Verfahren zwangsläufig im Vordergrund steht, kann dieses Verfahren demnach nicht überzeugen. Eine andere Aufarbeitung, basierend auf einer Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Essigsäureethylester, erreichte eine Nachweisgrenze von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Tetracyclin und Chlortetracyclin in Honig [HEERING et al., 1998]. Eine Bestimmung der Nachweisgrenze für Oxytetracyclin wurde nicht durchgeführt, mit der angegebenen Kreuzreaktivität von 4% für Oxytetracyclin wurde eine Nachweisgrenze oberhalb von 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ erwartet. Die Arbeitsvorschrift für den kommerziell erhältlichen RIDASCREEN[®] Tetracyclin-ELISA (Hersteller: r-Biopharm) gibt für das Oxytetracyclin eine Kreuzreaktivität von ca. 10% und eine Nachweisgrenze von 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ an. Somit ist auch dieser Test nur bedingt für die Bestimmung von Oxytetracyclin-Rückständen in Honig geeignet. Derzeit gibt es keinen kommerziellen ELISA mit einer für Oxytetracyclin höheren Spezifität.

2.3.1.1 Durchführung

Bei der Durchführung des ELISA wurde exakt nach der zum Test-Kit (RIDASCREEN[®]) gehörenden, vom Hersteller angegebenen Durchführungsvorschrift gearbeitet. Lediglich die Honige mussten z.T. weiter verdünnt werden, damit sich ein Messsignal im Bereich der Standardkurve ergab.

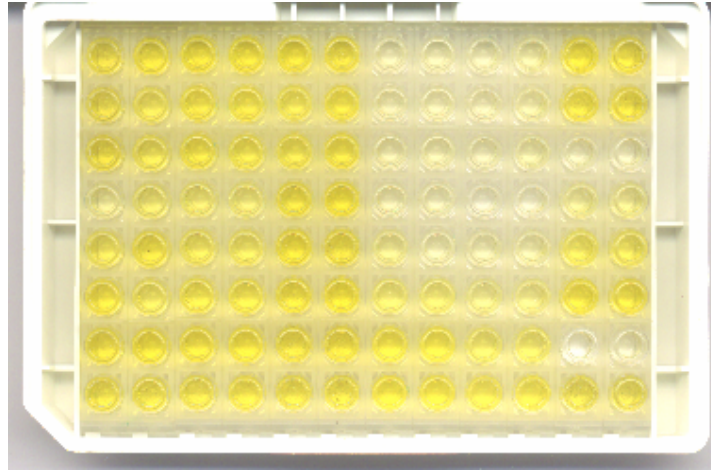


Abbildung 37 - Beispiel einer ELISA-Platte zum Screening von Tetracyclinen in Honig

2.3.1.2 Auswertung

Der Tetracyclin-Gehalt einer aufgearbeiteten Probe kann aus einer Standardkurve direkt abgelesen werden. Die Standardkurve wird durch Auftragen der relativen Extinktion der Standard-Lösungen auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Tetracyclin-Konzentration ermittelt. Für die Berechnung der relativen Extinktion werden die gemessenen Extinktionen gemittelt, und als Prozent des als Hundert Prozent gesetzten Nullstandards angegeben:

$$\frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}}}{\text{Extinktion}_{\text{Null}}} \cdot 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Schließlich ist noch die Probenverdünnung zu berücksichtigen.

Die Standardkurve zeigt einen leichten sigmoiden Verlauf und ist über einen Konzentrationsbereich von 800 ng/L bis 200 ng/L (entsprechend 30 – 70 % relative Extinktion) annähernd linear.

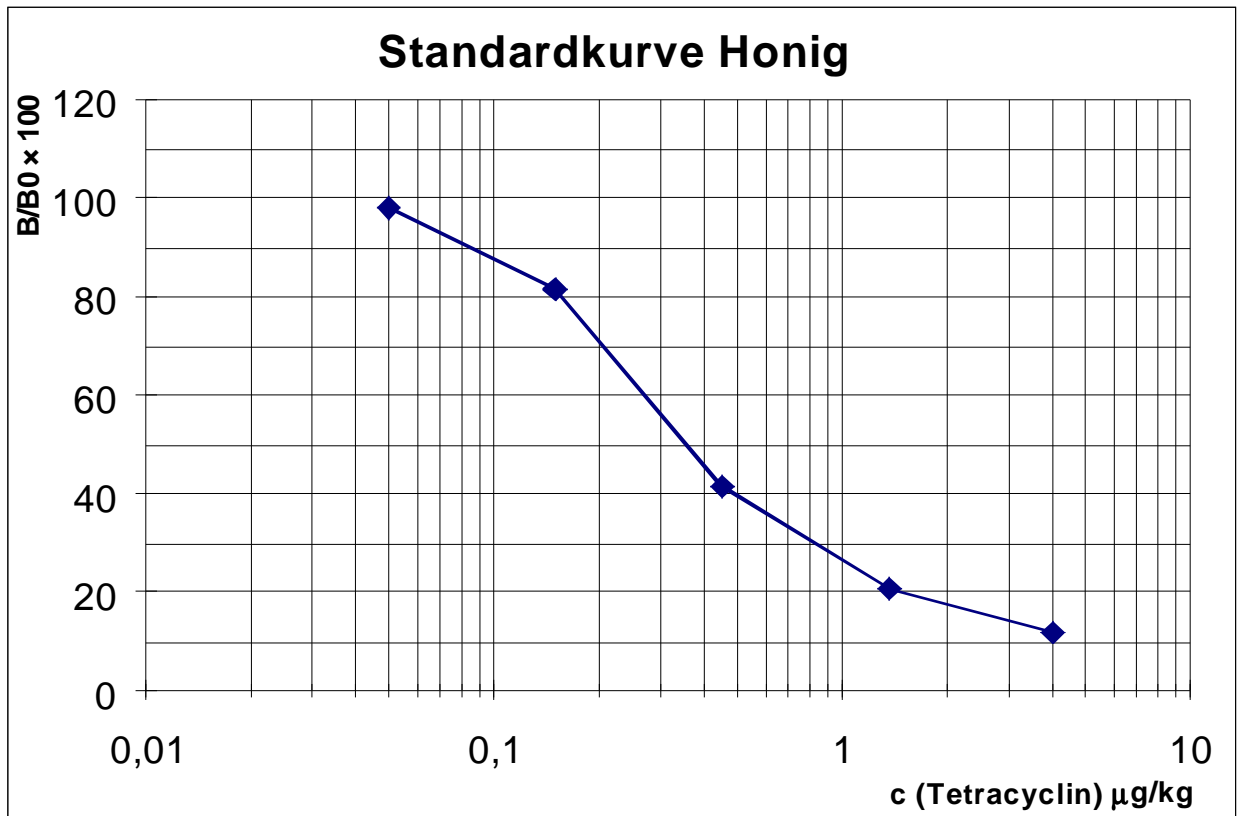


Abbildung 38 - Kalibrierfunktion für Tetracyclin in Honig mittels ELISA

Laut der zum Test-Kit gehörenden Beschreibung ist die Spezifität des ELISA, ausgedrückt über die Kreuzreaktivität, 100% für das Chlortetracyclin und 10% für das Oxytetracyclin bezogen auf Tetracyclin. Zu den Epimeren und dem Isochlortetracyclin gibt es keine Angaben in der Literatur. Daher wurde die Kreuzreaktivität des ELISA neben Chlortetracyclin, Tetracyclin und Oxytetracyclin auch für epi-Chlortetracyclin, epi-Tetracyclin und epi-Oxytetracyclin sowie Isochlortetracyclin bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der ELISA auf das Isochlortetracyclin nicht anspricht. Vermutlich kann das Isochlortetracyclin aus sterischen Gründen nicht an den Antikörper binden. Die Moleküle von Chlortetracyclin und epi-Chlortetracyclin weisen in ihrer räumlichen Struktur noch deutlich erkennbare Ähnlichkeiten aus (Abbildung 39 und Abbildung 40).

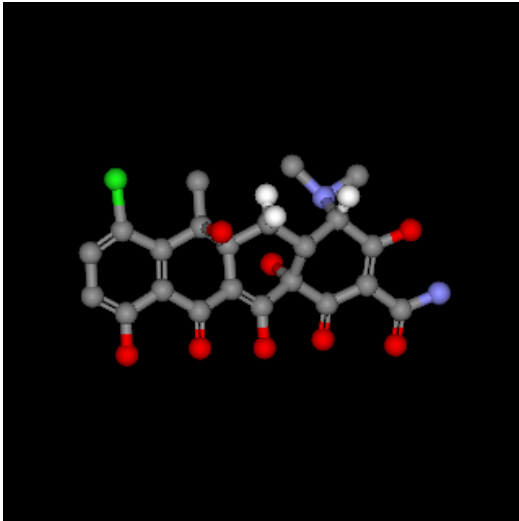


Abbildung 39 - Räumliche Darstellung des Chlorotetracyclin-Moleküls

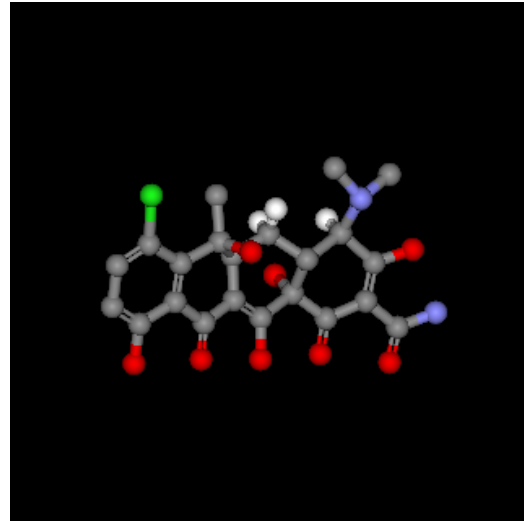


Abbildung 40 - Räumliche Darstellung des epi-Chlorotetracyclin-Moleküls

Dagegen ist, wie Abbildung 41 zeigt, die räumliche Struktur des Isochlorotetracyclins deutlich verändert. Es ist davon auszugehen, dass diese abweichende äußere Struktur des Moleküls nicht mehr am Antikörper binden kann, da in diesem Fall der „Schlüssel“ nicht in das „Schloss“ passt, also das für die Bindung notwendige Strukturelement des Moleküls nicht in der Bindungstasche des Antiköpers gebunden werden kann.

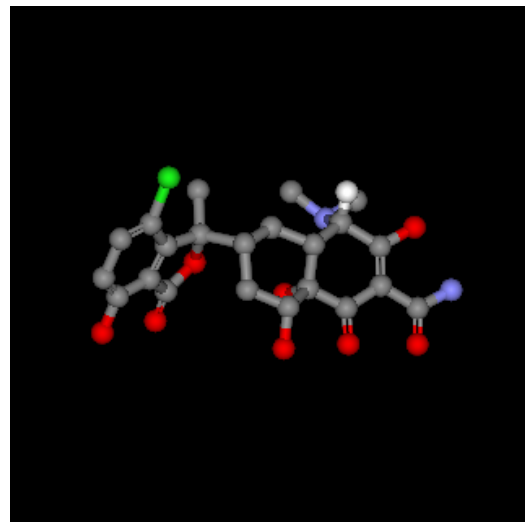


Abbildung 41 - Räumliche Darstellung des Isochlorotetracyclin-Moleküls

Die Ergebnisse des ELISA-Tests zeigen für das Isochlortetracyclin relative Extinktionen im Bereich wie sie auch für den Nullstandard gemessen werden (Abbildung 42).

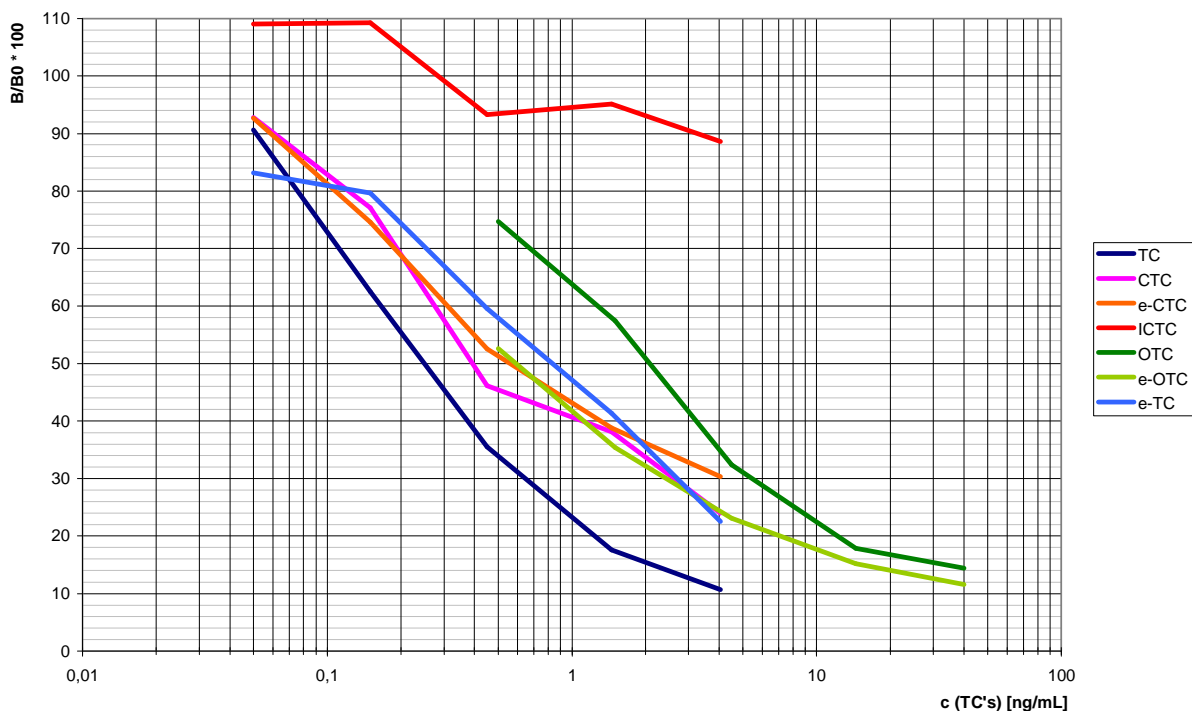


Abbildung 42 - ELISA-Kalibrierkurven für alle untersuchten Tetracycline

Die über die Kreuzreaktivitäten ausgedrückten unterschiedlichen Selektivitäten des ELISA stellen sich tabellarisch wie folgt dar:

Substanz	Spezifität	
	angegeben	gemessen
Tetracyclin	100%	100%
Chlortetracyclin	ca. 100%	63%
Oxytetracyclin	ca. 10%	13%
epi-Tetracyclin	keine Angabe	29%
epi-Chlortetracyclin	keine Angabe	45%
epi-Oxytetracyclin	keine Angabe	42%
Isochlortetracyclin	keine Angabe	0%

Tabelle 7 - Spezifität des ELISA für verschiedene Tetracycline

Die in Tabelle 7 zusammengestellten Spezifitäten für den verwendeten ELISA wurden bei relativen Extinktion von 50% ermittelt. In diesem Bereich hat die jeweilige Kalibrierfunktion die höchste Genauigkeit, da hier die Steigung am größten ist. Wie zu erkennen, lag die ermittelte Spezifität von 13% für Oxytetracyclin in der Größenordnung, wie sie vom Hersteller mit 10% angegeben worden ist. Allerdings konnte die angegebene Spezifität von 100% für Chlortetracyclin nicht bestätigt werden, sie lag im Versuch um ca. ein Drittel niedriger. Für die Epimere der Tetracycline ergab sich jeweils eine niedrigere Spezifität im Vergleich zur Muttersubstanz. Aus diesen Daten ermittelten sich die Nachweisgrenzen für die einzelnen Tetracycline in Honig wie folgt:

Substanz	Nachweisgrenze
Tetracyclin	15 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Chlortetracyclin	23 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Oxytetracyclin	115 $\mu\text{g}/\text{kg}$
epi-Tetracyclin	51 $\mu\text{g}/\text{kg}$
epi-Chlortetracyclin	33 $\mu\text{g}/\text{kg}$
epi-Oxytetracyclin	38 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Tabelle 8 - Nachweisgrenzen des ELISA für verschiedene Tetracycline

Für ein Screening von Honigen auf Tetracyclinrückstände sind diese Nachweisgrenzen nur für Tetracyclin und Chlortetracyclin ausreichend. Für ein Screening von Oxytetracyclin in Honigen ist die hohe Nachweisgrenze von 115 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nicht ausreichend.

2.4 Medikationsstudie

Die Ergebnisse von Honiguntersuchungen (z.B. NRKP [BVL NRKP, 2007]) zeigen, dass in im Handel befindlichen Honigen Rückstände von Tetracyclinen gefunden werden. Um diese Befunde in ihrer Höhe einzuordnen wurde eine Rückstandsstudie unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Dadurch sollte ermittelt werden, wie hoch die Rückstandsgehalte nach Applikation der Tetracycline bei der üblichen Bienenhaltung und der anschließenden Honigernte unter normalen Bedingungen sind.

2.4.1 Durchführung

In einer Kooperation mit dem Institut für Biologie, Abteilung Neurobiologie, der Freien Universität Berlin (Frau Dr. Rademacher) wurden je fünf Bienenvölker mit Oxytetracyclin und weitere fünf Völker mit Chlortetracyclin behandelt. Zur Kontrolle wurden die Honige zweier unbehandelter Bienenvölker in unmittelbarer Nachbarschaft und dreier unbehandelter Bienenvölker in einem Abstand von ca. 10 km vom Behandlungsort geerntet und untersucht.

Die Wahl der Wirkstoffe Oxytetracyclin und Chlortetracyclin erfolgte aus folgenden Gründen:

- Oxytetracyclin (Terramycin[®]) wird in weiten Teilen der USA und Kanadas zur vorbeugenden Behandlung gegen die Amerikanische Faulbrut eingesetzt. Von Interesse war, in welchem Umfang durch eine Behandlung mit Oxytetracyclin während der Tracht Rückstände von Oxytetracyclin in den Honig gelangen können.
- Beim Chlortetracyclin interessierten insbesondere eventuell auftretende Metaboliten, wie der Umfang der Epimerisierung und das Auftreten von Isochlortetracyclin, welches von Zurhelle [ZURHELLE et al., 2000b] und Kennedy [KENNEDY et al., 1998b] als Hauptmetabolit in Eiern nach der Verabreichung an Legehennen ermittelt wurde.

Versuchsplanung

Die zur Verfügung stehenden fünfzehn Bienenvölker wurden in vier Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe, bestehend aus 5 Bienenvölkern, wurde mit Chlortetracyclin (C1-C5), eine weitere, ebenfalls aus 5 Bienenvölkern bestehende, mit Oxytetracyclin (O1-O5) behandelt. Diese Bienenvölker standen zusammen mit einer weiteren Gruppe aus zwei Bienenvölkern, welche keine Wirkstoffe erhielten (K1-K2), am selben Standort. Zur Kontrolle wurden drei zusätzliche Bienenvölker an einen weiteren ca. 10 km vom Behandlungsstandort entfernten Standort gebracht und blieben ebenfalls unbehandelt (L1-L3). Die Völkerführung der Versuchs- und Kontrollvölker auf dem Versuchsstand wich von der üblichen imkerlichen Praxis insofern ab, als die Bienenvölker in ihrem Bienen- und Wabenbestand nicht verändert wurden, um keine vom Versuchsplan abweichenden Bedingungen hinsichtlich der applizierten Dosis bzw. des eingetragenen Sammelgutes zu schaffen.

Bienenvolk	Wirkstoff	Standort
C1-C5	Chlortetracyclin	Behandlungsstandort
O1-O5	Oxytetracyclin	Behandlungsstandort
K1-K2	-	Behandlungsstandort
L1-L3	-	entfernter Standort



Abbildung 43 - Bild des Standortes und der Aufstellung der Bienenvölker

Die Bienenvölker C1-C5 und O1-O5 wurden gemäß Versuchsplan dreimal im Abstand von sieben Tagen behandelt. Je Behandlung wurden 200 mg Wirkstoff pro Volk eingesetzt. Dieses Vorgehen ist vergleichbar mit einer anderen Medikationsstudie, die von Unglaub durchgeführt wurde [UNGLAUB et al., 1995].

Um Probleme durch Inhomogenitäten zu vermeiden, wurde für jede Einzelbehandlung ein eigenes Gemisch aus Puderzucker mit 200 mg Wirkstoff hergestellt und komplett verwendet (insgesamt 30 Gemische). Zur gleichmäßigen Verteilung der 200 mg Wirkstoff in 30 g Puderzucker wurde der genau abgewogene Wirkstoff entsprechend pharmazeutischer Praxis erst mit wenig und dann mit wachsenden Anteilen Puderzucker hochgemischt. Diese Mischungen wurden vor Feuchtigkeitseinfluss und Sonnenlicht geschützt aufbewahrt und den Bienenvölkern in der Weise verabreicht, dass die Mischung vollständig mit einem Spatel auf die Rähmchenoberträger aufgebracht wurde.



Abbildung 44 - Aufbringung der Medikationsmischung auf die Rähmchenoberträger

Innerhalb eines Tages hatten die Bienen die Puderzucker-Wirkstoffmischung verzehrt. Die Kontroll-Bienenvölker K1-K2 erhielten dieselbe Menge Puderzucker ohne Wirkstoff. Den Kontrollvölkern L1-L3 wurde dagegen kein Puderzucker verabreicht, da nur Teile der Honigernte für den Versuch genutzt wurden und der Hauptanteil als Lebensmittel in den Verkehr gebracht werden sollte und die Fütterung mit Zucker für Handelshonige nach dem Lebensmittelrecht unzulässig ist..

Applikation

Die Applikation der Wirkstoffe begann nach Abschluss und Entnahme der Frühjahrstracht am 13. Juni 2001. Das Datum des jeweiligen Anwendungstages wurde während des Anwendungszeitraumes in dem Medikationsplan (Tabelle 9) eingetragen.

Datum*	Tag	Volk														
		C1	C2	C3	C4	C5	K1	K2	L1	L2	L3	O1	O2	O3	O4	O5
13.06.2001	1: Medikation	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	P	P	-	-	-	OTC	OTC	OTC	OTC	OTC
14.06.2001	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.06.2001	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.06.2001	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.06.2001	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.06.2001	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.06.2001	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20.06.2001	8: Medikation	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	P	P	-	-	-	OTC	OTC	OTC	OTC	OTC
21.06.2001	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22.06.2001	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23.06.2001	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24.06.2001	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25.06.2001	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26.06.2001	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27.06.2001	15: Medikation	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	P	P	-	-	-	OTC	OTC	OTC	OTC	OTC

CTC : Chlortetracyclin OTC : Oxytetracyclin - : keine Behandlung P : Puderzucker ohne Wirkstoff

Tabelle 9 - Medikationsplan

Ernte

Zur Ernte kam der Honig aus der Sommertracht, überwiegend Lindenhonig. Aufgrund des nasskalten Wetters während des Versuchszeitraumes und der damit verbundenen langsameren Reifung des Honigs und der schleppenden Verdeckelung der Honigwaben durch die Bienen konnte die Ernte erst am 30. August 2001 beginnen. Die Erntemengen blieben bedingt durch das schlechte Wetter hinter den Erwartungen zurück (Tabelle 10): zum einen konnten die Bienen weniger eintragen, zum anderen wurde das bereits eingetragene Sammelgut anteilig von den Bienen in größerem Maße verzehrt. Von einem Volk (C2) konnte überhaupt kein Honig gewonnen werden, da es während des Versuchs weisellos wurde. Ein weiselloses Volk, d.h. ein Volk, dem die Königin abhanden gekommen ist, kann, wenn noch offene junge Brut vorhanden ist, eine Königin nachziehen. Ist keine offene Brut mehr vorhanden, benötigt dieses sogenannte „hoffungslos weisellose Volk“ die Hilfe des Imkers um nicht einzugehen. In jedem Fall zeigt ein weiselloses Volk weniger Sammeleifer und daher ist für dieses Volk von einer deutlich geringeren Erntemenge auszugehen.



Abbildung 45 - Rähmchen mit wenig Honig (mit Honig gefüllte Waben nur im verdeckelten, hellen Bereich)

Übliche Imkerpraxis wäre es in einem solchen Fall gewesen, einem schwachen Bienenvolk mit Brutwaben aus einem starken Volk zusätzliche Brut zu verschaffen, um dieses Volk zu stärken. Dieses konnte aufgrund des Versuches, bei dem eine Kreuzkontamination zwischen den Völkern bzw. Materialeintrag und dadurch Wirkstoffverdünnung verhindert werden mussten, nicht erfolgen. Deshalb erbrachten die Völker C2, C3 und O2 als schwache Völker nur geringe Erträge.

Den Ablauf der Ernte und die erhaltenen Honigmengen gibt Tab. 5 wieder. Von den Völkern L1 bis L3 wurden, wie bereits erwähnt, nur Teilmengen abgefüllt; die genaue Erntemenge ist nicht bekannt.



Abbildung 46 - Rähmchen mit nicht entdeckelten Honigwaben



Abbildung 47 – Das Rähmchen aus Abbildung 46 nach dem Entdecken

Die Ernte der Honige wurde mit einer deutlich über die übliche Imkerpraxis hinausgehenden Sorgfalt durchgeführt. Insbesondere die Honigschleuder, das Entdeckelungsgeschirr, die Siebe und alle sonstigen verwendeten Teile und Werkzeuge, die mit dem Honig in Kontakt kamen, wurden bei jedem Wechsel von einem Bienenvolk zum nächsten mit hohem Aufwand gründlich gereinigt und getrocknet. Dadurch wurde die Möglichkeit eines Verschleppens von Rückständen ausgeschlossen.

Die einzelnen Honige wurden nach dem Abzentrifugieren durch ein Sieb von groben Verunreinigungen befreit. Darüber hinaus gehende Reinigungen erfolgten nicht. Die Honige wurden jeweils in 30 L Polyethylen-Erntegefäßen abgefüllt und jeweils 10 Minuten intensiv mit einem Holzstab für eine möglichst gleichmäßige Durchmischung gerührt. Sodann wurden die Behälter verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert.

Erneterienfolge	Volk	Erntedatum	Honigmenge
1	L1	30.08.01	8,9 kg [‡]
2	L2	30.08.01	8,1 kg [‡]
3	L3	30.08.01	6,5 kg [‡]
4	K2	31.08.01	11,8 kg
5	K1	31.08.01	11,4 kg
6	O5	31.08.01	12,7 kg
7	O4	31.08.01	4,4 kg
8	O3	31.08.01	9,6 kg
9	O2	01.09.01	900 g
10	O1	01.09.01	14,6 kg
11	C5	01.09.01	6,6 kg
12	C4	01.09.01	3,0 kg
13	C3	01.09.01	600 g
14	C2	01.09.01	kein Honig
15	C1	01.09.01	10,5 kg

[‡] von diesen Honigen lag nur Teilmengen vor.

Tabelle 10 - Erntemengen pro Bienenvolk

2.4.2 Eigenschaften der geernteten Honige

Die geernteten Honige wiesen zum Zeitpunkt der Ernte eine flüssige Konsistenz auf. Sie besaßen alle bis auf einen Honig (O2) eine sehr helle (nahezu wasserklar) bis helle (schwach gelbliche) Färbung. Ein Honig (O2) hat eine deutlich dunklere Farbe, möglicherweise handelt es sich zumindest teilweise um Honigtau-honig. Durch eine Pollenanalyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Honigen zum größten Teil um Lindenhonige handelte. Es waren aber auch Anteile von Robinie, Klee, Löwenzahn und Heidegewächsen zu finden (Abbildung 48 bis Abbildung 51).



Abbildung 48 - Pollenbild mit Linden- und Robinienpollen



Abbildung 50 - Pollenbild mit Löwenzahnpollen



Abbildung 49 - Pollenbild mit Weißkleepollen



Abbildung 51 - Pollenbild mit Ericaceapollen

Der deutlich dunklere Honig wies als einziger der geernteten Honige auch Kieferpollen in nennenswertem Umfang auf. Das erhärtet die Vermutung, dass es sich um Honigtauhonig handelt (Abbildung 52).



Abbildung 52 - Pollenbild mit Kieferpollen

Die Honige wurden nach der Ernte nicht der imkerlichen Praxis folgend über mehrere Wochen täglich gerührt. Daher setzte bereits sechs Wochen nach der Ernte bei einigen Honigen die Kristallisation ein.

2.4.3 Untersuchungen der Honige aus der Medikationsstudie

Die Honige der Medikationsstudie (L1 – L3, K1 und K2, O1 – O5, C3, C2 – C5) wurden nach der HPLC-Methode („§ 64 LFGB“, manuell) untersucht. Dabei konnten die nachfolgend aufgeführten Rückstandsgehalte ermittelt werden:

Honig	Gehalt
L1	< NG
L2	< NG
L3	< NG
K1	< NG
K2	< NG
O1	< NG
O2	< NG
O3	< NG
O4	13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTC
O5	< NG
C1	317 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CTC*
C2	kein Honig
C3	434 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CTC*
C4	512 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CTC*
C5	311 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CTC*

**Tabelle 11 - In den Honigen der Medikationsstudie
gefundene Gehalte**

NG = Nachweisgrenze (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$),

* = Summe aus Chlortetracyclin und epi-Chlortetracyclin

In den Honigen L1 bis L3, welche von den Bienenvölkern stammen, die weiter vom Medikationsstandort entfernt standen als der übliche Flugradius von Bienen eines Volkes ist, waren keine Rückstände bzw. Verunreinigungen von Tetracyclinen festzustellen. Auch die

direkt benachbarten Völker K1 und K2 waren „rückstandsfrei“. Damit kann eine Kontamination der Honige untereinander durch Räuberei der Bienen oder Verflug als unwahrscheinlich angesehen werden.

Die von den Völkern C1 und C3 bis C5 geernteten Honige wiesen Rückstände an Chlortetracyclin und Epi-Chlortetracyclin als Summe im Bereich von 311 bis 512 $\mu\text{g}/\text{kg}$ auf. Ein Beispiel-Chromatogramm zeigt Abbildung 53.

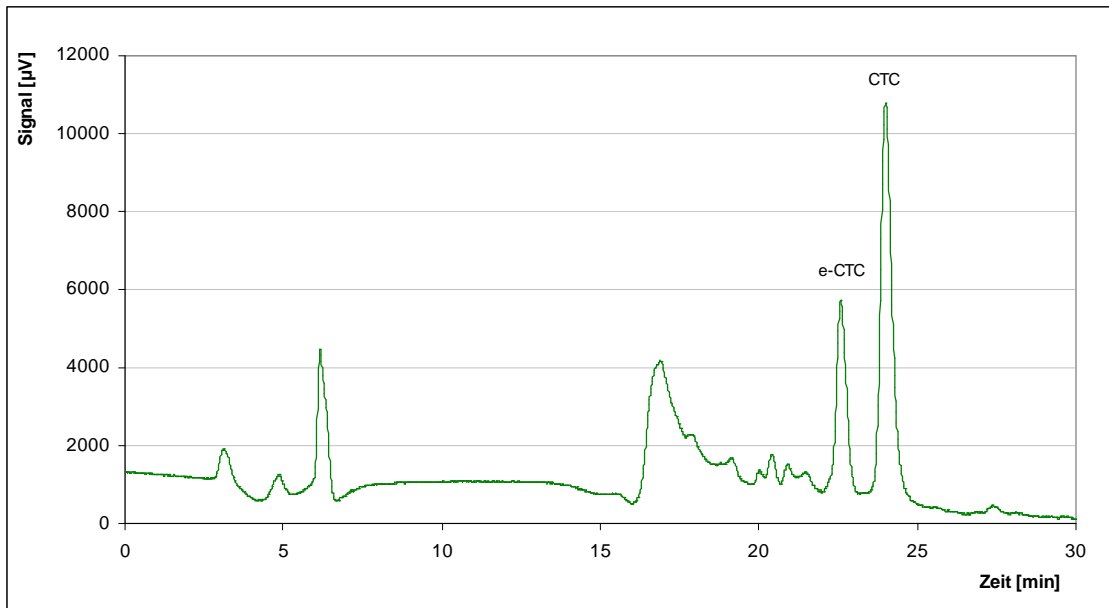


Abbildung 53 - Chromatogramm des Honig C4 aus der Medikationsstudie

Honige der Völker O1 bis O5, welche mit Oxytetracyclin behandelt worden waren, zeigten nur bei einem Honig einen geringen Rückstand von Oxytetracyclin in Höhe von ca. 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (siehe Abbildung 54).

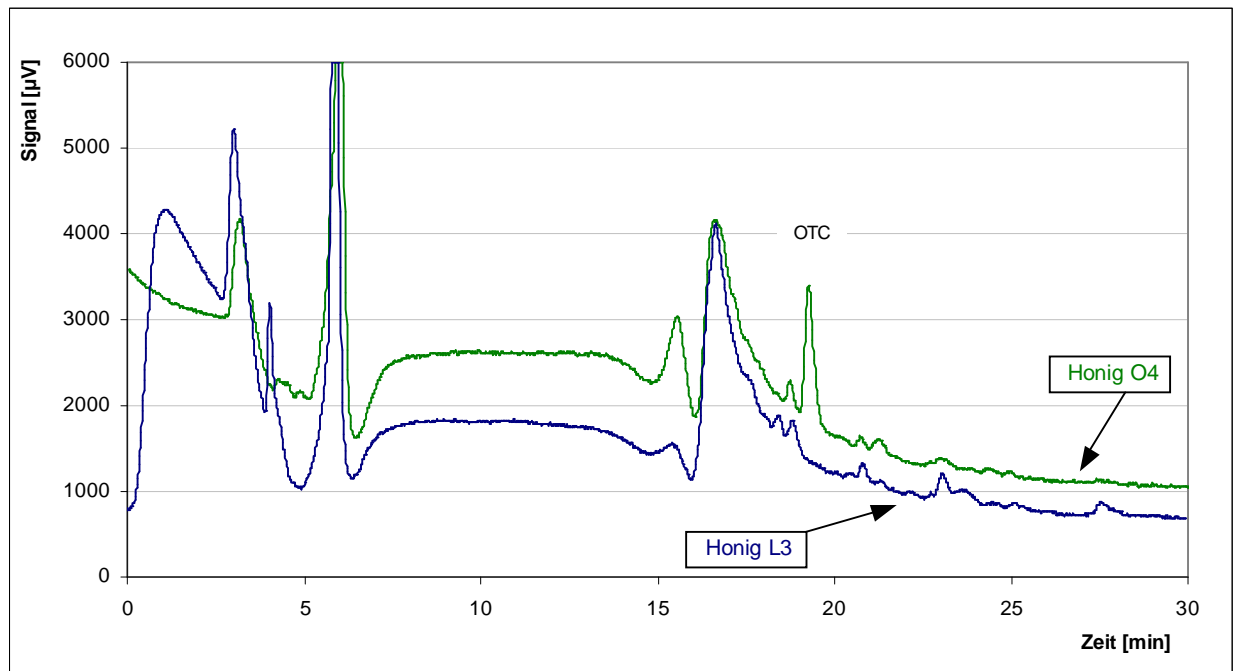


Abbildung 54 - Chromatogramm des Honigs O4 aus der Medikationsstudie im Vergleich mit Honig L3
Alle anderen Honige von Völkern mit Oxytetracyclin-Behandlung wiesen keine mit der HPLC nachweisbaren Rückstände auf.

2.5 Methodenvergleich

Die bei der Medikationsstudie gewonnenen Honige wurden neben der Untersuchung mittels HPLC auch mittels eines Enzymimmunoassay und mittels eines Radiorezeptortests (Charm II) untersucht. Zusätzlich wurden die Honige durch eine weitere HPLC-Methode von einem unabhängigen Untersuchungslabor untersucht. Diese Methode verwendet eine Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Acetonitril und wässriger Honiglösung gefolgt von einer Festphasenextraktion an einer Carbonsäurephase als Probenvorbereitung.

Die mit den vier unterschiedlichen Untersuchungsverfahren gewonnenen Resultate sind in Abbildung 55 grafisch dargestellt und in Tabelle 12 aufgeführt.

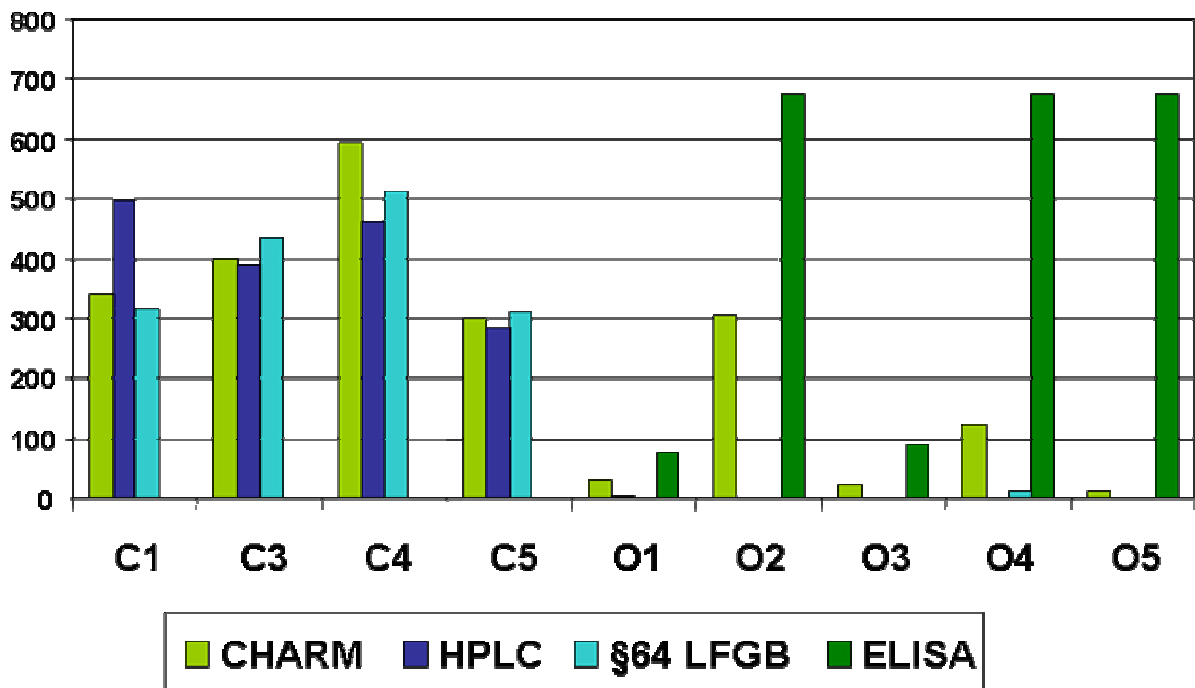


Abbildung 55 - Übersicht über die mit HPLC, ELISA und CHARM II gemessenen Rückstandsgelhalte der Honige aus der Medikationsstudie

	HPLC I	HPLC II	Radiorezeptortest (Charm II)	Enzymimmunoassay (r-Biopharm)
Honig	Gehalt			
L1	< NG	< NG	< NG	< NG
L2	< NG	< NG	< NG	< NG
L3	< NG	< NG	< NG	< NG
K1	< NG	< NG	< NG	< NG
K2	< NG	< NG	< NG	< NG
O1	< NG	< NG	32 µg/kg [#]	> NG [‡]
O2	< NG	< NG	305 µg/kg [#]	> 675 µg/kg [#]
O3	< NG	< NG	25 µg/kg [#]	> NG [‡]
O4	13 µg/kg OTC	< NG	123 µg/kg [#]	> 675 µg/kg [#]
O5	< NG	< NG	12 µg/kg [#]	> 675 µg/kg [#]
C1	317 µg/kg CTC [*]	496 µg/kg CTC [*]	340 µg/kg ⁺	n.b.
C3	434 µg/kg CTC [*]	389 µg/kg CTC [*]	400 µg/kg ⁺	n.b.
C4	512 µg/kg CTC [*]	463 µg/kg CTC [*]	595 µg/kg ⁺	n.b.
C5	311 µg/kg CTC [*]	284 µg/kg CTC [*]	298 µg/kg ⁺	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

^{*} Gehalte angegeben als Summe von Epi-Chlortetracyclin und Chlortetracyclin

[#] Gehalt ermittelt über die Kalibrierung mit OTC

⁺ Gehalt ermittelt über die Kalibrierung mit CTC

[‡] qualitativ positives Ergebnis im Bereich der Nachweisgrenze

Tabelle 12 - Zusammenfassung der Rückstandsgehalte der Honige aus der Medikationsstudie

Ergebnisvergleich Chlortetracyclin

Es zeigt sich für Chlortetracyclin eine Übereinstimmung der Analyseergebnisse der einzelnen Meßverfahren, die größenordnungsmäßig stimmig ist. Durch die chromatographischen Methoden konnte die eingetretene Epimerisierung nachgewiesen werden (Tabelle 13).

Honig	Umfang der Epimerisierung
C1	38%
C3	43%
C4	43%
C5	41%
<i>Stabilitätsstudienvergleich</i>	40%

Tabelle 13 - Umfang der Epimerisierung des Chlortetracyclins der Honige aus der Medikationsstudie

Diese Epimerisierungsraten liegen in dem Bereich, wie sie auch bei wässrigen, schwach sauren Lösungen beobachtet werden. Der Anteil epi-Chlortetracyclin bei dem aus der Stabilitätsstudie (siehe 2.6) stammenden dotierten Honig, der 10 Monate bei Raumtemperatur gelagert wurde, beträgt 40%.

Ergebnisvergleich Oxytetracyclin

Mit den chromatographischen Methoden ist mit Ausnahme eines Honigs, bei dem ein geringer Rückstandsgehalt für Oxytetracyclin messbar war, kein Oxytetracyclin nachweisbar. Bei den angewandten Methoden, die auf einem Rezeptor oder Antikörper basieren, ist dagegen eine Hemmung festzustellen.

Dieses wäre mit einem Abbau des Oxytetracyclins erklärbar, der zu Abbauprodukten führt, die mit der HPLC-Methode nicht mehr erfasst werden. Beispielsweise könnte durch eine mögliche Glykolyse des Oxytetracyclins die Eigenschaft derart verändert worden sein, dass es bei der Aufarbeitung für die HPLC nicht mehr mit erfasst wird. Gleichwohl

müssten diese Abbauprodukte noch eine Affinität zu den im CHARM-II bzw. ELISA verwendeten Rezeptoren oder Antikörpern haben.

2.6 Stabilitätsstudie mit Tetracyclinen in Honig

Die Untersuchungen der Honige aus der Medikationsstudie haben gezeigt, dass bereits kurze Zeit nach der Ernte der Honige Oxytetracyclin im Gegensatz zum Chlortetracyclin nicht oder nur noch in Spuren nachweisbar ist. Dieses unterschiedliche Verhalten kann mehrere Ursachen haben:

- Das Oxytetracyclin könnte bereits durch die Biene zumindest teilweise entfernt oder metabolisiert worden sein,
- das Oxytetracyclin könnte durch die Umgebungsbedingungen im Bienenstock verändert worden sein,
- das Oxytetracyclin könnte im Honig abgebaut oder chemisch verändert worden sein.

Eine Metabolisierung der Tetracycline in der Biene kann als relativ unwahrscheinlich angesehen werden. Da die Honigbiene keinen Entgiftungsapparat, wie er bei Säugetieren vorkommt, besitzt, ist sie nicht in der Lage, die aufgenommenen Substanzen aktiv umzuwandeln und auszuschcheiden.

Die Umgebungsbedingungen im Bienenstock werden vom Bienenvolk soweit möglich konstant gehalten, die Temperatur im Bienenstock ist im Bereich von 35 bis 37 °C relativ gleich bleibend. Die Bienen erreichen diese Temperaturkonstanz durch erhöhten Flügelschlag im Stock, wenn die Temperatur gesenkt werden muss oder durch höhere allgemeine Aktivität, wenn die Temperatur erhöht werden soll. Lediglich im Winter sinkt die Temperatur im Bienenstock deutlich ab, wobei die Innentemperatur der als Traube im Stock sitzenden Bienen auch hier nicht unter 30 °C sinkt. Auch die Luftfeuchtigkeit wird von den Bienen reguliert. Dabei ist eine mittlere Luftfeuchtigkeit von 40 % für die Honigreifung und die Brutentwicklung optimal. Diese Bedingungen allein sind nicht dazu geeignet, die Tetracycline chemisch zu verändern.

Der mögliche chemische Abbau des Oxytetracyclins im Honig ließ sich vorab relativ leicht überprüfen. Dazu wurde ein rückstandsfreier Honig mit je 500 µg/kg Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin dotiert und bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufbewahrt. Der Honig wurde nach einer Lagerzeit von zehn Monaten per HPLC auf Tetra-

cycline untersucht. Es zeigte sich als Ergebnis, dass dieser Honig keinen nachweisbaren Rückstand an Oxytetracyclin mehr aufweist, während Tetracyclin und Chlortetracyclin einschließlich ihrer Epimeren zu finden waren. Das Chromatogramm dieses Honigs ist in Abbildung 56 zu sehen.

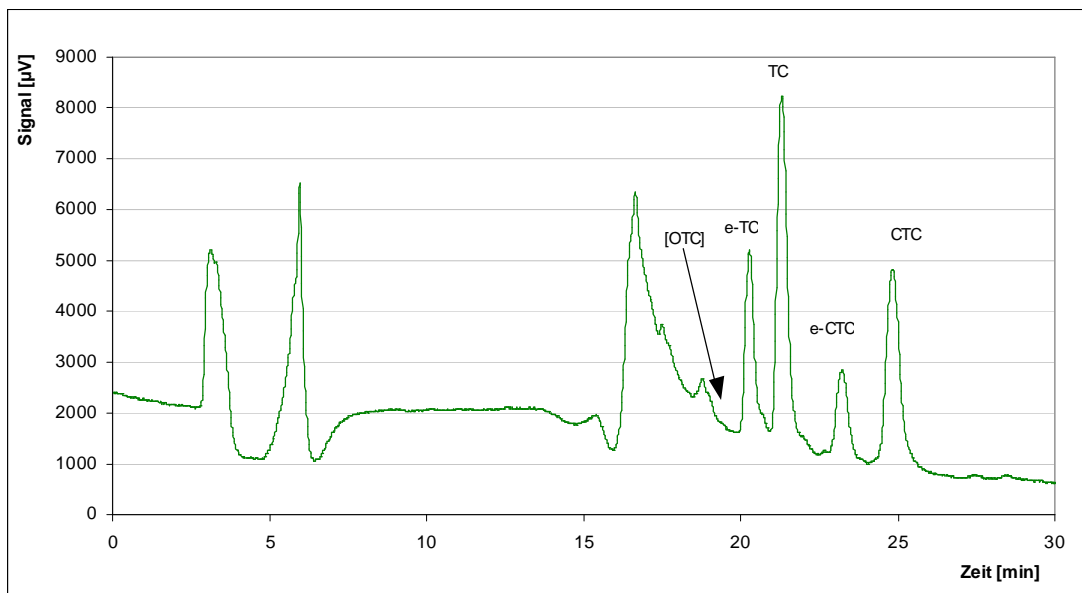


Abbildung 56 - Chromatogramm eines mit je 500 µg/kg OTC, TC und CTC dotierten und zehn Monate gelagerten Honigs

Der CTC-Gehalt einschließlich Epimer beträgt bei diesem Honig 226 µg/kg und ist somit um mehr als die Hälfte gesunken. Die gemessene Epimerisierungsrate des Chlortetracyclins beträgt 40%. Aufgrund der Tatsache, dass kein Oxytetracyclin im dotierten Honig mehr nachweisbar ist, kann von einer chemischen Veränderung des Oxytetracyclins durch Inhaltsstoffe des Honigs ausgegangen werden.

Abbau in Honig

Zum Nachweis des Abbaus im Honig wurde der nachgewiesenermaßen rückstandsfreie Honig »L2« aus der Medikationsstudie mit 1080 µg/kg Oxytetracyclin-Hydrochlorid, entsprechend 1000 µg/kg Oxytetracyclin, dotiert und homogenisiert. Dieser Honig wurde am darauf folgenden Tag und weiter in einem Zeitraum von 80 Tagen mit HPLC, ELISA und CHARM II untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungsreihe ist in Abbildung 57 dargestellt. Wie zu erkennen, ist eine Verringerung der Oxytetracyclinkonzentration mit allen verwendeten Analysetechniken messbar.

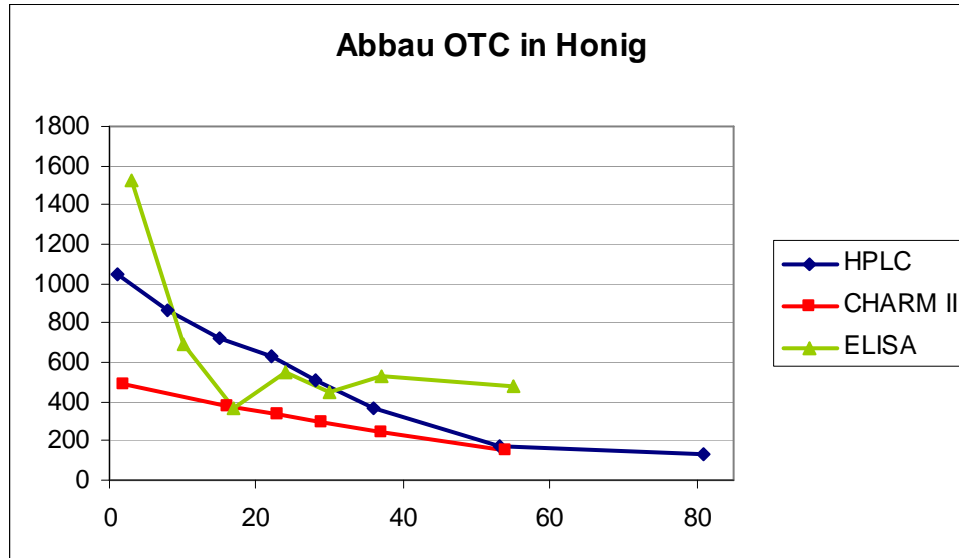


Abbildung 57 - Abbau von Oxytetracyclin in Honig

Abbau in Glucose/Fructose-Lösung

Dieser beobachtete Abbau des Oxytetracyclins im Honig ist demnach auf Bestandteile des Honigs zurückzuführen. Da Honig als Hauptbestandteile Glucose und Fructose enthält, lag es nahe, zu überprüfen, inwieweit sich der Abbau von Oxytetracyclin in Honig einerseits und in einer Glucose/Fructose-Lösung andererseits unterscheidet.

Einer Lösung von 35 g/100 g Glucose und 45 g/100 g Fructose wurde ebenso wie der rückstandsfreie Honig mit 1000 µg/kg Oxytetracyclin dotiert und ebenfalls über einen Zeitraum von 80 Tagen parallel mit dem dotierten Honig mit den verschiedenen Analysetechniken untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 58 grafisch dargestellt.

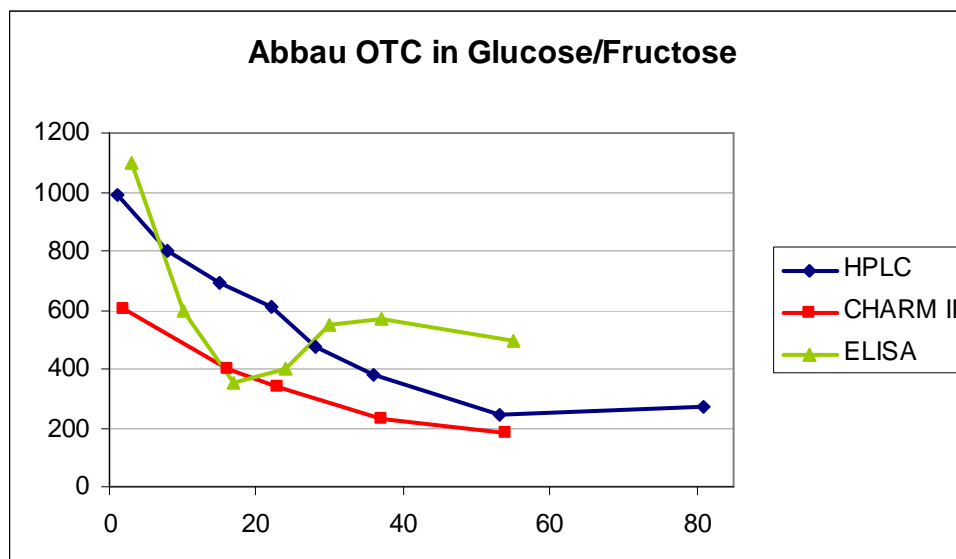


Abbildung 58 - Abbau von Oxytetracyclin in Glucose/Fructose

Wie in Abbildung 57 und Abbildung 58 zu erkennen, findet im Honig wie auch in einer Glucose/Fructose-Lösung ein Abbau in ähnlichem Umfang statt. Eine zum Vergleich untersuchte wässrige Oxalsäure ($c = 0,01 \text{ mol/L}$) gleicher Konzentration zeigte in dem untersuchten Zeitraum keine Verringerung der Oxytetracyclinkonzentration. Somit kann daraus geschlossen werden, dass am Abbau des Oxytetracyclins in Honigen nur die Glucose bzw. die Fructose eine große Rolle spielen, während alle anderen Inhaltsstoffe des Honigs, speziell die Enzyme, vermutlich nicht zur beobachteten Verringerung des Oxytetracyclins beitragen.

Die Resultate einer anderen Studie zur Stabilität von Oxytetracyclin in Futterteig zeigten einen geringeren Abbau des Oxytetracyclins [KOCHANSKY, 2000]. Bei dieser Studie wurde das Oxytetracyclin einem klassischen Futterteig aus Saccharose, pflanzlichen Fetten und Wasser zugesetzt. Der Abbau des Oxytetracyclins liegt im Futterteig bei etwa 4% jährlichen Abbaus deutlich geringer als in der untersuchten Fructose- und Glucose-Mischung. Ob allerdings das im Futterteig vorhanden pflanzliche Fett den Abbau des Oxytetracyclins beeinflusst, bleibt ungeklärt. Eine andere Studie zeigt, dass Oxytetracyclin in wässriger Zuckerlösung bei Raumtemperatur oder Brutnesttemperatur ($34 \text{ }^\circ\text{C}$) deutlich weniger stabil ist, als es in Futterteigen der Fall ist [GILLIAM und ARGAUER, 1975]. Im Bienenstock ist Oxytetracyclin einer weiteren Studie zufolge nach einem Zeitraum von sechs bis neun Wochen vollständig abgebaut [SPORNS et al., 1986]. In Schleuderhonigen von Bienenvölkern, die mit einer oxytetracyclinhaltigen Zuckerlösung gefüttert worden waren, konnten keine Rückstände im geernteten Honig festgestellt werden, während bei

Applikation des Oxytetracyclines auf trockenem Wege oder mittels Futterteig durchaus Rückstände im Honig auftreten können [LEHNERT und SHIMANUKI, 1981].

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Abbaus stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Medikationsstudie. Der im Vergleich zum Chlortetracyclin deutlich höhere Verlust an Oxytetracyclin könnte auf eine glykosidische Bindung mit den Zuckern des Honigs hindeuten. Erste Versuche, das Oxytetracyclin nach hydrolytischer Spaltung mit Salzsäure wieder nachzuweisen waren nicht erfolgreich. Eine weitere Untersuchung zum Abbau des Oxytetracyclins in zuckerreichen Lebensmitteln ist sinnvoll, um eine möglicherweise unerlaubte Anwendung bei der Gewinnung von Lebensmitteln nachweisen zu können. Leider konnte diese Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr fortgeführt werden.

2.7 Marktstudie

Im Laufe des Jahres 2001 konnten 359 Honigproben einer Screening-Untersuchung unterzogen werden. Diese Honigproben stammten aus Handelslaboratorien, aus der amtlichen Lebensmittelüberwachung, von Honigabfüllern, Honigimporteuren, dem Einzelhandel, oder von Imkern. Alle Honige wurden mit dem Rezeptortest (CHARM-II) untersucht und alle auffälligen Honige sowie zufällig ausgewählte nicht auffällige Honige einer weiteren Untersuchung mittels ELISA unterzogen. Als Kontrollstandard des CHARM-II-Test-Kits wurde ein Multi-Standard mit 200 µg/kg Chlortetracyclin verwendet. Mit den Zählraten für diesen Kontrollstandard wird der sog. „positive control point“ unter Berücksichtigung einer 20%igen Toleranzgrenze festgelegt. Für alle Proben, deren Messergebnisse innerhalb des Kalibrierbereiches (10-50 µg/kg) lagen, konnten Konzentrationen für die Rückstände angegeben werden. Alle Proben, deren Zählraten unterhalb der Kalibrierung lagen, werden mit dem Ergebnis „> 50 µg/kg“ angegeben. Eine Nachuntersuchung z.B. nach Verdünnung erfolgte zunächst nicht.

Von diesen 359 untersuchten Honigen waren 34 Honige als Tetracyclin-positiv einzustufen; von diesen Honigen führten 27 im anschließend durchgeführten ELISA-Test ein positives Ergebnis. Alle Honige, die sowohl mit dem CHARM II-Test als auch mit dem ELISA-Test zu einem positiven Resultat führten, wurden als Tetracyclin-positive Honige eingestuft. Von den 325 im Rezeptortest negativen Proben wurden 267 Honige mittels ELISA nachuntersucht und es fanden sich 15 positive Honige darunter (Tabelle 14).

Probenbezeichnung	Gehalt [µg/kg]		Probenbezeichnung	Gehalt [µg/kg]	
	CHARM	ELISA		CHARM	ELISA
BI08	< 10	14	BI81	< 10	19
BI20	15	16	BI95	< 10	46
BI29	< 10	13	BN10	13	13
BI36	23	42	BN16	11	11
BI55	10	< 10	FA04	37	50
BI60	35	34	FA05	10	10
BI62	10	14	FA15	13	< 10

Experimenteller Teil und Diskussion

Probenbezeichnung	Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		Probenbezeichnung	Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	
	CHARM	ELISA		CHARM	ELISA
FA23	10	< 10	L99/14	> 50	93
FA30	14	23	L99/341	39	64
FA44	10	22	L99/351	26	40
FR3153	39	16	L99/352	22	35
FR3159	34	17	L99/58	27	43
FR3282	48	59	ME09	< 10	11
FR3288	49	59	ME14	< 10	13
FR3519	15	22	ME16	< 10	25
FR3829	< 10	14	ME18	< 10	12
FR3844	47	44	ME19	< 10	16
FR3860	18	< 10	ME20	< 10	10
FR3933	< 10	12	ME22	< 10	13
FR3938	10	14	ME23	< 10	12
FR3965	> 50	85	MS07	23	24
FR3967	24	13	MS22	10	< 10
HA4453	< 10	12	RE01	39	< 10
L00/17	> 50	93	RU316/2001	11	< 10
L00/51	51	57	Tabelle 14 - Ergebnisse der positiv getesteten Honige		
L00/70	28	35			
L00/97	13	11			
L99/129	30	36			
L99/130	28	60			
L99/131	53	73			
L99/132	51	93			

Experimenteller Teil und Diskussion

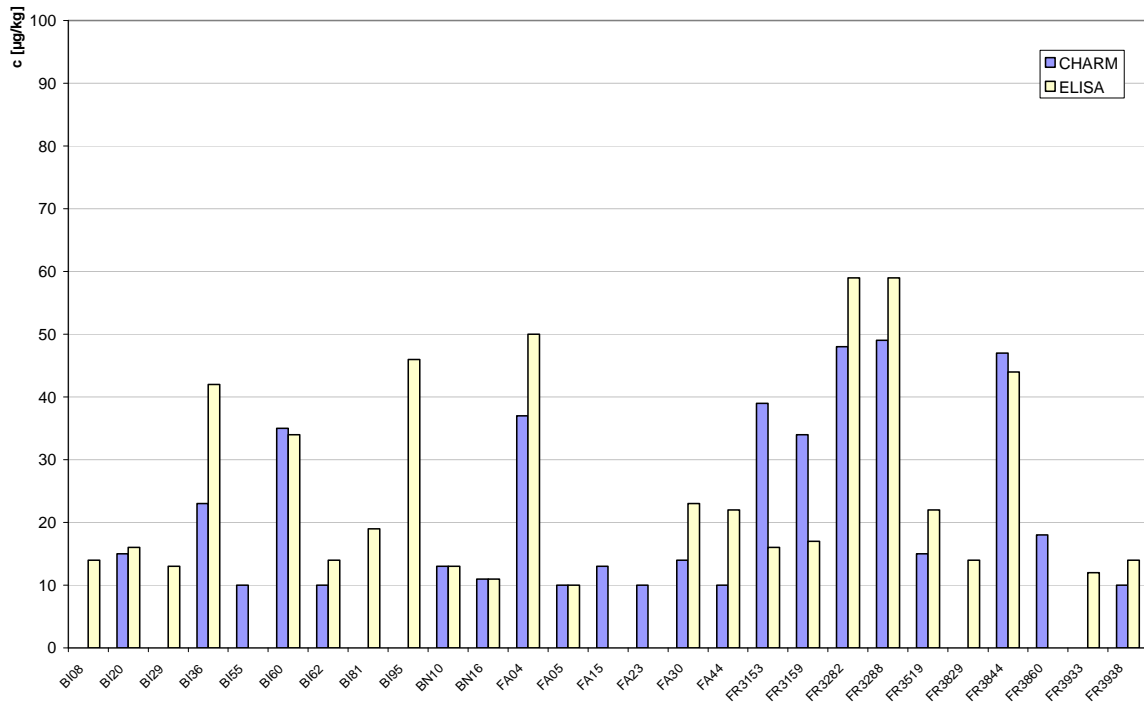
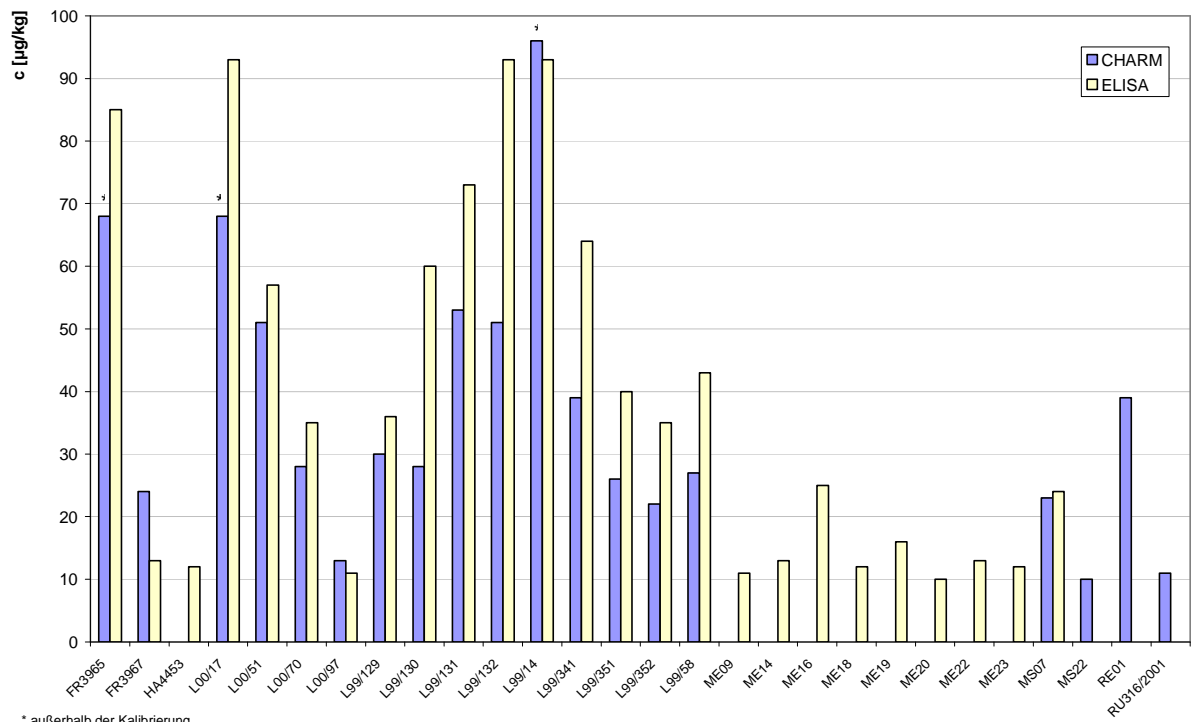


Abbildung 59 - Grafische Darstellung der positiv getesteten Honige (Teil 1)



* außerhalb der Kalibrierung

Abbildung 60 - Grafische Darstellung der positiv getesteten Honige (Teil 2)

In Abbildung 59 und Abbildung 60 sind die Testergebnisse grafisch dargestellt. Dabei sind sieben Proben, bei denen nur der CHARM-Test ein positives Ergebnis hatte, während nur der ELISA ein positives Signal bei 15 Proben anzeigte. Bei 33 positiv getesteten Proben zeigten beide Tests ein positives Resultat und bei 305 der 359 getesteten Honige zeigten beide Screeningtests keinen Hinweis auf Tetracyclinrückstände. Bei 279 Proben ist eine Übereinstimmung der Ergebnisse beider Screening-Methoden zu sehen (92 %), während bei 22 Proben (8 %) die Ergebnisse nicht übereinstimmend waren.

Eine erweiterte Aufschlüsselung der untersuchten Honige nach Herkunftsländern ist in Tabelle 15 dargestellt. Dabei sind alle Honige entweder nach ihrer bekannten Herkunft oder aufgrund eindeutiger Merkmale (Pollenanalyse) nach Ländern oder Regionen eingeteilt worden. Honige, bei denen eine Herkunftsangabe nicht vorhanden war, oder deren wahrscheinliche Herkunft nicht zu klären waren, wurden als „unbekannt“ in die Aufstellung mit aufgenommen.

Herkunft	Anzahl Proben	CHARM II + ELISA +	Charm II + ELISA -	Charm II - (*)	CHARM II - ELISA +	Auffällige Proben
Deutschland	66			66		
Österreich	1			1		
Norwegen	1			1		
Schweden	1			1		
Frankreich	2			2		
Italien	2			2		
Griechenland	2		1	1		1
Spanien	3	1		2		1
Türkei	6			6		
Rumänien	1			1		
Ungarn	3			3		
Bulgarien	7			7		
Moldawien	1	1		0		1
Osteuropa	9		1	8		1
Europa	2			2	1	1
Kanada	7			7	2	2
USA	2	1		1		1
Mexiko	6			6		
Cuba	15	12		3		12

Experimenteller Teil und Diskussion

Herkunft	Anzahl Proben	CHARM II + ELISA +	Charm II + ELISA -	Charm II - (*)	CHARM II - ELISA +	Auffällige Proben
Guatemala	1			1		
Uruguay	2			2		
Nicaragua	1			1		
Chile	4			4		
Argentinien	17	1		16	2	3
Mexiko/Australien	2			2	1	1
El Salvador	1			1		
Mittelamerika	5		1	4		1
Südamerika	13			13	1	1
Lateinamerika	3			3		
China	2			2	1	1
Australien	8		1	7		1
Neuseeland	8			8		
unbekannte Herkunft	155	11	3	141	7	14
Summe	359	27	7	325	15	42

Auswertegrenze:

ELISA $\geq 15 \mu\text{g/kg}$ (Kalibrierung gegen Tetracyclin)

Charm II $\geq 10 \mu\text{g/kg}$ (Kalibrierung gegen Tetracyclin)

(*) Von diesen 325 im CHARM II-Test negativen Proben wurden 267 Proben per ELISA überprüft. Davon waren 252 Proben negativ und 15 positiv.

Tabelle 15 - Herkunftsübersicht der untersuchten Honige

Dabei ist insbesondere auffällig, dass Honige aus Ländern, in denen der Einsatz von Tetracyclinen, insbesondere Oxytetracyclin der dort üblichen imkerlichen Praxis entspricht, zu positiven Resultaten führte. Der Einsatz von Oxytetracyclin ist in Ländern des amerikanischen Kontinents weit verbreitet und wird dort nicht nur bei der Behandlung erkrankter Bienenvölker, sondern auch zur vorbeugenden Behandlung der Völker eingesetzt.

Allerdings ist eine gesicherte allgemeine Aussage über die Belastung von Honigen mit Tetracyclinen in Bezug zu ihrer Herkunft nicht möglich, da es sich bei dieser Untersuchung nicht um eine repräsentative Marktübersicht handelt. Ein erheblicher Teil der hier untersuchten Honige stammt aus dem Bereich der amtlichen Lebensmittelüberwachung. Dort sind Lebensmittelkontrolleure tätig, die aufgrund ihrer Ausbildung und Erfahrung

gezielt auffällige Proben entnehmen. Ein weiterer Anteil der untersuchten Proben stammt von Unternehmen, die Honige importieren, abfüllen und im europäischen Binnenmarkt vermarkten. Diese Importeure beziehen ihre Ware häufig von wenigen Zulieferern, so dass die untersuchten Proben möglicherweise von nur wenigen Imkereien stammen. Zudem waren wenige bereits durch das Eigenkontrollsystem als positiv getestete Roh- und Mischhonige von Importeuren darunter.

Trotz der nicht repräsentativen Untersuchung sind einige Einzelaussagen möglich:

- Alle Honige aus Deutschland sind Tetracyclin-negativ.
- Von 107 europäischen Honigen waren 5 positiv getestet (5%).
- Von 79 Honigen vom gesamten amerikanischen Kontinent führten 19 zu einem positiven Befund (24%).

Die erste Aussage zur Rückstandsfreiheit der Honige aus Deutschland steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Nationalen Rückstandskontrollplans [BVL NRKP, 2007]. Dort wurden in dem Zeitraum von 1999 bis 2007 jährlich zwischen fünfzig und mehr als einhundert Honigproben untersucht. Diese Proben wurden direkt beim Erzeuger genommen und keine der untersuchten Proben konnte positiv auf Tetracycline getestet werden. Über die verwendeten Untersuchungsmethoden sind in dem Bericht leider keine ausreichenden Angaben vorhanden. In den untersuchten Honigen konnten bei drei Proben Rückstände aus der Gruppe der Sulfonamide gefunden werden.

In einer früheren Publikation sind bei drei von 54 untersuchten ausländischen Honigen (Rumänien, Spanien und Mexiko) Tetracyclin-Rückstände gefunden worden [JÜRGENS, 1981]. Einer aktuelleren Studie zufolge sind im Jahre 2005 22% von 5000 untersuchten Honigen auf dem europäischen Markt mit Tierarzneimitteln kontaminiert gewesen [Michaud, 2005]. Die in einer weiteren Studie mit positiven Tetracyclinbefunden aufgefallenen Honige stammen aus Argentinien, Bulgarien, China, Frankreich, Kanada, Kuba, Rumänien, Spanien, Thailand, Türkei und Ungarn [Diserens, 2005]. Die dabei gefundenen Rückstandsgehalte liegen zwischen 5 und 2076 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2.8 Methodenfortentwicklung

2.8.1 Methode nach § 64 LFGB ohne Einengung

Die für die Untersuchung der Honige aus der Medikationsstudie verwendete Methode nach § 64 LFGB ist aufgrund zweistufiger Festphasenextraktion eine sehr spezifische, aber auch sehr zeitaufwändige Methode. Im Rahmen der Medikationsstudie wurden die untersuchten Honige auch durch die auf Honig-Analyse spezialisierte Firma »applica GmbH, Bremen« zusätzlich mit untersucht. Die dabei angewandte Methode basiert auf einer Flüssig/Flüssig-Verteilung der mit Wasser verdünnten Honige und Acetonitril, gefolgt von einer Festphasenextraktion an einer Carboxylphase. Diese Methodik wurde mit dem vorhandenen System kopiert. Leider konnte diese adaptierte Methodik nicht erfolgreich angewendet werden. Daher wurde auf die dieser Methode zugrunde liegender Methodik von Oka [OKA et al., 1987a, 1987b], einer zweistufigen Festphasenextraktion mittels C₁₈-Phase, gefolgt von einer Carboxylphase, zurückgegriffen. Diese Methodik konnte apparativ als zweistufige online-Festphasenextraktion durchgeführt werden, jedoch blieben die Ergebnisse weit hinter den Erwartungen zurück. Insbesondere die Reproduzierbarkeit war nicht zufrieden stellend. Daher wurde wieder auf die bewährte aber zeitaufwändige, in der „§ 64-Methode“ verwendete Extraktion mittels Kupfer zurückgegriffen. Insbesondere die einzelnen Konditionierungs-, Spül-, Aufgabe- und Elutionsschritte wiederholen sich immer in gleicher Weise und sind der zeitaufwändigste Teil der Probenvorbereitung. Es bot sich daher an zu prüfen, in welchem Umfang diese Schritte zu automatisieren sind und ob die Aufarbeitung, insbesondere die zwei Festphasenextraktionen, automatisch durchzuführen ist. Dazu wurde zunächst schrittweise geprüft, welche Aufreinigungsschritte automatisiert durchgeführt werden können. Der erste Schritt zur Vereinfachung der Aufarbeitung betrifft den letzten Schritt der Aufarbeitung der amtlichen § 35-Methode: die Einengung des Eluats von der C₁₈-Festphase. Dieser Schritt besteht aus der Einengung des Eluate mittels Rotationsverdampfer und anschließendes Aufnehmen mit HPLC-Eluent auf ein definiertes Gewicht.

Wenn es möglich ist, durch direkte Aufgabe der Eluate der C₁₈-Festphase auf die Polymer-Festphase des automatisierten Systems die Einengung des Eluats mittels Rotationsver-

dampfer einzusparen, wäre damit bereits ein Schritt zu einer schonenden und weniger fehlerträchtigen Aufarbeitung getan.

Es bot sich an, die Anreicherung an der C₁₈-Festphase online durchzuführen. Da es jedoch nicht möglich war, von einem Hersteller genaue Angaben zur Hochdruckstabilität der jeweils angebotenen Festphasen zu erhalten, musste darauf verzichtet werden, denn die Elution von der Anreicherungssäule erfolgt bei diesem System mit dem Eluenten für die Trennung auf der analytischen Trennsäule und somit mit einem in der HPLC üblichen Druck, der bei der hier verwendeten Säule bei isokratischer Elution ca. 130 bar betrug. Somit konnte die automatisierte Anreicherung nur mit dem Material durchgeführt werden, dessen Stabilität unter hohen Drücken bekannt war. Daher wurde das bereits von Zurhelle erprobte und bewährte Polymermaterial PLRP-S des Herstellers Polymer Labs verwendet. Dabei handelt es sich um ein hoch quervernetztes sphärisches Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer (PS-DVB). Dieses besteht prinzipiell aus einer linearen Polystyrolkette, die durch den zusätzlichen Einsatz von Divinylbenzol bei der Polymerisation quervernetzt sind. Durch Verwendung von unterschiedlich substituiertem Divinylbenzol und dessen Anteil bei der Polymerisation können die räumliche Struktur des Polymers und damit die physikalischen und physikochemischen Eigenschaften beeinflusst werden. In Abbildung 61 sind zwei Möglichkeiten der Polymerstruktur dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung ist die Verwendung von para-Divinylbenzol und auf der rechten Seite die Verwendung von meta-Divinylbenzol zu sehen. Das hier verwendete, hochdruckstabile Material besitzt eine Korngröße von 50-70 μm und eine Porenweite von 100 Å.

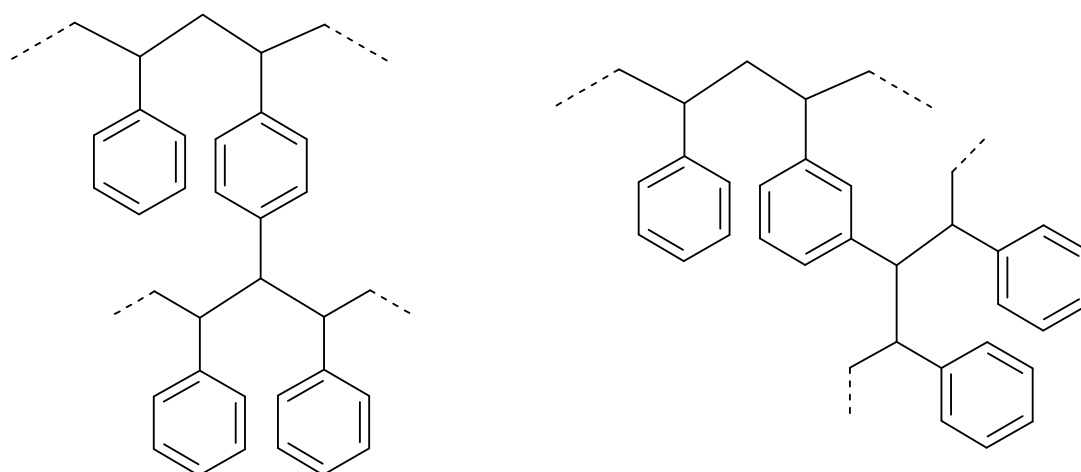


Abbildung 61 - Strukturen eines Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymers mit p-DVB (links) bzw. m-DVB (rechts; die gestrichelten Linien sind die gedachte Fortsetzung des Polymerstranges)

Problematisch für die nachfolgende Anreicherung ist der hohe Methanolgehalt des Eluats von der C₁₈-Festphase, denn eine Anreicherung an der Polymer-Festphase aus Lösungen mit hohen Methanolgehalten ist nicht möglich, da die Analyten nicht von der Säule retardiert werden. Das bei der Elution der C₁₈-Festphase erhaltene Volumen von einem Milliliter besteht zum überwiegenden Teil aus Methanol. Da das automatisierte System Vials mit einem Volumen von 4 mL verwendet, bestand die Möglichkeit, das Eluat mit Wasser auf einen Methanolgehalt von 25 % zu verdünnen. Somit war zunächst zu prüfen, ob eine Anreicherung aus einer Lösung mit einem Methanolgehalt von 25 % möglich ist. Dazu wurden Lösungen von je 500 µg/L OTC, TC und CTC mit unterschiedlich hohen Methanolgehalten im Bereich von 0 bis 25 % Methanol hergestellt. Diese Lösungen wurden mit dem bereits in 2.1.2 beschriebenen Anreicherungssystem analysiert.

Abbildung 62 zeigt, dass für alle untersuchten Analyten eine gleichermaßen hohe Wiederfindung von ca. 100 % bis zu einem Methanolgehalt von 8 % möglich ist, während die Wiederfindungen bei weiter steigendem Methanolanteil deutlich abnehmen. Bei Methanolgehalten von über 15 % wurden außer beim Chlortetracyclin bereits keine erkennbaren Signale mehr erhalten; d.h. Oxytetracyclin und Tetracyclin werden aus methanolischen Lösungen mit einem Methanolgehalt von mehr als 14 % nicht mehr retardiert. Am deutlichsten nimmt mit steigendem Methanolgehalt die Wiederfindung für das Oxytetracyclin ab, während die Abnahme für das Chlortetracyclin weniger stark ist. Das entspricht auch den Erwartungen, da das Oxytetracyclin als polarster Analyt der drei untersuchten Verbindungen am leichtesten mit einem organischen Lösungsmittel von der Anreicherungsphase zu eluieren ist, während das Chlortetracyclin als Verbindung mit der im Vergleich geringsten Polarität höhere Methanolanteile zum vollständigen Eluieren von der Festphase benötigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Anreicherung von Tetracyclinen an der Polymer-Festphase mit dem beabsichtigten 25 %igen Methanolanteil nicht gelingen kann.

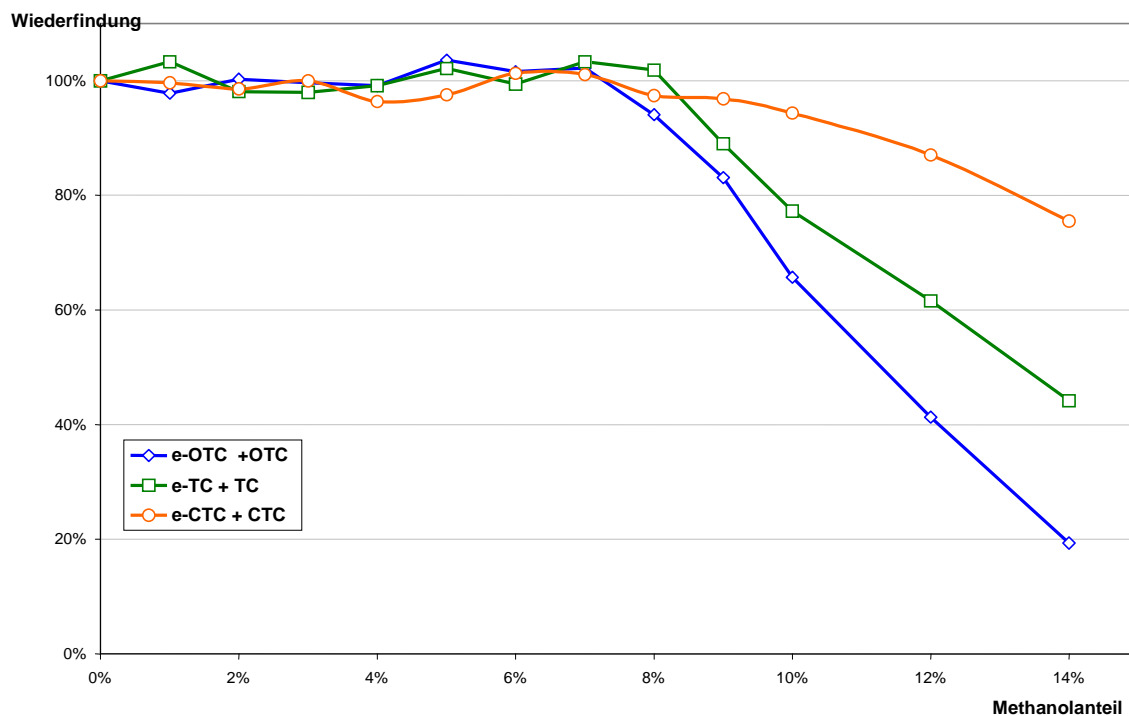


Abbildung 62 - Abhängigkeit der Wiederfindungen von OTC, TC und CTC vom Methanolgehalt bei Anreicherung an der PLRP-S-Festphase.

Um eine Anreicherung der Tetracycline an der vorhandenen Festphase zu ermöglichen, muss das Eluat der offline-Festphasenextraktion derart verdünnt werden, dass der Methanolgehalt in der Verdünnung weniger als 8 % beträgt. Bei der Durchführung der Aufreinigung entsprechend der Methode nach § 64 LFGB wird das in der C_{18} -Festphase nach dem Spülen verbliebene Wasser vor der Elution mit Methanol durch das Einsaugen von n-Hexan weitgehend entfernt. Auf diesen Schritt konnte durch die anschließende online-Festphasenextraktion verzichtet werden. Einerseits wird dadurch der Methanolanteil im Eluat durch das noch vorhandene Wasser verringert, andererseits kann durch das nicht enthaltene n-Hexan eine Beeinflussung der online-Festphasenextraktion nicht erfolgen. Die dazu nötige Verdünnung mit Wasser im Verhältnis 1 zu 12,5 führt zu einem Probengehalt von 1,6 g Probe in 4 mL Probenlösung. Diese Konzentration sollte für eine Detektion mittels UV-Detektor auch im Bereich der Nachweisgrenze ausreichend sein. Bei einem Gehalt von $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (zu erreichende Nachweisgrenze, LOD), einer Einwaage von 10 g Honig und Aliquotierung (20 mL Filtrat) sind bei verlustfreier Aufreinigung 20 ng Analyt im Eluat der C_{18} -Festphase (1 mL) enthalten. Bei Verdünnung auf 12,5 mL und Aufgabe von 4 mL in das Anreicherungssystem ergibt sich eine absolute Analytmenge von

6,4 ng, die im Vergleich mit der klassischen Methode nach § 64 LFGB (ca. 5 ng) in etwa in der gleichen Größenordnung liegt.

Es wurde auch die Gradientenelution genutzt, die schon bei der Methode nach § 35 LMBG Verwendung fand (siehe 2.1.3, Seite 62). Mit diesem Eluenten gelang die Elution der angereicherten Tetracycline von der Anreicherungssäule und die anschließende Trennung auf der analytischen Säule. Das Chromatogramm eines dotierten Honigs zeigt Abbildung 63. Die Signale für das epi-Tetracyclin und das epi-Chlortetracyclin sind darauf zurückzuführen, dass ein Honig verwendet wurde, der bereits 10 Tage zurückliegend dotiert worden war.

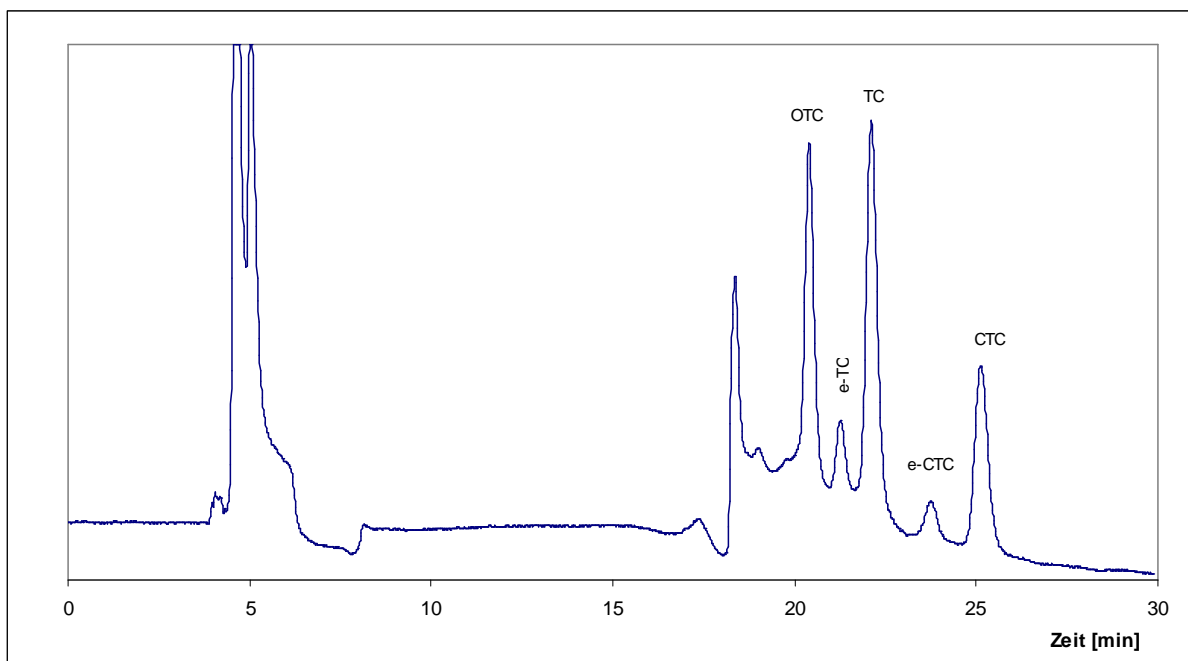


Abbildung 63 - Chromatogramm eines mit je 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTC, TC und CTC dotierten Honigs.

Das Chromatogramm des undotierten Honigs ist in Abbildung 64 zu sehen. Dabei wird deutlich, dass keine Störungen aus der Probenmatrix in dem Elutionsbereich der Tetracycline (20 bis 28 Minuten) vorhanden sind.

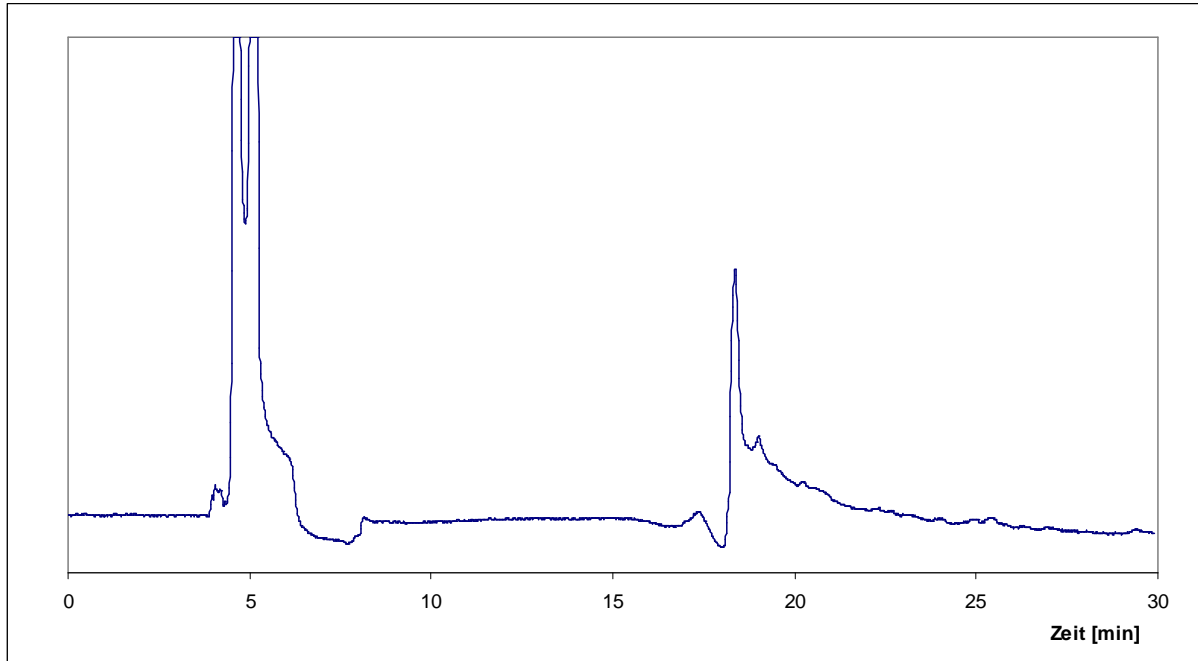


Abbildung 64 - Chromatogramm eines undotierten Honigs.

Abschließend kann gesagt werden, dass der Verzicht auf die Einengung keine nachteiligen Auswirkungen auf die Analytik der Tetracycline hat. Vielmehr ist, im Vergleich zur klassischen „§ 64 LFGB–Methode“, hier ein schonendes und zeitsparendes Verfahren mit gleicher Spezifität vorhanden.

2.8.2 Methode nach § 64 LFGB mit einer SPE

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die bei der „§ 64-Methode“ notwendige Einengung des Eluats der C₁₈-Extraktion mittels Rotationsverdampfer durch die online-Anreicherung mit einer Polymerphase ersetzt werden konnte, war es nahe liegend, auf die Anreicherung an der C₁₈-Festphase komplett zu verzichten. Die Anreicherung der Tetracycline an der C₁₈-Festphase dient in erster Linie der Entfernung der EDTA und aller ionischer Bestandteile, insbesondere der Kupferionen, der bei der Elution der Chelating-Sepharose erhaltenen Extrakte. Dieser Aufreinigungseffekt sollte mit der beim online-System verwendeten Polymerphase ebenso möglich sein. Dazu wurde als nächstes geprüft, ob die im Zuge der Aufreinigung erhaltenen Eluate von der Chelating-Sepharose direkt mit der Polymerphase online aufgereinigt werden können. Zunächst musste geprüft werden, welches Elutionsmittelvolumen zur vollständigen Elution der Tetracycline von der Affinitätssäule notwendig ist. Dazu wurden 10 mL einer Lösung von 5 mg Oxytetracyclin bzw. Chlortetracyclin auf die entsprechend der „§ 64-Methode“ mit 20 mL Kupfersulfatlösung vorkonditionierte und mit 15 mL Succinatpuffer gespülte Affinitätssäule gegeben, mit 10 mL Wasser, 30 mL Methanol und zweimal 10 mL Wasser nachgespült und schließlich zwanzigmal mit je 1 mL EDTA-Puffer eluiert und einzeln aufgefangen. Die gewonnenen Eluate wurden jeweils mit 3 mL Wasser verdünnt, in Probenvials abgefüllt und mittels HPLC untersucht. Die Ergebnisse zeigten folgendes Bild:

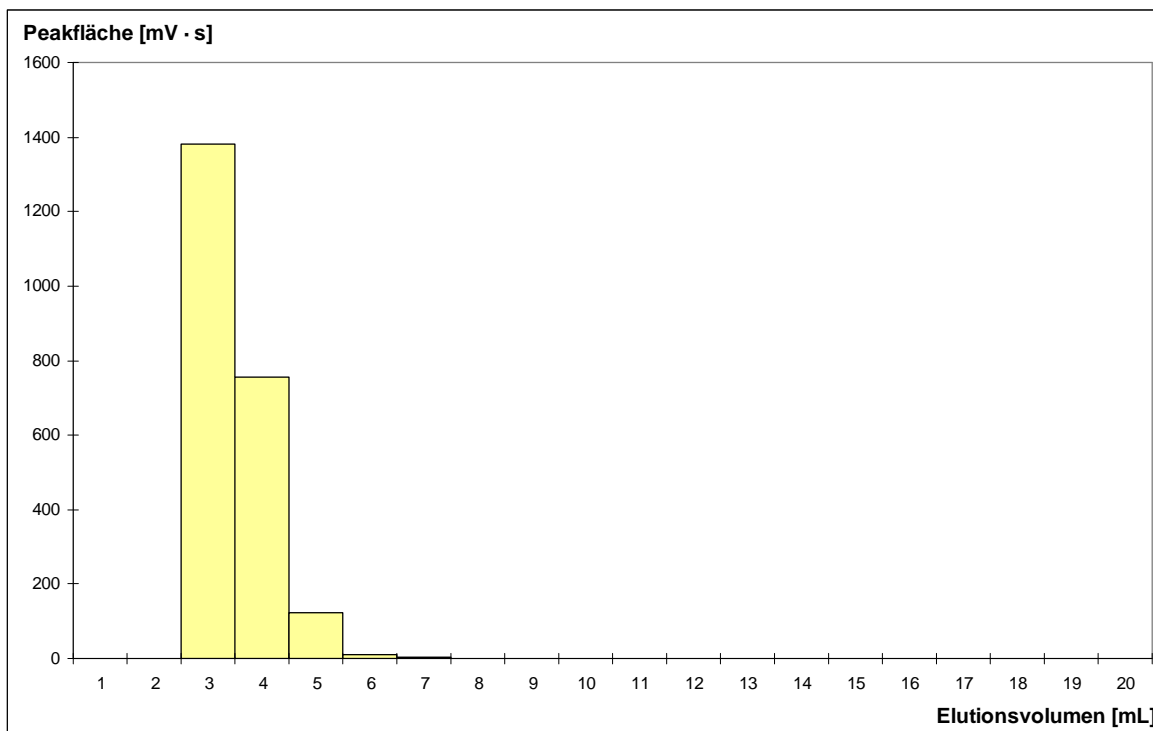


Abbildung 65 - Elutionsprofil für Oxytetracyclin von der Chelating-Sepharose mit EDTA-haltigem Puffer.

Wie in Abbildung 65 zu sehen, sind die ersten zwei Milliliter noch frei von Analyten. Es werden folglich mindestens zwei Milliliter EDTA-Puffer benötigt, um das noch in der Säule befindliche Wasser mit der nachfolgenden Elutionslösung zu verdrängen und die mobilisierten Analyten über die Säule zu transportieren. Mit dem dritten Milliliter wird dann der größte Teil (61%) des Oxytetracyclins eluiert, während die beiden folgenden Milliliter zusammen weniger als die Hälfte (33 und 5%) des Oxytetracyclins enthalten. Der sechste Milliliter enthält nur noch 1% Substanz und alle folgenden Eluatfraktionen zeigten keine Analytensignale mehr. Die Elution des Chlortetracyclins ist, wie Abbildung 66 zeigt, noch schneller mit geringerem Volumen zu erreichen. Hier sind bereits 69% des Chlortetracyclins in dem dritten Milliliter enthalten, während die sechste Fraktion bereits kein Chlortetracyclin mehr enthält.

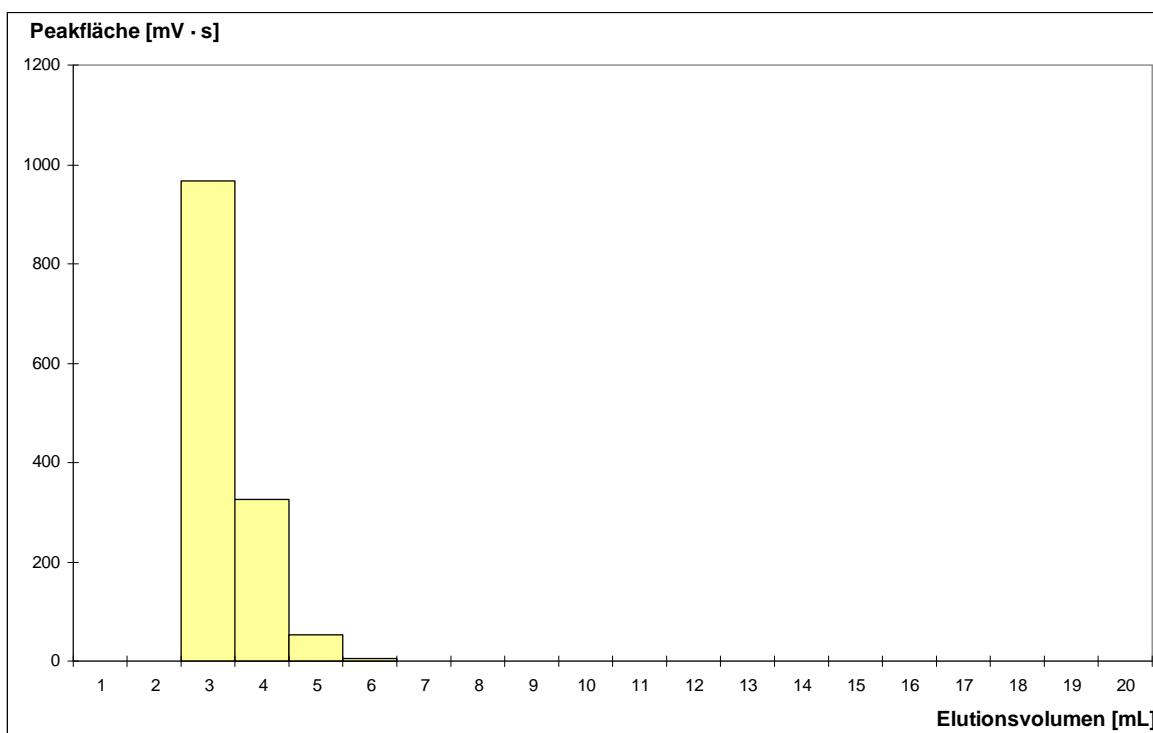


Abbildung 66 - Elutionsprofil für Chlortetracyclin von der Chelating-Sepharose mit EDTA-haltigem Puffer.

Dass die Elution des Chlortetracyclins von der Affinitätssäule geringfügig schneller vonstatten geht als die des Oxytetracyclins liegt vermutlich in erster Linie an der geringeren unspezifischen Bindung des vergleichsweise unpolaren Chlortetracyclins an der Festphase.

Es zeigte sich zwar ein für die Elution der Tetracycline von der Chelating-Sepharose ausreichendes Gesamtvolumen von 4 mL, jedoch können die zwei Milliliter Vorlauf aus praktischen Gründen nicht verworfen werden. Da sich in dem dritten Milliliter der größte Teil der zu eluierenden Tetracycline befindet, ist die Gefahr, beim Verwerfen der ersten zwei Milliliter einen Teil der Analyten nicht mit zu erfassen – auch bei präziser Arbeit – nicht auszuschließen. Daher wurde bei dieser Methodik mit insgesamt 8 mL eluiert, davon 4,25 mL in ein Probenfläschchen gegeben und 4 mL mit dem in 2.1.2 beschriebenen System analysiert. In Abbildung 67 ist ein Chromatogramm eines mit 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dotierten Honigs wiedergegeben.

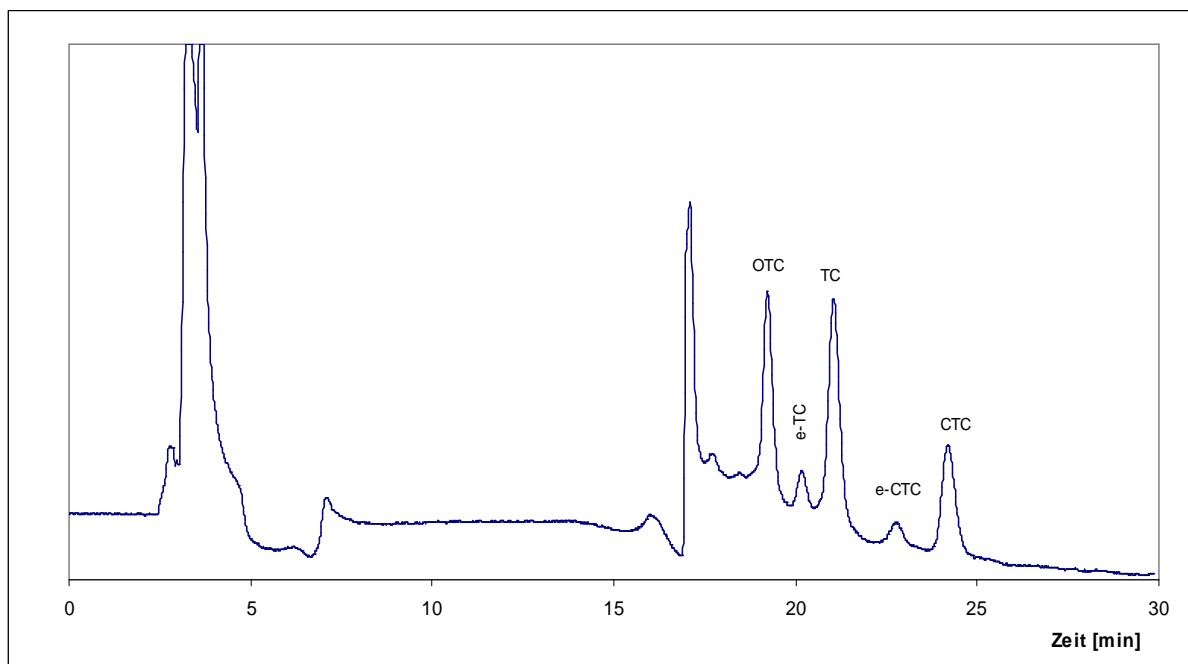


Abbildung 67 - Chromatogramm eines mit je 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTC, TC und CTC dotierten Honigs.

Bei einem angenommenen Gehalt von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, einer Einwaage von 10 g Honig und Aliquotierung (20 mL Filtrat) sind bei verlustfreier Aufreinigung 20 ng Analyt im Eluat der Sepharose-Festphase (8 mL) enthalten. Bei Aufgabe von 4 mL in das Anreicherungssystem ergibt sich eine absolute Analytmenge von 10 ng auf der analytischen Trennsäule. Diese Stoffmenge ist, verglichen mit der klassischen Methode nach § 35 LMBG, doppelt so hoch. Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit durch eine weitere Erhöhung der Injektionsmenge sollte angesichts des speziellen Aufbaus des Analysensystems möglich sein. Aufgrund des Aufbaus des automatisierten Anreicherungssystems und der Tatsache, dass es sich um rein wässrige Lösungen handelt, die sich auch in größeren Mengen ohne Störungen der Anreicherung über die Anreicherungssäule geben lassen, ergab sich die Möglichkeit, das Gesamteluat auf zwei Probenfläschchen mit je 4 mL aufzuteilen und davon jeweils 3,75 mL aus den zwei Probenfläschchen nacheinander aufzugeben. Das Analyseprogramm für die automatisierte Anreicherung wurde entsprechend angepasst. Zunächst werden bei der Probenaufgabe die ersten 3,75 mL aus dem ersten Probenfläschchen aufgezogen und in die Probenschleife des in 2.1.2 (siehe Abbildung 18) beschriebenen Systems gegeben. Dann wird das Schaltventil II umgeschaltet und die Probenlösung zur Anreicherungssäule gefördert. Nach diesem ersten Probentransfer schaltet das Ventil II wieder in die Aufgabeposition zurück, der Dilutor 0 zieht die nächsten 3,75 mL aus dem folgenden Probenfläschchen auf, gibt diese in die Probenschleife und spült mit 1 mL nach. Anschließend schaltet das Ventil II wieder um und der

Inhalt des zweiten Probenfläschchens wird zur Anreicherungssäule transferiert. Da Pumpe 2 die Probenlösungen mit Wasser fördert, kann die Pumpe direkt mit Wasser nachspülen und somit die Analyten auf der Anreicherungssäule von unerwünschten Begleitstoffen befreien. Anschließend schaltet das Schaltventil I um, und die HPLC-Pumpe 1 eluiert die Analyten mit dem Eluenten von der Anreicherungssäule und fördert diese zur analytischen Trennsäule.

Diese Variante war technisch ohne Probleme umsetzbar. Jedoch zeigten einige Chromatogramme deutliche Doppelpeaks (siehe Abbildung 65), während andere Chromatogramme dieses Phänomen nicht aufwiesen.

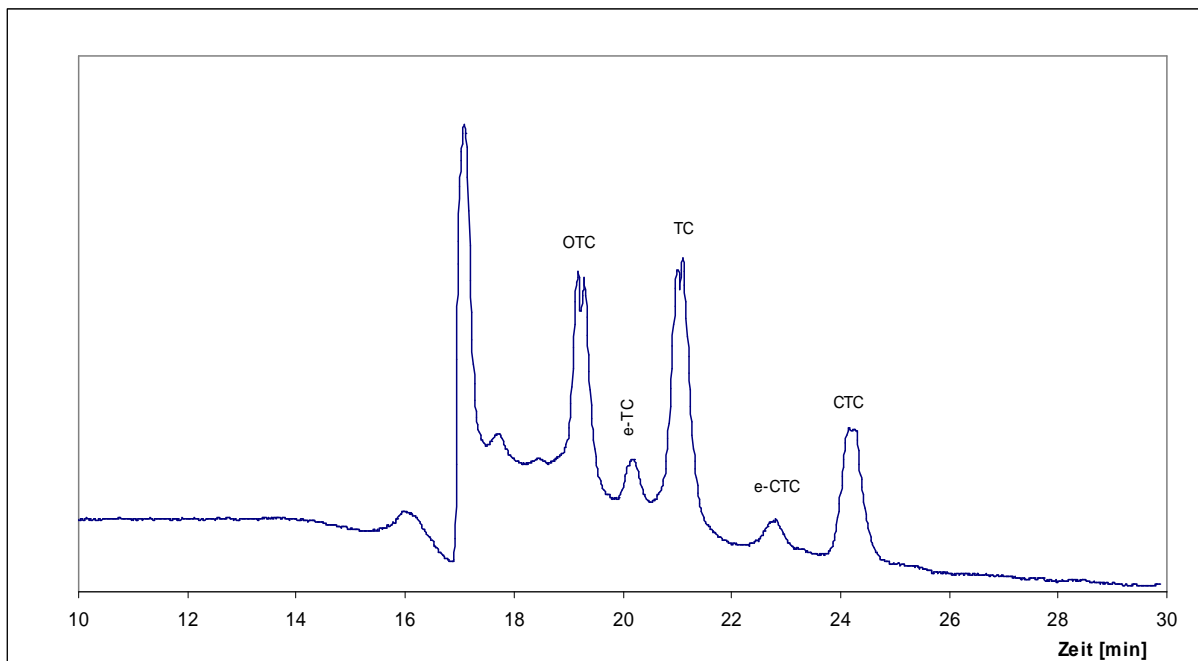


Abbildung 68 - Chromatogramm eines mit je 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTC, TC und CTC dotierten Honigs bei doppeltem Aufgabevolumen

Interessanterweise erschienen diese Doppelpeaks unabhängig von der analysierten Probe in jedem zweiten bis fünften Chromatogramm. Aufgrund des Auftretens dieser Doppelpeaks und der Tatsache, dass dieses Verhalten nicht reproduzierbar war, wurde die Technik mit der Möglichkeit aus zwei Vials nacheinander auf die Polymeranreicherungssäule aufgeben zu lassen, im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

2.8.3 Methode nach § 64 LFGB automatisiert

Basierend auf den Ergebnissen der teilweise automatisierten „§ 64–Methode“ war es wünschenswert, den Teil der Analytik, der weiterhin aufwändig durch Handarbeit durchzuführen war, ebenfalls in das automatisierte Aufarbeitungssystem mit einzubeziehen. Dazu war es erforderlich, die technischen Möglichkeiten des ASTED–Systems um eine weitere Festphasenextraktion zu erweitern. Durch den Einbau eines zusätzlichen Sechsweg–Schaltventils sowie unter Nutzung des 1 zu 6–Schaltventils ist es technisch möglich, die bestehende Anlage zu einem zweistufigen Anreicherungssystem zu modifizieren. Das genaue Schaltbild zeigt Abbildung 69:

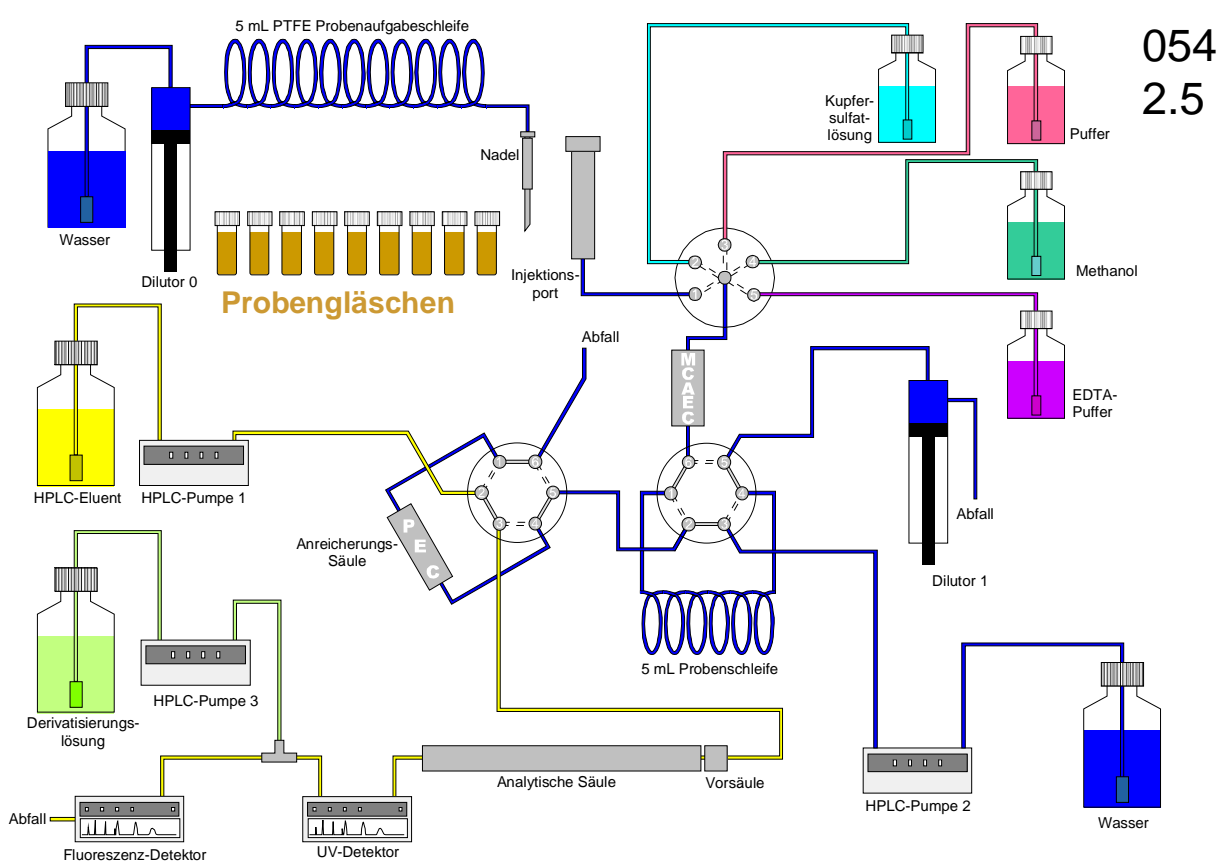


Abbildung 69 - Das für die automatisierte, zweistufige Festphasenanreicherung modifizierte System

Anm.: Die Farben der einzelnen Lösungen dienen ausschließlich der Illustration.

Die wesentliche Änderung gegenüber der für die Online-Dialyse verwendeten Anlage ist der Ersatz der Dialysekammern durch eine Festphasenextraktionskartusche mit der Chelating-Sepharose. An das 1 zu 5–Ventil wurden die für die Konditionierung und Spülung der Sepharose-Säule notwendigen vier Lösungen angeschlossen.

Bei einem ersten Versuch, dieses Verfahren zu automatisieren wurde der Dilutor 1 derart angeschlossen, dass die Lösungen (Kupfersulfatlösung, Puffer, Methanol und EDTA-Puffer) vom Dilutor 1 durch die Säule gedrückt wurden. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Lösungen vom Dilutor nicht vollständig wieder abgegeben werden konnten. Dies war am eindruckvollsten bei der Kupfersulfatlösung zu erkennen. Nachdem der Dilutor diese über die Sepharose-Säule gegeben hatte, und mit der Pufferlösung nachspülte, blieb bei den folgenden zwei Kolbenhüben ein deutlicher, blau gefärbter Ring in der Pufferlösung am unteren Ende, direkt am Stempel, sichtbar. Daher war die Verwendung des Dilutors für die Aufgabe der Probe und der einzelnen Spüllösungen nicht möglich.

Zudem konnte die mit dem Dilutor 0 aufgezugene Probe nicht vollständig über die Sepharose-Säule gegeben werden, da aufgrund des von der Sepharose-Säule aufgebauten Rückdruckes immer wieder Undichtigkeiten am Injektionsport auftraten.

Diese zwei Probleme konnten mit dem in Abbildung 69 dargestellten Aufbau gelöst werden. Der Ablauf einer Analyse ist folgendermaßen:

1. Der Dilutor 1 zieht zunächst die Kupferlösung durch die Sepharose-Säule, um diese mit den Kupferionen zu beladen. Das Durchziehen der Lösung entspricht dem gleichen Prinzip, wie es bei der Offline-Methodik auch praktiziert wird.
2. Anschließend wird vom Dilutor das zur vollständigen Entfernung der ungebundenen Kupferionen notwendige Volumen Pufferlösung durch die Sepharose-Säule gesaugt.
3. Danach erfolgt die Probenaufgabe. Dazu zieht der Dilutor 0 3,75 mL der Probe aus dem entsprechenden Probengläschen und gibt diese in den Injektionsport ab, während der Dilutor 1 gleichzeitig das gleiche Volumen ansaugt. Durch das spezielle Design der ASTED-Anlage und der dazugehörigen Steuerung der Schrittmotoren der Dilutoren ist das gleichzeitige Abgeben des einen Dilutors und Anziehen des anderen Dilutors mit exakt der gleichen Flussrate möglich. Dadurch wird gewährleistet, dass keine Probenverluste durch mögliche Undichtigkeiten am Injektionsport bei Aufgabe nur durch den Dilutor 0 auftreten.
4. Anschließend wird die Probenaufgabe, d.h. der Injektionsport und die Nadel, mit Wasser aus dem Vorratsgefäß des Dilutors 0, auch wieder mit gleichzeitiger Ansaugung durch Dilutor 1, nachgespült. Dadurch wird sichergestellt, dass die Probe

vollständig über die Sepharose-Säule gegeben wird. Zudem ist das bereits der erste Spülschritt nach der Probenaufgabe.

5. Darauf folgend wird die Sepharose-Säule mit den gebundenen Analyten vom Dilutor 1 mit Methanol nachgespült.
6. Das Methanol wird vom Dilutor 0, wieder unter Mithilfe des Dilutors 1 durch Spülen mit Wasser aus der Sepharose-Säule entfernt.
7. Danach werden mittels EDTA-Puffer die Analyten von der Sepharose-Säule durch Dilutor 1 eluiert. Das Eluat wird dabei durch die richtige Einstellung des Sechsweg-Ventils II in der 5 mL-Probenschleife gesammelt.
8. Nach Abschluss der Elution wird das in der Probenschleife gesammelte Eluat durch Pumpe 2 zur Polymer-Anreicherungssäule gefördert.
9. Zur Entfernung der EDTA-Kupferkomplexe und Pufferbestandteile, spült die Pumpe 2 die Polymer-Anreicherungssäule mit Wasser nach.
10. Schließlich schaltet das Ventil I um und die Analyten werden von der Polymer-Anreicherungssäule zur analytischen Trennsäule gefördert, dort aufgetrennt und anschließend detektiert.

Falls erforderlich, kann durch Zupumpen einer Derivatisierungslösung durch HPLC-Pumpe 3 eine Nachsäulenderivatisierungslösung vor der Fluoreszenzdetektion erfolgen.

Die den Ablauf der Analysen steuernden Programme werden in einer proprietären, der bekannten Programmiersprache BASIC angelehnte, einfach zu erlernenden Programmiersprache an einem handelsüblichen Personal Computer (PC) geschrieben, anschließend kompiliert (übersetzt) und über eine serielle Schnittstelle als ASCII-Code an den Probengeber transferiert. Der automatische Probengeber arbeitet als zentrale Steuerungseinheit das Programm ab, eine Verbindung zu einem PC ist dabei nicht mehr erforderlich. Bedingt durch den mit 8 KByte relativ geringen Arbeitsspeicher des Probengebers können nur kleine Programme in den Speicher geladen werden. Durch effizientes Programmieren konnten jedoch alle Programme in ihrer Größe so klein gehalten werden, dass eine aufwändigere Programmierung mittels Unterprogrammstrukturen vermieden werden konnte, da alle Programmteile gleichzeitig im Speicher des Probengebers Platz fanden. Eine Besonderheit dieses Probengeber, ist die Möglichkeit, die Befehle an die angeschlossenen Geräte auszugeben und das Programm weiter abzuarbeiten, während die

Geräte die empfangenen Kommandos weiter ausführen. Diese Programmtechnik wird von dem Hersteller des ASTED-Systems als „concurrent mode“ bezeichnet. Dabei kann beispielsweise einem Dilutor ein Befehl erteilt werden und das Programm wird weiter abgearbeitet werden. Während der Dilutor den erteilten Befehl ausführt, kann jetzt beispielsweise einem zweiten Dilutor ein weiterer Befehl gegeben werden, ohne dass der erste Dilutor seinen Befehl vollständig abgearbeitet haben muss. Bei dem hier gezeigten Programm ist das gleichzeitige Arbeiten der Dilutoren zur Anwendung gekommen.

Die Kommunikation mit dem Benutzer ist nur noch über das mit dem Probengeber verbundene Eingabemodul möglich. Nach dem Start des Programms wird nur noch die Anzahl der Proben abgefragt, weitere Eingaben seitens des Benutzers sind nicht erforderlich.

Nachfolgend eine kurze Aufstellung von Vor- und Nachteilen einer automatisierten Analysenmethode auf der Basis einer HPLC–Methode mit SPE als Probenvorbereitung:

Vorteile

- Weniger menschliche Fehlerquellen als bei der manuellen Probenvorbereitung
- Unbeaufsichtigter 24 Stunden-Betrieb möglich
- Probendurchsatz größer, wenn reduzierte Probenvorbereitung möglich
- Reproduzierbarkeit größer
- Geringerer Lösungsmittelverbrauch
- Reduzierter Umgang des Personals mit Lösungsmitteln
- Weniger Reinigung von Gerätschaften notwendig
- Keine thermische Belastung durch Verzicht auf Einengung

Nachteile

- Investition in Geräte notwendig
- Störungssuche gestaltet sich aufwändiger
- Bei Defekt einer Teilkomponente Ausfall der gesamten Analysenmethode
- Lösungsmittelauswahl bei SPE eingeschränkt
- Serviceaufwand
- Bedienungsaufwand
- Personaleinarbeitung und -einweisung notwendig
- Anreicherungsmaterial muss mehrfach verwendbar sein

Der Ablauf der Analysen ist trotz der hohen technischen Komplexität des hier gezeigten Systems auch über längere Serien von bis zu 36 Proben vollautomatisch und unbeaufsichtigt möglich.

Allerdings ist dies nur dann zu erreichen, wenn die Honigproben mittels Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ filtriert worden sind. Bei unfiltrierten Honigproben entsteht bereits nach wenigen aufgegebenen Proben ein hoher Rückdruck durch die Sepharose-Säule, der eine verlustfreie Aufgabe mit den Dilutoren unmöglich macht. Mit der kleineren Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ war eine Filtration der Honige nicht möglich. Als wichtigste Voraussetzung für einen störungsfreien Ablauf der Analytik zeigte sich Filtration der Proben. Aufgrund der an vielen Stellen des Systems verwendeten sehr dünnen Kapillaren und der Schaltventile ist einer Verstopfung des Systems unbedingt vorzubeugen, denn eine Verwendung von Kapillaren mit größerem Innendurchmesser ist aufgrund größerer Totvolumina teilweise nicht angezeigt.

2.8.3.1 Optimierungen

Nachdem sich die Eignung des Materials welches zur Anreicherung der Tetracycline aus wässriger Lösung verwendet worden war, gezeigt hatte, war diese Eignung auch für die Chelating-Sepharose nachzuweisen. Prinzipiell ist diese Eignung durch die Mehrfachverwendung im Rahmen der Probenvorbereitung der amtlichen Methode nach § 64 LFGB nachgewiesen. Bei der online-Methodik sind jedoch geringere Säulendimensionen und somit ein geringeres Volumen der Sepharose im Einsatz. Insbesondere die Aufgabegeschwindigkeit stellt einen der zu optimierenden Parameter dar.

Zunächst wurden Standardlösungen von Tetracyclin mit diesem System analysiert und die erhaltenen Flächenwerte mit denen von Direktinjektionen verglichen. Für den Vergleich wurden jeweils Injektionsvolumina von $20\ \mu\text{L}$ verwendet. Das Programm wurde derart angepasst, dass zuerst $2000\ \mu\text{L}$ Wasser aus dem Vorrat von Dilutor 0, anschließend $20\ \mu\text{L}$ aus dem Probenfläschen und schließlich noch einmal $1730\ \mu\text{L}$ Wasser aufgezogen und in das System gegeben wurden. Die ermittelten Flächenwerte sind in Tabelle 16 dargestellt.

Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Flächeneinheiten (Direktinjektion)	Flächeneinheiten (System)	Wiederfindung
500	776	368	47,4%
1000	1153	534	46,3%
2500	2344	1017	43,4%
5000	4123	1596	38,7%
10000	7388	2268	30,7%

Tabelle 16 - Flächenwertevergleich zwischen automatisierter Aufarbeitung und Direktinjektion

Die Abbildung 70 zeigt den Sachverhalt grafisch. Es ist deutlich zu sehen, dass die Wiederfindungen der automatisiert aufgearbeiteten Lösungen mit zunehmendem Analytgehalt deutlich abnehmen.

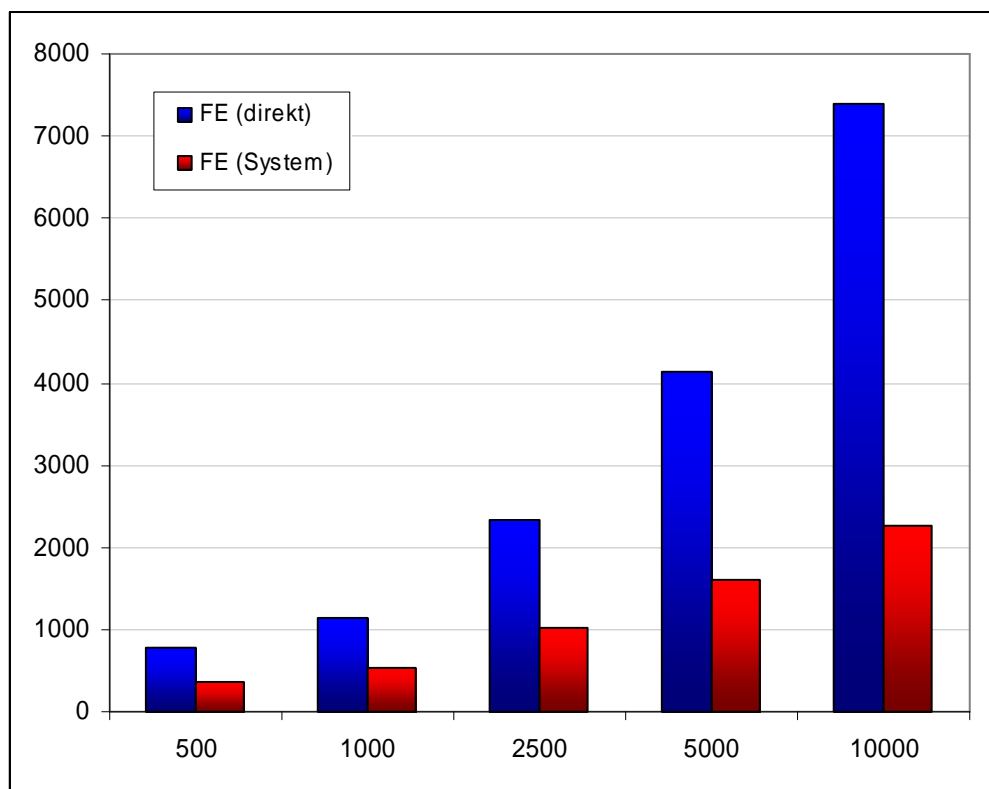


Abbildung 70 - Darstellung der Flächenwerte im Vergleich von automatisierter Aufarbeitung und Direktinjektion

Während die Flächeneinheiten für die Direktinjektion einen annähernd linearen Zusammenhang zeigen, flacht die Kurve für die mit dem automatisierten System aufgearbeiteten Lösungen mit zunehmender Analytkonzentration deutlich ab (Abbildung 71).

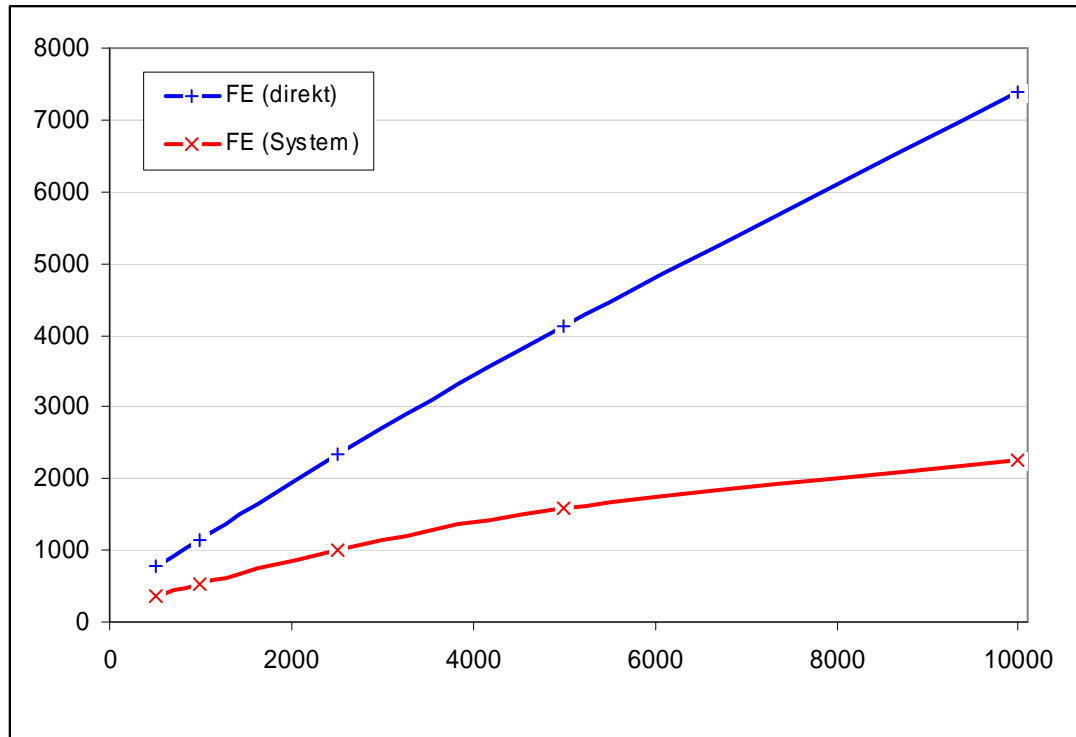


Abbildung 71 - Linearer Zusammenhang zwischen automatisierter Aufarbeitung und Direktinjektion

Als Erklärungsmöglichkeiten für dieses Verhalten können

- eine nicht ausreichende Bindungskapazität der Sepharose-Säule,
- eine unzureichende Gleichgewichtseinstellung bei der Retention der Tetracycline an dem immobilisierten Kupfer,
- Verluste bei den einzelnen Waschschritten oder
- eine nicht erschöpfende Mobilisierung der Analyten nach den Aufbrechen des Komplexes mittels EDTA sein.

Optimierung der Probenaufgabe

Durch einige Veränderungen an der Probenaufgabe, insbesondere einer langsameren Probenaufgabegeschwindigkeit und der Verwendung einer größeren Probenaufgabemenge sowie durch Verwendung einer verdünnten Standardlösung konnte die Wiederfindung deutlich gesteigert werden. Tabelle 17 gibt über die Wiederfindungen bei Aufgabe von 3,75 mL Lösung Auskunft.

Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Flächeneinheiten (Direktinjektion)	Flächeneinheiten (System)	Wiederfindung
500	789	496	62,9%
1000	1235	839	67,9%
2500	2348	1637	69,7%
5000	4048	2781	68,7%
10000	7435	5279	71,0%

Tabelle 17 - Flächenwertevergleich zwischen automatisierter Aufarbeitung und Direktinjektion nach Optimierung der Probenaufgabe

Diese Daten (siehe Abbildung 72) zeigen eine bessere Linearität für die mit dem automatisierten System ermittelten Signale.

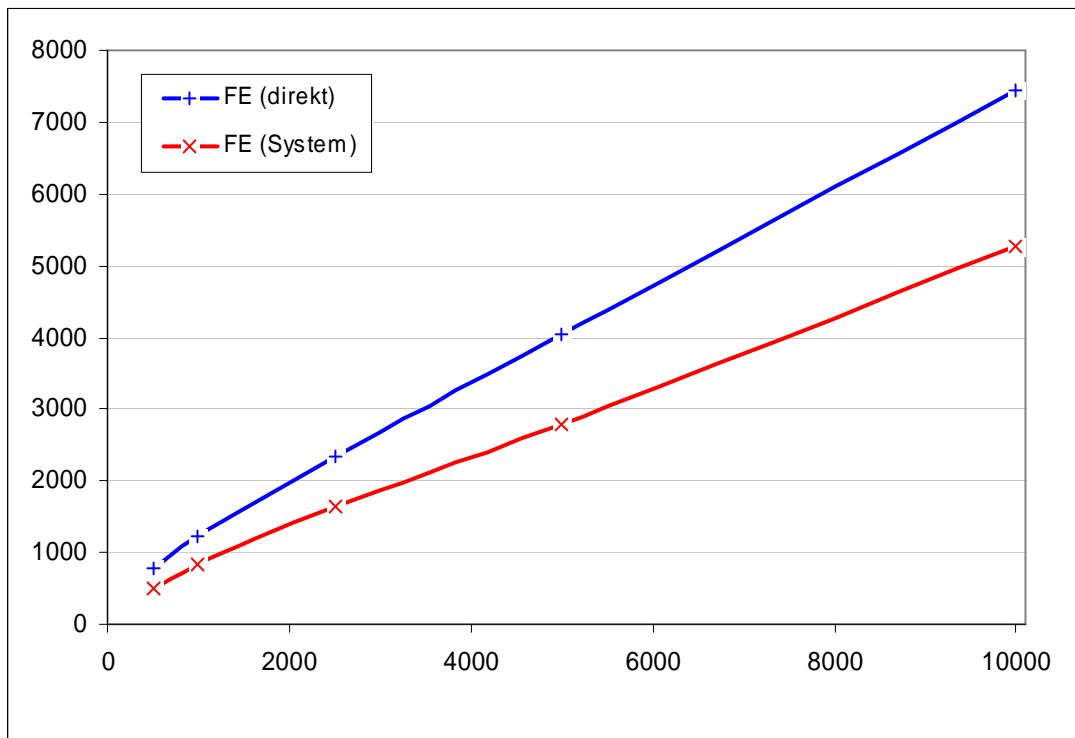


Abbildung 72 - Flächenwertevergleich zwischen automatisierter Aufarbeitung und Direktinjektion nach Optimierung der Probenaufgabe

Optimierung des pH-Wertes

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Anreicherung zu überprüfen wurden Standardlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt und mit dem beschriebenen System untersucht. Dazu wurden Pufferlösungen mit pH-Werten von 4,0 bis 7,6 hergestellt und

mit je 1 mg/L Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin dotiert. Die Puffergemische wurden wie in Anhang 5.3 angegeben angesetzt.

Diese Lösungen wurden mit dem beschriebenen System automatisch aufgearbeitet und ergaben die in Tabelle 18 aufgeführten Wiederfindungen.

pH	OTC	TC	CTC
3,4	72,5	77,6	77,1
3,7	77,6	76,4	76,4
4,0	79,8	78,8	78,4
4,3	81,3	80,5	81,3
4,6	83,5	82,3	80,6
4,9	82,6	81,4	81,1
5,2	80,1	79,8	80,0
5,5	81,2	79,7	78,2
5,8	78,4	78,4	78,8
6,1	76,6	77,5	74,5
6,4	72,1	74,6	75,4
6,7	70,5	73,0	74,8
7,0	68,6	69,8	71,2
7,3	52,9	57,1	62,6
7,6	45,6	52,6	55,6

Tabelle 18 - Darstellung der Wiederfindungsdaten bei der Optimierung der Wiederfindung

In Abbildung 73 sind die pH-abhängigen Wiederfindungsdaten grafisch dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Wiederfindungen in einem Bereich zwischen pH 4 und pH 5 ein Maximum haben und dass pH-Werte > 7 für diese Aufarbeitung ungeeignet sind.

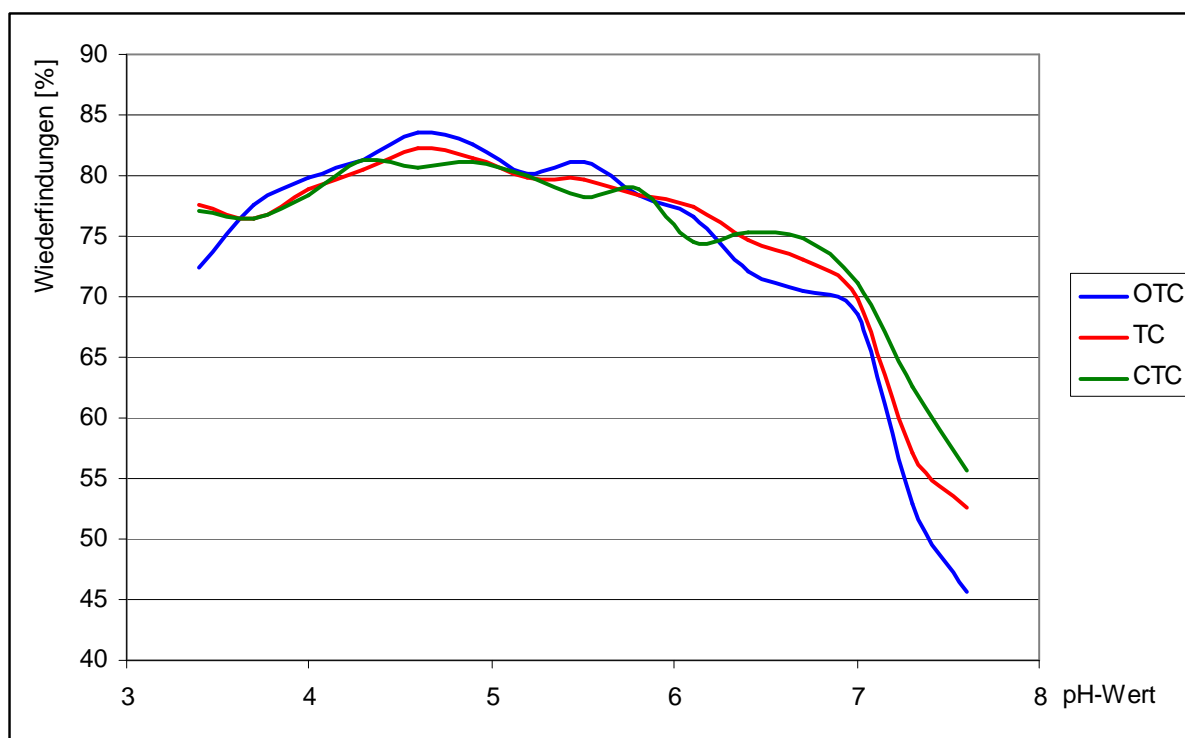


Abbildung 73 – Grafische Darstellung der Wiederfindungsdaten bei der Optimierung der Wiederfindung

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Wiederfindungen am höchsten sind, wenn die Proben mit einem Puffer im pH-Bereich um 4,6 aufgearbeitet werden. Die Anwendung eines Puffers mit dem pH-Wert 4,5 wird bei diversen beschriebenen Methoden vorgeschlagen und die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Einstellung des pH-Wertes für eine bessere Anreicherung auch bei der hier praktizierten Methodik sinnvoll ist. Insbesondere ist darauf zu achten, dass die verdünnten Honiglösungen einen pH-Wert im Bereich von 4,3 bis 4,9 aufweisen.

Optimierung der Chromatographie

Da bei dem gewählten pH-Wert von 4,5 die Epimerisierung der Tetracycline bereits merklich voranschreitet, muss die Methode in der Lage sein, die Epimere mit zu erfassen. Durch die gewählte Chromatographie ist die Trennung von epi-Oxytetracyclin und epi-Tetracyclin gewährleistet, während das Epi-Oxytetracyclin mit dem Oxytetracyclin coeluiert. Leider zeigte sich während einer Reihe von Untersuchungen, dass die Chromatographie bei den gewählten Bedingungen nicht reproduzierbar abläuft. Die Retentionszeiten verschoben sich hin zu kürzeren Zeiten, wodurch eine Trennung der Tetracycline von den jeweiligen Epimeren nicht mehr gewährleistet war. Insbesondere das Oxytetracyclin, welches als erste Substanz von der Säule eluiert, wurde zeitlich so weit nach vorn geschoben, dass eine

Trennung von den durch Störsubstanzen erzeugten Peaks aus den Honigen nicht mehr gelang. Auch bei direkt auf die Säule gegebenen Testmischungen wurden die ungünstig veränderten Retentionszeiten bestätigt, so dass darauf geschlossen werden konnte, dass die automatisierte Aufarbeitung zu einer zunehmenden Verschlechterung der Trennleistung der Chromatographiesäule führt. Leider ließen sich derart in ihrer Beschaffenheit veränderte analytische Trennsäulen nicht mehr durch längere Spülungen oder komplette Reinigungen, wie sie für Umkehrphasen üblicherweise durchgeführt werden, wieder in ihrer Trennleistung verbessern. Dieses Phänomen zeigte sich unabhängig von der vorherigen Nutzung einer Trennsäule immer in gleicher Weise. Dieser ungewünschten Entwicklung konnte durch Einsatz eines etwas weniger konzentrierten EDTA-Elutionspuffers etwas entgegengewirkt werden. Allerdings verlangsamte sich der beobachtete Prozess dadurch lediglich etwas, aufhalten ließ er sich damit nicht, denn schließlich wurde eine Konzentration an EDTA im Puffer benötigt, die geeignet war, die Analyten von der Chelating-Sepharose zu eluieren. Bei einem versuchsweise eingesetzten sehr verdünnten EDTA-Puffer (0,01 mol/L statt 0,1 mol/L EDTA) zeigte sich eine deutlich geringere Wiederfindung. Die Ursache konnte leider nicht ermittelt werden.

Möglicherweise verändert eventuell auf die Trennsäule gelangte EDTA die Trenneigenschaften der Säulenpackung. Die Trennung auf der Säule wird zu einem kleinen Anteil auch durch möglicherweise in dem verwendeten modifizierten Trägermaterial enthaltenen Metallkationen beeinflusst. Werden diese Metallkationen durch EDTA aus der Säule entfernt oder maskiert, können diese mit den Tetracyclinen keine Wechselwirkung mehr eingehen und die Trennung verändert sich. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die vorhandenen Metallionen aus dem Packungsmaterial und der Säulenwandung zu dem bei nahezu allen flüssigchromatographisch durchgeführten Trennungen von Tetracyclinen beobachteten Tailing der Peaks führt. Durch den Einsatz von Ionenpaarreagenzien konnte die Trennung der Tetracycline auf der Umkehrphase wieder verbessert werden; der beobachtete Effekt der Retentionszeitverschiebung tritt aber trotzdem auf. Erst durch Verwendung einer Polymerphase konnte dieser Effekt stärker zurückgedrängt werden. Aufgrund der chemischen Struktur des Packungsmaterials der Polymerphase tritt ein anderer Effekt für die Trennung in den Vordergrund. Die Polymerphase besteht aus einem ähnlichen Material wie die Anreicherungsphase (siehe 2.8.1). Diese Struktur führt zu einer Wechselwirkung der π -Elektronen zwischen den Benzolringen des Packungsmaterials und

den Tetracyclinen. Diese für die Trennung der Tetracycline verantwortliche Wechselwirkung wird offensichtlich von der EDTA nicht beeinflusst.

In Abbildung 74 ist ein mit dieser Methodik erhaltenes Chromatogramm einer oxalsauren wässrigen, sieben Tage alten Lösung von je 200 $\mu\text{g/L}$ OTC, TC und CTC zu sehen. Analysiert wurde die Lösung mit einer Phenomenex PolymerX Trennsäule mit einem Eluenten aus 0,01 mol/L Oxalsäure und Acetonitril 3:7 (v/v) und einer UV-Detektionswellenlänge von $\lambda=360$ nm. Es sind die Peaks für die Ursprungssubstanzen, und, da die Epimerisierung nach einigen Tagen bereits merklich eingesetzt hat, die kleineren Peaks für die entstandenen Epimere zu sehen. Das epi-Oxytetracyclin war bei den gewählten Trennbedingungen nicht vom Oxytetracyclin zu trennen, so dass beide Substanzen coeluierten.

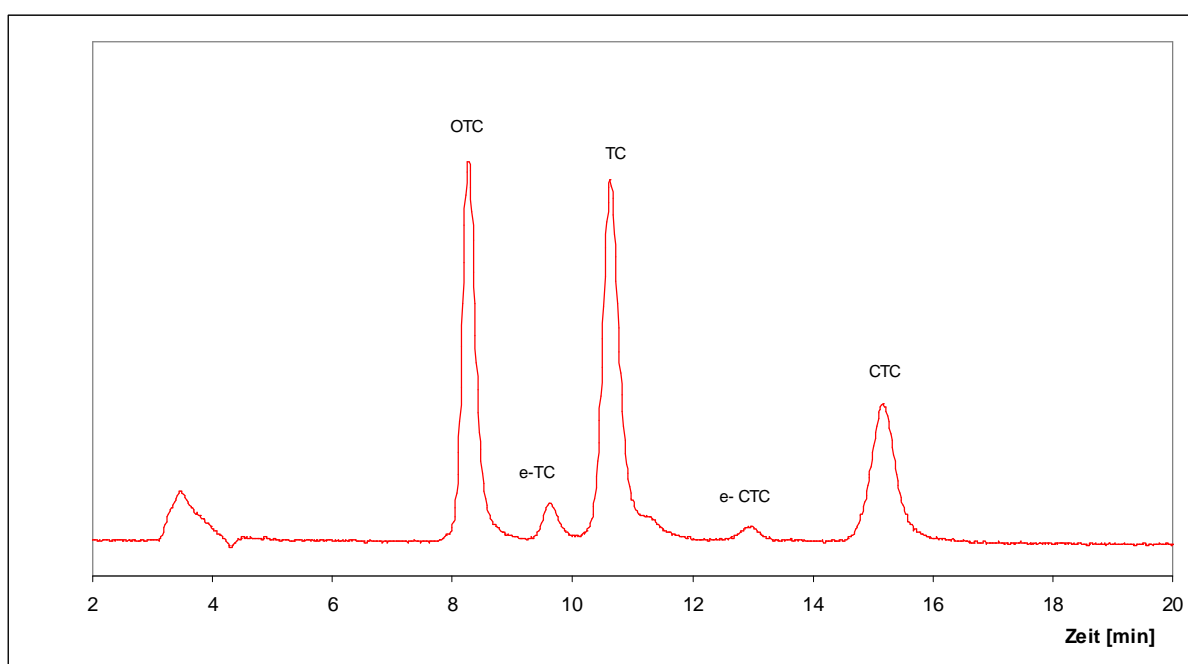


Abbildung 74 - Chromatogramm einer Standardlösung mit je 200 $\mu\text{g/L}$ OTC, TC und CTC

Das in Abbildung 75 gezeigte Chromatogramm resultiert aus einer Aufarbeitung eines mit je 200 $\mu\text{g/kg}$ Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin sowie den jeweiligen Epimeren dotierten Honigs. Während die einzelnen Peaks für das Tetracyclin und das Chlortetracyclin einschließlich ihrer Epimere basisliniengetrennt zu sehen sind, ist im Bereich des Oxytetracyclins ein deutlicher, aus dem Honig stammender Störpeak zu beobachten.

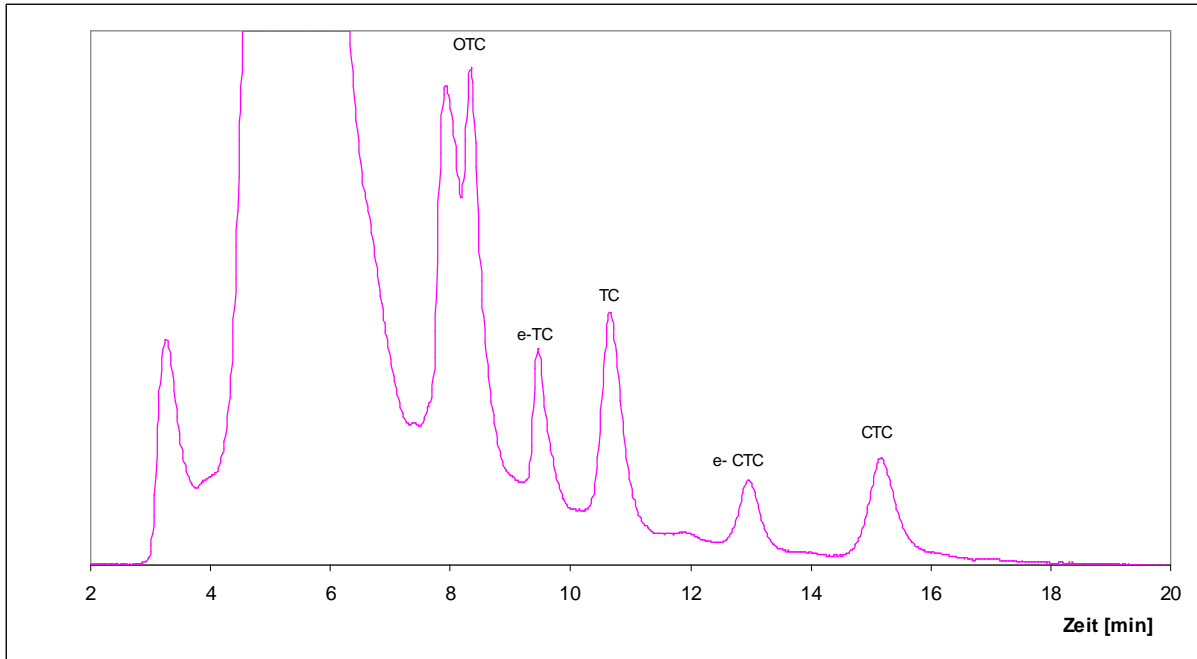


Abbildung 75 - Chromatogramm eines mit je 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTC, TC, epi-TC, CTC und epi-CTC dotierten Honigs

Dass dieser Störpeak vom Honig verursacht wird, zeigt das Chromatogramm in Abbildung 76, welches den schon in Abbildung 75 gezeigten großen Peak bei der Retentionszeit von acht Minuten zeigt. Es handelt sich dabei um denselben Honig, welcher für die Chromatographie des dotierten Honigs in Abbildung 75 verwendet worden war.

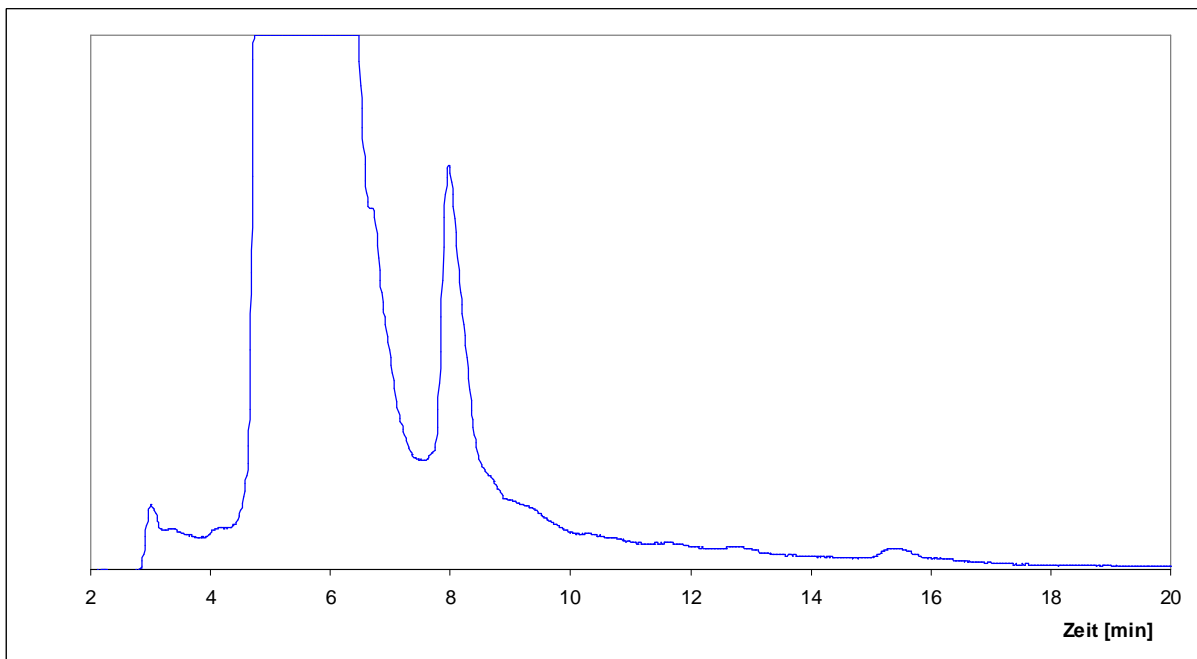


Abbildung 76 - Chromatogramm eines undotierten Honigs

Es wurden eine ganze Reihe unterschiedlicher Honige nach der hier beschriebenen Methode aufgearbeitet. Dabei wurden, um das Spektrum von möglichen Störungen zu untersuchen, Honige verschiedenster Art untersucht. Verwendet wurden helle Honige wie Rapshonig oder KleeHonig, Mischhonige, bis hin zu sehr dunklen Honigen wie beispielsweise der nahezu schwarze Weißtannenhonig. Dabei zeigte sich, dass die Störungen, die im Bereich der Retentionszeiten der Analyten auftraten, bei den Blatt- oder Waldhonigen deutlich stärker ausgeprägt waren als bei den Nektarhonigen. Das liegt vermutlich vordergründig daran, dass die Bienen den von Lachniden (Pflanzenläuse) ausgeschiedenen Honigtau aufnehmen und zu Honig reifen lassen. Bei dem Honigtau handelt es sich um verdauten Siebröhrensaft diverser Pflanzen, meistens Fichten, Weißtannen und Edeltannen. Bei den Nektarhonigen nehmen die Bienen den von der Pflanze angebotenen Blütennektar auf, um diesen zum Honig reifen zu lassen. In erster Linie sind es die im Nektar enthaltenen Zucker, die von den Bienen benötigt werden. Dieser von den Pflanzen über die Blüten abgegebene Saft enthält im Gegensatz zu den von den Lachniden gesaugten Siebröhrensäften kaum andere Inhaltsstoffe. Die im Siebröhrensaft der Pflanze enthaltenen Inhaltsstoffe werden aber zum Teil von den Lachniden mit dem Honigtau ausgeschieden, von den Bienen mit aufgenommen und durch den Reifungsprozess des Honigs, der praktisch einer Eindickung des Honigtaus gleichkommt, noch aufkonzentriert. Das dürfte die hauptsächliche Ursache für die Schwierigkeiten bei der Analyse von Rückständen in Honigtauhonigen sein. Somit stellt die Analyse von Honigtauhonigen die größten Herausforderungen an die Analyseverfahren.

2.8.3.2 Qualitätskenndaten der Chromatographie

Linearität

Die Linearität eines Messverfahrens beschreibt den Konzentrationsbereich, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration der untersuchten Analyten und dem Messsignal des Detektors besteht. Bei flüssigchromatographischen Systemen mit Messungen im UV-Bereich besteht häufig ein linearer Zusammenhang über einige Zehnerpotenzen des Konzentrationsbereiches. Bei dem hier vorgestellten System ist die Linearität über einen Konzentrationsbereich von 20 bis 600 μg der jeweiligen Tetracycline pro kg Probe untersucht worden. Eine Prüfung der unter 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ war aufgrund der unzureichenden Empfindlichkeit der Methode nicht möglich; über 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wurde nicht geprüft, da der MRL mit dem höchsten Wert bei 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Leber festgesetzt wurde [Verordnung (EWG) 2377/90] und somit keine Erfordernis besteht, höhere Werte zu messen. Zudem könnten Proben mit höheren Gehalten entsprechend verdünnt werden, um Messergebnisse im kalibrierten Bereich zu erhalten.

Zunächst war, da es sich bei der chromatographischen Trennung um ein neues Trennsystem handelt, die Linearität der Chromatographie zu prüfen. Dazu wurden Standardlösungen mit Konzentrationen von je 15, 35, 60 und 100 ng aller drei relevanten Tetracycline über eine Probenschleife mit einem Volumen von 20 μL manuell eingespritzt und analysiert. Die Konzentration der Lösung mit 35 ng pro 20 μL entspricht in etwa einer Probelösung von 3,75 mL eines eins zu eins mit Probenverdünnungslösung verdünnten Honigs mit einem Analytgehalt von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

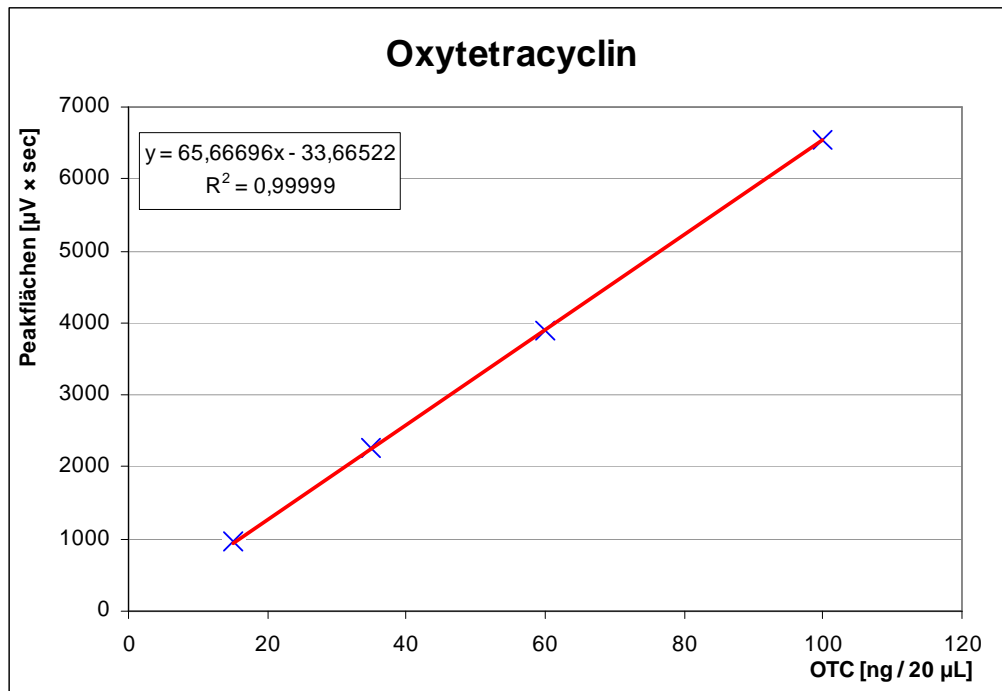


Abbildung 77 - Kalibrierfunktion zur Ermittlung des linearen Bereichs für Oxytetracyclin nach Direktinjektion

Zur Veranschaulichung des linearen Zusammenhangs zwischen Konzentration der Analyten und dem Messsignal im gewählten Bereich bietet sich die Auftragung des Quotienten aus der Peakfläche des Signals und der dazugehörigen Konzentration. In der Literatur häufig als Response-Wert bezeichnet, ermöglicht er, die Streuung um die jeweilige Konzentration besser zu erkennen, als es die Kalibrierfunktion ermöglicht.

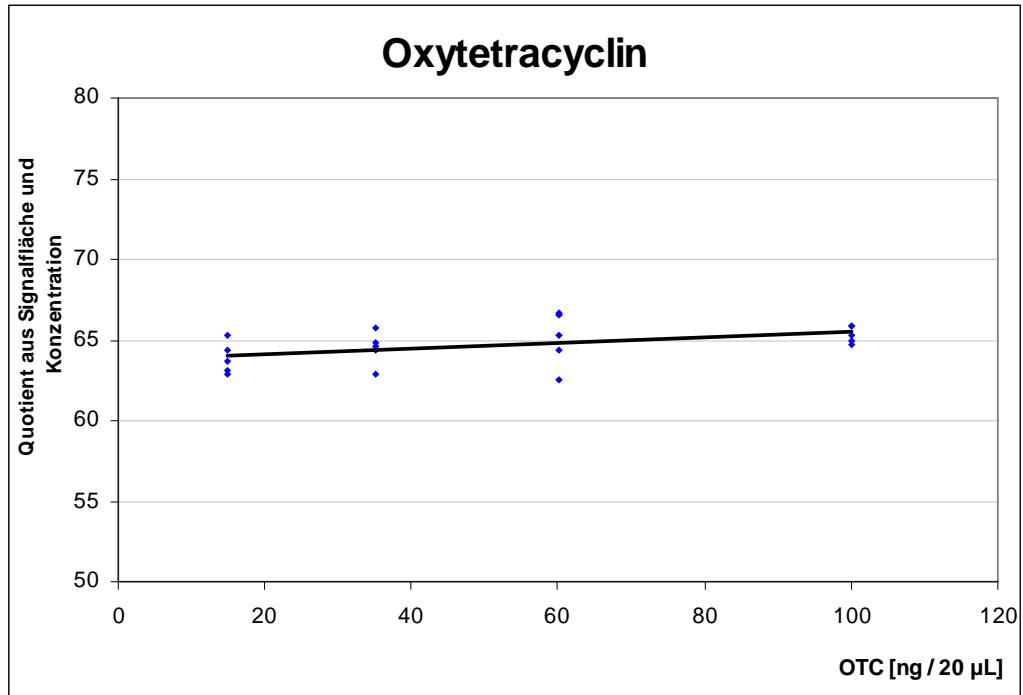


Abbildung 78 - Response-Werte für Oxytetracyclin nach Direktinjektion

In Abbildung 79 bis Abbildung 82 sind die entsprechenden Kalibrierfunktionen und Response-Werte für Tetracyclin und Chlortetracyclin dargestellt.

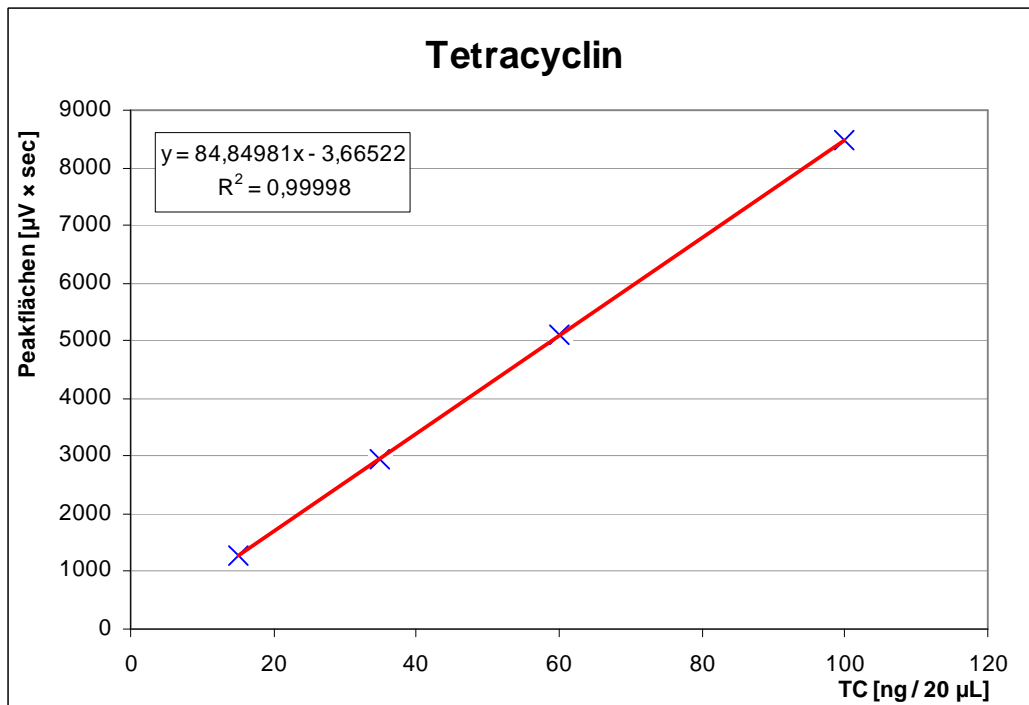


Abbildung 79 - Kalibrierfunktion zur Ermittlung des linearen Bereichs für Tetracyclin nach Direktinjektion

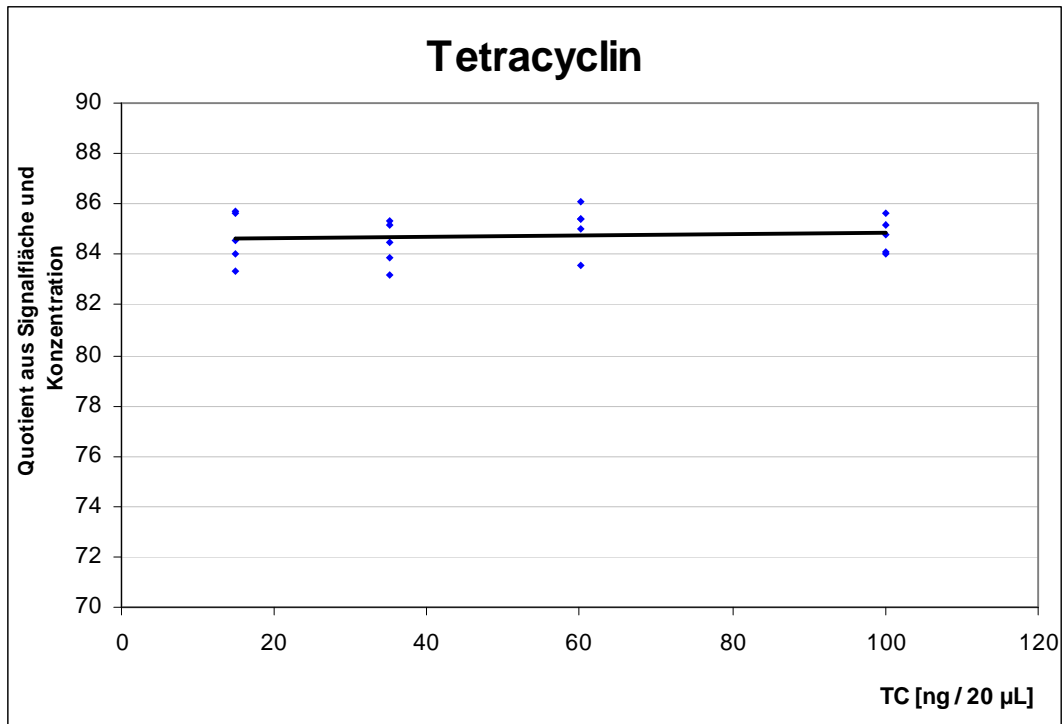


Abbildung 80 - Response-Werte für Tetracyclin nach Direktinjektion

Die den Grafiken in Abbildung 77 und Abbildung 81 zugrunde liegenden Peakflächen für Tetracyclin und Chlortetracyclin entsprechen jeweils nur denen der Muttersubstanz. Die für die Ermittlung dieser Parameter verwendeten Standardlösungen waren frisch angesetzt worden und zeigten keine Peakflächen für die Epimere. Sehr kleine, vom Grundrauschen kaum unterscheidbare Peaks für die Epimere bei den zeitlich später gemessenen Standardlösungen wurden vernachlässigt.

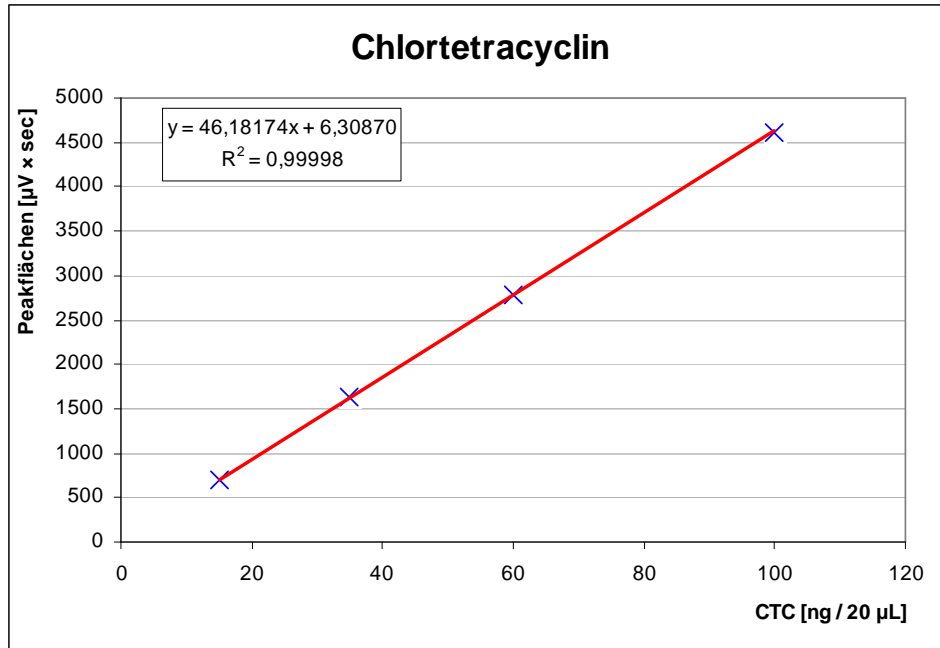


Abbildung 81 - Kalibrierfunktion zur Ermittlung des linearen Bereichs für Chlortetracyclin nach Direktinjektion

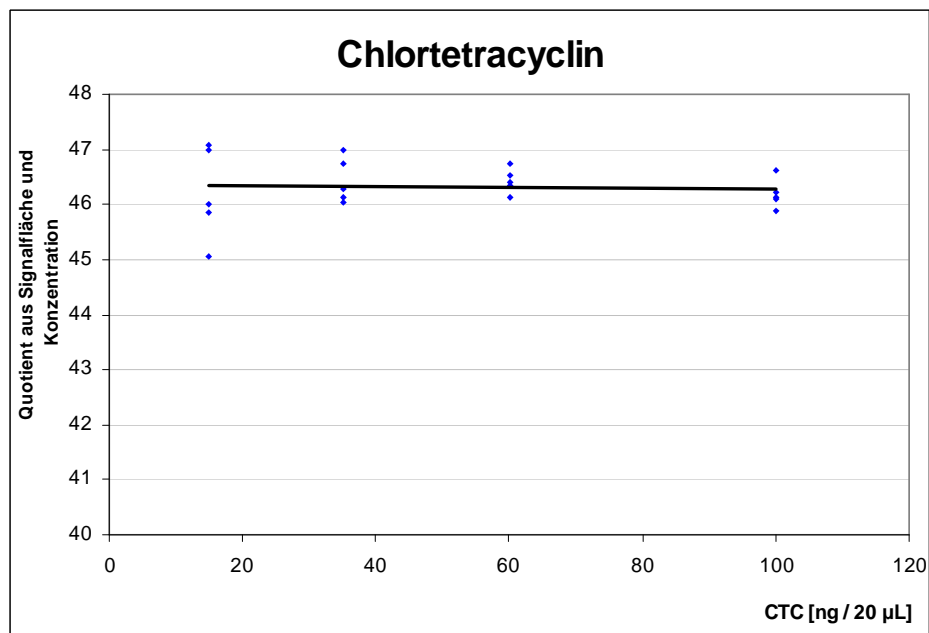


Abbildung 82 - Response-Werte für Chlortetracyclin nach Direktinjektion

Wie die Geraden in Abbildung 78, Abbildung 80 und Abbildung 82 durch ihren parallelen Verlauf zur x-Achse zeigen, ist die Linearität in dem untersuchten Konzentrationsbereich gegeben.

Die Überprüfung der Linearität für das gesamte online-Messverfahren erfolgte mit Standardlösungen der drei untersuchten Tetracycline in oxalsaurer Lösungen und ergab das in Abbildung 83 bis Abbildung 88 gezeigte Bild:

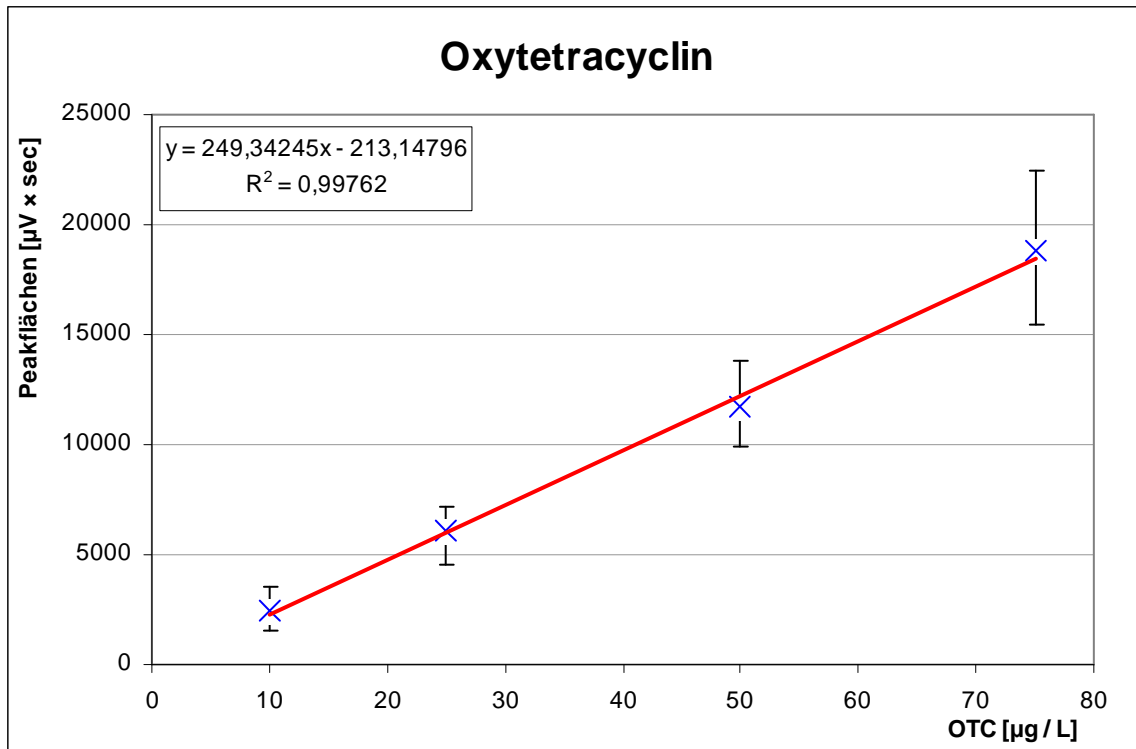


Abbildung 83 - Kalibrierfunktion zur Ermittlung des linearen Bereichs für Oxytetracyclin nach zweistufiger online-Anreicherung (n = 5)

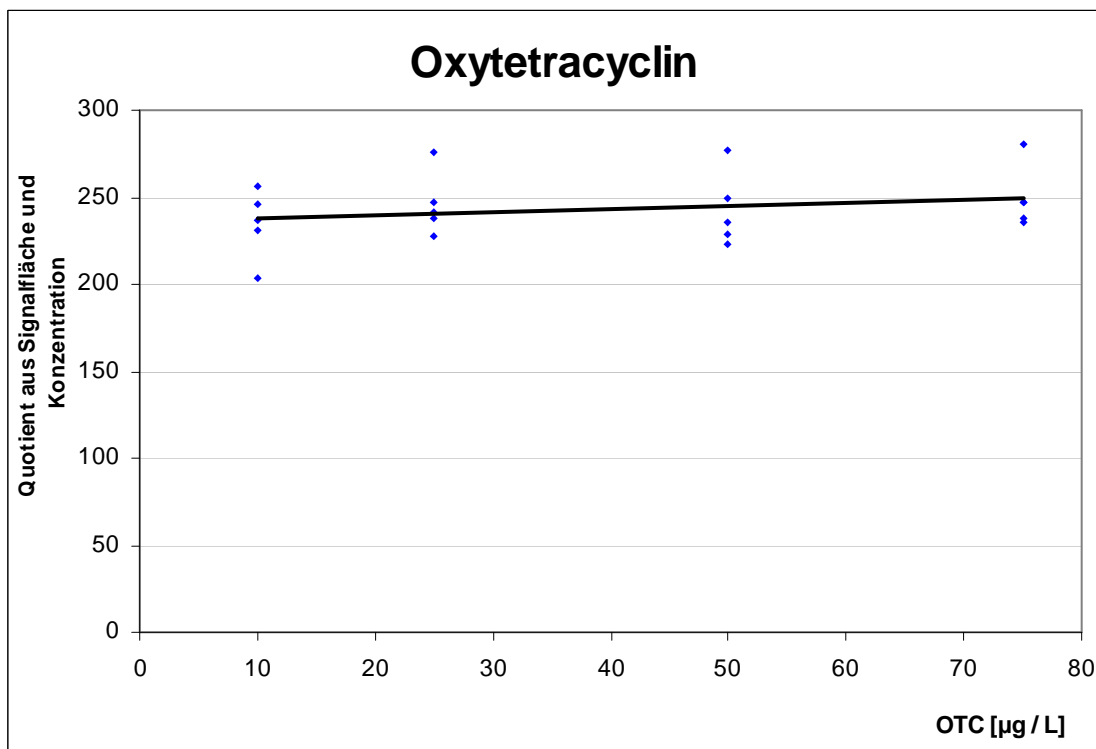


Abbildung 84 - Response-Werte für Chlortetracyclin nach zweistufiger online-Anreicherung (n = 5)

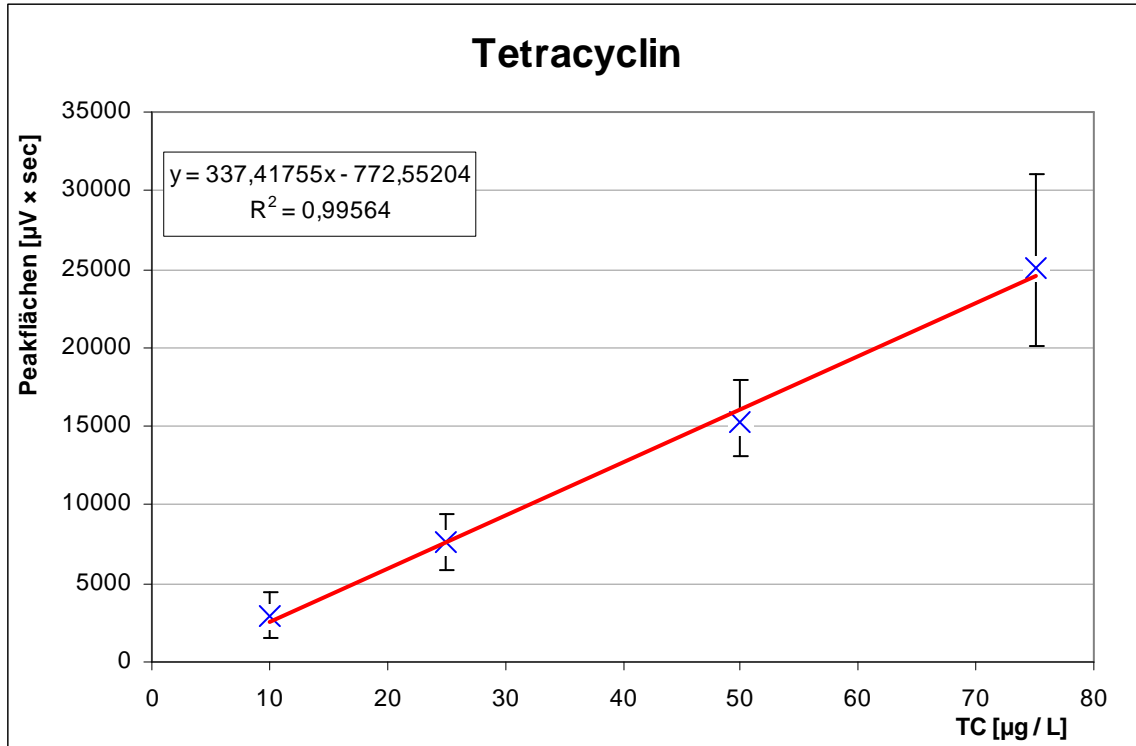


Abbildung 85 - Kalibrierfunktion zur Ermittlung des linearen Bereichs für Oxytetracyclin nach zweistufiger online-Anreicherung (n = 5)

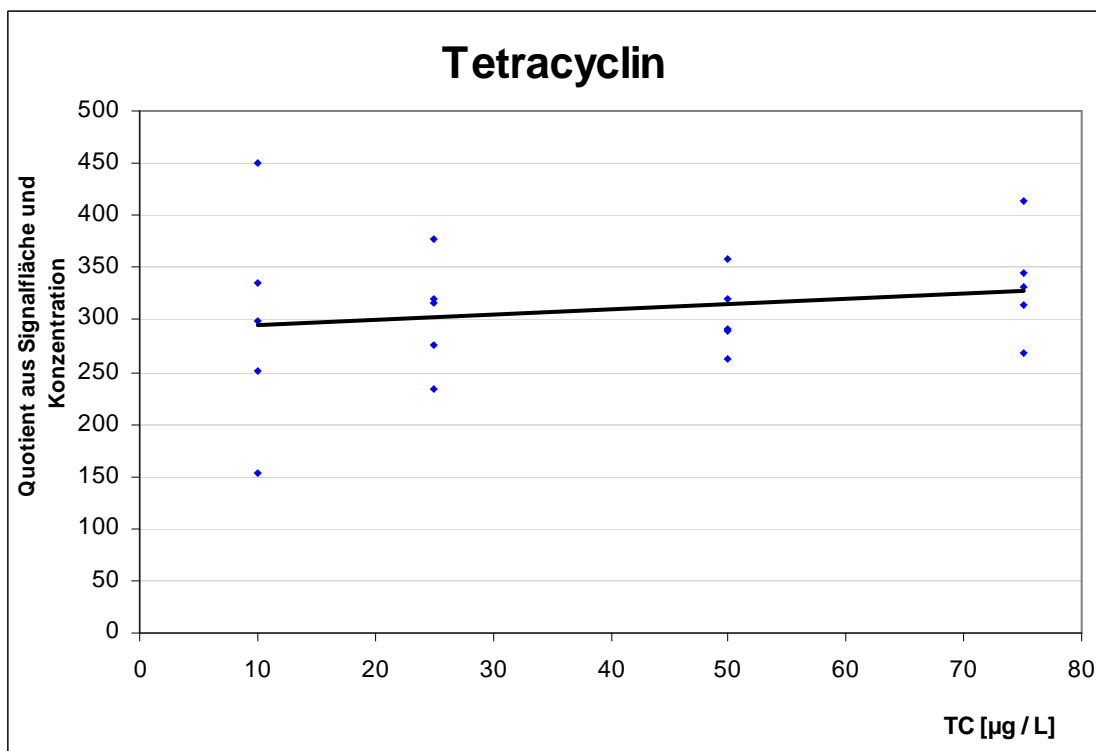


Abbildung 86 - Response-Werte für Chlortetracyclin nach zweistufiger online-Anreicherung (n = 5)

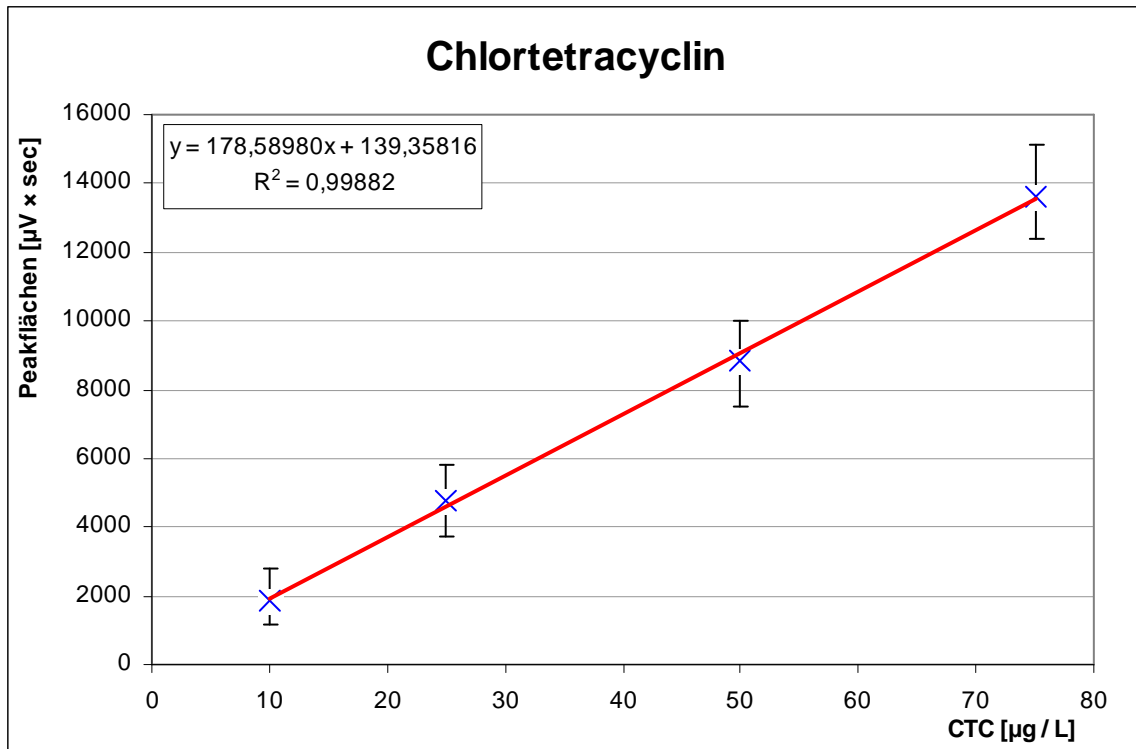


Abbildung 87 - Kalibrierfunktion zur Ermittlung des linearen Bereichs für Oxytetracyclin nach zweistufiger online-Anreicherung (n = 5)

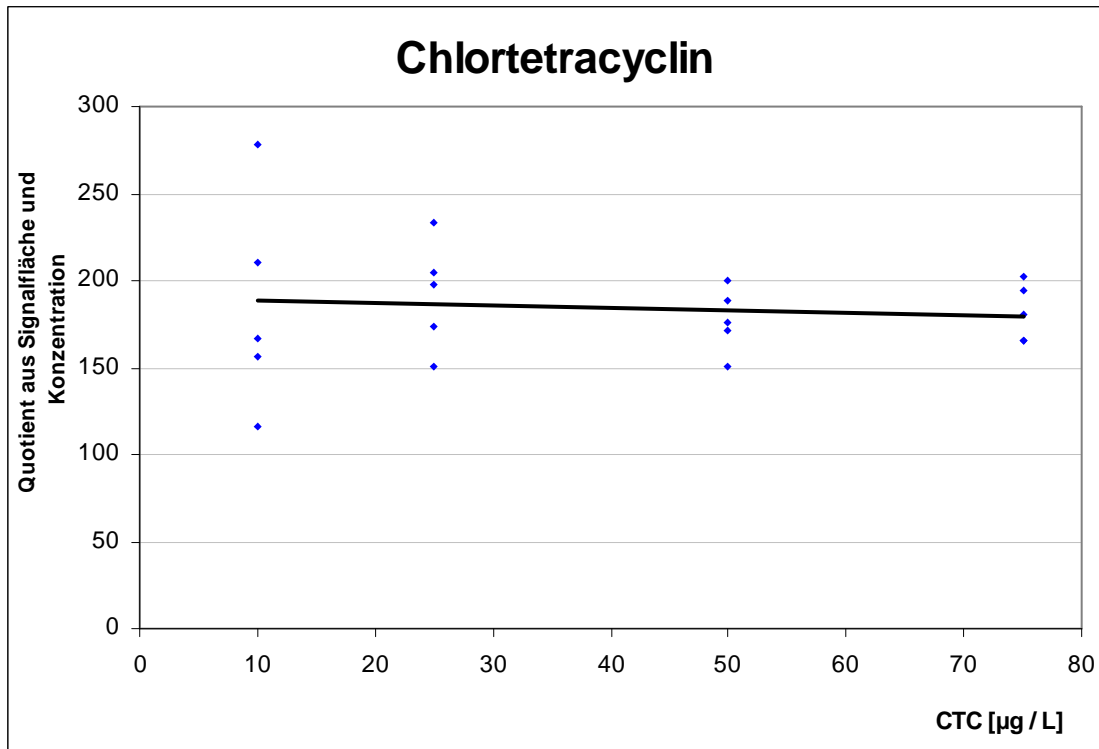


Abbildung 88 - Response-Werte für Chlortetracyclin nach zweistufiger online-Anreicherung (n = 5)

Wie in Abbildung 84 bis Abbildung 88 zu sehen, die die Methodik in dem Bereich von 10 bis 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hinreichend linear.

Zuverlässigkeit des Verfahrens

Richtigkeit

Die Richtigkeit eines Messverfahrens beschreibt, wie genau das mit dem Verfahren ermittelte Analyseergebnis mit dem «wahren Wert» übereinstimmt. Dieser «wahre Wert» lässt sich aufwändig mit einem Referenzmessverfahren bestimmen oder durch ein Referenzmaterial mit festgelegtem oder ermitteltem Gehalt messen.

Präzision

Ein Analysenverfahren ist präzise, wenn bei wiederholten Messungen unter gleichen Bedingungen die Streuung der gefundenen Einzelwerte um ihren Mittelwert \bar{x} möglichst gering ist. Die Messunsicherheit als Breite der Streuung der Messergebnisse um ihren Mittelwert wird durch die Standardabweichung σ ausgedrückt. Als Maß für die Präzision wird meist der Variationskoeffizient VK angegeben. Bestimmt wurde die Präzision durch fünffache Ermittlung von Wiederfindungsraten dotierter Honige. Die Tabelle 19 zeigt die ermittelten Wiederfindungen.

	Wiederfindungen \pm Variationskoeffizient [%]		
	OTC	TC	CTC
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	53 \pm 19	48 \pm 17	42 \pm 21
25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	57 \pm 8	55 \pm 6	52 \pm 12
50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	62 \pm 3	57 \pm 8	56 \pm 6
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	64 \pm 2	62 \pm 5	59 \pm 7

Tabelle 19 - Ergebnisse zur Überprüfung der Präzision (n = 5)

Der Variationskoeffizient ist im unteren Messbereich deutlich größer, da der Anteil des Signalrauschens bei den kleineren Messsignalen im Verhältnis zur Signalstärke stark zunimmt.

Verfahrensvariationskoeffizient

Der Variationskoeffizient des Verfahrens, auch als relative Standardabweichung des Verfahrens bezeichnet, ist ein relatives Maß für die Präzision des Verfahrens. Er wird aus der Standardabweichung des Verfahrens geteilt durch das arithmetische Mittel der x-Werte errechnet und in Prozent angegeben. Für Oxytetracyclin und Tetracyclin ergibt sich ein Verfahrensvariationskoeffizient von 9%, für das Chlortetracyclin liegt dieser bei 11%.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze eines Messverfahrens wird definiert als die Analytkonzentration die mit einer statistischen Sicherheit von 95% vom Grundrauschen des Verfahrens zu unterscheiden ist. Es handelt sich damit praktisch um die kleinste qualitativ nachweisbare Menge des gesuchten Analyten und stellt somit die Entscheidungsgrenze für den qualitativen Nachweis dar.

Bestimmungsgrenze

Die Erfassungsgrenze gibt die Analytkonzentration an, bei der mit einer hinreichenden statistischen Sicherheit der Analyt in seiner Konzentration nachgewiesen werden kann.

Analyt	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Oxytetracyclin	18	59
Tetracyclin	12	42
Chlortetracyclin	23	65

Tabelle 20 - Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Gesamtverfahrens

(Berechnung angelehnt an DIN 32645)

2.8.3.3 Schlussbetrachtung

Wie in Tabelle 20 zu erkennen, ist die Leistungsfähigkeit des entwickelten Verfahrens für eine Analyse von Tetracyclinrückständen in Honigen nicht ausreichend. Aufgrund des Anwendungsverbotes von Tetracyclin-Antibiotika bei der Bienenhaltung wäre eine Nachweisgrenze von $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ wünschenswert. Diese kann mit diesem Verfahren nicht erreicht werden.

Eine Modifikation des Analysesystems in Richtung größerer Probenaufgabemengen durch die sequentielle Injektion aus zwei oder sogar drei Probengläschen nacheinander mit direkt aufeinander folgender Anreicherung an der Sepharose-Festphase brachte keinen Erfolg. Möglicherweise ist die Anreicherungs Kapazität der Sepharose-Säule für diese höheren Probenlösungsvolumina nicht ausreichend. Alternativ konnte auch die mehrfach aufeinander folgende Anreicherung an der Polymer-Festphase nicht problemlos durchgeführt werden. Die dabei erhaltenen Peaks zeigten Peakaufspaltungen bzw. Mehrfachpeaks, wiesen ein starkes Tailing auf und waren nicht auswertbar.

Zudem zeigte das System eine gute Langzeitstabilität mit wässrigen Lösungen, konnte jedoch mit Honiglösungen nicht überzeugen. Insbesondere die häufig auftretenden Verstopfungen des Systems und die damit zusammenhängenden Druckschwankungen führten beim Aufgeben der einzelnen Lösungen mit Hilfe der Dilutoren zum Öffnen des Überdruckventils am Dilutor und damit eine in den Volumina nicht reproduzierbare Lösungsabgabe. Inwieweit die im Honig enthaltenen Bestandteile, wie beispielsweise Pollen, zu diesen Erscheinungen geführt hat, kann nur vermutet werden. Eine Veränderung der Filtration der Probenextrakte von $0,45 \mu\text{m}$ auf die kleinere Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$ führte hier zu keiner erkennbaren Verbesserung. Ob möglicherweise die Sepharose Ursache für die aufgetretenen Verstopfungen ist, ließ sich nicht ermitteln. Allerdings ist der Wechsel zwischen wässrigen Lösungen und Methanol auf der Sepharose-Säule nicht unproblematisch. Schon bei der manuellen Methode zeigte sich eine Veränderung in der Flussrate beim Wechsel auf Methanol, zudem kam es bei der manuellen Methodik zu kleinen Luftbläschen innerhalb der Säule. Die Verwendung von entgasten Lösungen und entgasten Methanols zeigte keine Verbesserung. Allerdings war diese Bildung von Luftbläschen in der Säule, die bei der automatisierten Methode verwendet worden war, nicht erkennbar.

Insgesamt konnten mit diesem System zwar zwischen 5 bis 15 Proben als Serie untersucht werden, jedoch ist diese für ein automatisiertes System, welches unbeaufsichtigt Proben analysieren soll, viel zu wenig. Die im Anschluss auf einen immer wieder auftretenden

Druckanstieg notwendige Suche nach dem Druck verursachenden Systemteil und die Reinigung und Spülung des gesamten Systems erfordern so viel Zeit und Systemkenntnis, das alle möglichen Vorteile dieser automatisierten Methode gegenüber der manuell durchzuführenden Methode aufgewogen werden.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass es rein technisch möglich ist, eine automatisierte zweifache sequentielle Festphasenextraktion zu realisieren. Jedoch ist die Verwendung einer Sepharose als Material für ein automatisiertes Verfahren nicht optimal, da die Sepharose selbst keine höheren Drücke verträgt. Zudem sollten richtige Kolbenpumpen anstelle von Spritzenpumpen für die Förderung der Lösungen verwendet werden, damit diese bei möglicherweise auftretenden Druckschwankungen entweder einfach weiterarbeiten oder das gesamte System stoppen können. Methoden mit mehreren verschiedenen Lösungen oder Lösungsmitteln sollten für die Automatisierung ebenfalls gemieden werden, da die Mischungsfreie Förderung dieser Lösungen an die jeweils geforderte Stelle im System hohe Anforderungen an das System stellt.

3 Zusammenfassung

In der Tiermedizin gehören die Antibiotika der Gruppe der Tetracycline zu den am häufigsten eingesetzten Tierarzneimitteln. Allerdings ist ihre Anwendung im Bereich der Imkerei zur Honiggewinnung in Deutschland nicht erlaubt. In anderen Ländern, insbesondere in Nord- und Mittelamerika, werden Tetracycline häufig, mitunter sogar zur vorbeugenden Behandlung eingesetzt. Zum Nachweis von Rückständen an Tetracyclinen in Honig sind einerseits leistungsfähige Nachweismethoden erforderlich, andererseits eine möglichst genaue Kenntnis der zu erwartenden Rückstandsgehalte und möglicherweise auftretende Metaboliten oder Abbauprodukte.

In einer Medikationsstudie wurden mehrere Bienenvölker mit Oxytetracyclin und Chlortetracyclin behandelt. Dabei wurde den Völkern jeweils dreimal 200 mg Wirkstoff in einem Zeitraum von 15 Tagen appliziert. Vergleichsvölker erhielten einen wirkstofffreien Puderzucker.

Die von diesen Bienenvölkern geernteten Honige wurden mittels der Untersuchungsverfahren ELISA, CHARM II und HPLC mit Chelat-Festphasenextraktion und zusätzlich per HPLC in einem auf Honiganalytik spezialisierten Handelslabor auf die Rückstandsgehalte von Tetracyclinen untersucht. Die ursprünglich für die Analyse der Honige vorgesehene Methode mittels online-Dialyse, die bereits erfolgreich für die Analytik von Tetracyclinrückständen in Hühnereiern angewandt worden war, zeigte sich als für die Matrix Honig nicht geeignet. Daher wurde auf die Methode aus der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB zurückgegriffen.

Die Vergleichsvölker, die keinen Wirkstoff appliziert bekamen, zeigten in der Analytik, unabhängig von der verwendeten Methode, durchgängig keine Rückstandsgehalte. Daraus kann geschlossen werden, dass in diesem Fall keine Kontamination benachbarter Völker mit Tetracyclinen durch Verflug oder Räuberei aufgetreten sind.

Die per HPLC ermittelten Gehalte für die mit Chlortetracyclin behandelten Völker stimmen größtmäßig mit den mittels ELISA und Charm II gemessenen Gehalten überein. Der Umfang des gebildeten epi-Chlortetracyclins lag bei diesem authentischen Material bei etwa 40% und damit in einer Größenordnung, wie er auch bei gelagerten, mit Chlor-

tetracyclin dotieren Honigen auftritt. Somit ist eine Metabolisierung des Chlortetracyclins seitens der Biene unwahrscheinlich.

Bei den Honigen von Bienenvölkern, die mit Oxytetracyclin behandelt worden waren, waren mit den HPLC-Methoden keine Rückstände mehr nachweisbar, während die immunchemischen Methoden noch messbare Gehalte, teilweise im Bereich der Nachweisgrenze, anzeigten.

Dieses Verhalten der immunchemischen Methoden liegt vermutlich darin begründet, dass diese aufgrund ihres Schlüssel-Schloss-Verhaltens mit einem immer noch unveränderten Strukturelement des Oxytetracyclins auch nach der Veränderung weiter eine Bindung eingehen können, während diese strukturell veränderten Oxytetracyclinmoleküle bei der chromatographischen Methode nicht erfasst werden.

Der Vergleich eines mit Oxytetracyclin dotierten Honigs mit einer ebenfalls dotierten Glucose/Fructose-Mischung zeigt für beide Matrices einen gleichermaßen auftretenden Abbau des Oxytetracyclins für die HPLC wie auch für ELISA und Charm II. Daraus lässt sich ableiten, dass der Abbau des Oxytetracyclins nicht von den Begleitstoffen des Honigs, sondern in erster Linie von der Glucose bzw. Fructose beeinflusst wird. Das Oxytetracyclin ist dagegen in wässriger Lösung stabil. Das Chlortetracyclin zeigt dieses Verhalten in Honig und einer Glucose-Fructose-Mischung, mit Ausnahme der einsetzenden Epimerisierung nicht.

Dies hat zur Folge, dass eine Bestätigung von Proben mit positivem Befund in den immunchemischen Methoden nur dann möglich ist, wenn tatsächlich unverändertes Oxytetracyclin vorliegt. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass für Proben, die im Charm II-Test oder ELISA zu einem positiven Befund führen, und in der Bestätigungsanalyse mittels HPLC im Falle des Oxytetracyclins keinen Rückstandsgehalt aufweisen, nicht zwingend „falsch positive“ Screeningtestergebnisse vorliegen. Ist das Ergebnis der Bestätigung durch die HPLC negativ, kann dies nur als Hinweis auf eine mögliche unerlaubte Anwendung von Oxytetracyclin in der Bienenhaltung gedeutet werden.

Im Rahmen einer Marktübersicht wurden 359 Honige unterschiedlicher Herkunft auf ihre Rückstände von Tetracyclinen mit ELISA und Charm II untersucht. Alle im Rahmen dieser Übersicht untersuchten Honige deutscher Herkunft waren Tetracyclin-negativ, während 5% der Honige aus dem restlichen Europa zu positiven Testergebnissen führten.

Der Anteil positiver Proben bei Honigen vom amerikanischen Kontinent, wo die Anwendung von Tetracyclinen teilweise zulässig ist, betrug 24%.

Aufgrund der Erfahrungen mit der Methode aus der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB wurde eine weitgehende Automatisierung dieser Methodik angestrebt. Dazu wurde, ausgehend von der Methode mittels online-Dialyse, ein zweistufiges Festphasenextraktionssystem entwickelt, welches alle wesentlichen Schritte der offiziellen Methode in kleinerem Maßstab in gleicher Weise durchführt. Aufgrund der direkten Koppelung mit dem nachfolgenden HPLC-System, arbeitet das System weitgehend automatisch, so dass sich die manuell durchzuführenden Schritte auf das Lösen und Filtrieren der Honige beschränkt. Dieses Analysesystem funktioniert zuverlässig, jedoch befriedigt die technische Langzeitzuverlässigkeit nicht.

4 Verzeichnisse

4.1 Literaturverzeichnis

- (1) ACKER L., BERGNER K.-G., DIEMAIR W., HEIMANN W., KIERMEIER F., SCHÖRMÜLLER J., SOUCI S.W. [Hrsg.] (1967) Handbuch der Lebensmittelchemie, Band V/1. Teil Kohlenhydratreiche Lebensmittel, Springer-Verlag, Berlin
- (2) AERTS, M.M.L., HOGENBOOM, A.C., BRINKMAN, U.A.Th. (1995) Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *Journal of Chromatography A* 667:1-40.
- (3) AGASØSTER T., RASMUSSEN K. E. (1991) Fully automated high-performance liquid chromatographic analysis of whole blood and plasma samples using on-line dialysis as sample preparation. Determination of oxytetracycline in bovine and salmon whole blood and plasma. *Journal of Chromatography* 570:99-107.
- (4) AGASØSTER T., RASMUSSEN K. E. (1992) On-line dialysis, liquid chromatography and post-column reaction detection of oxytetracycline in salmon muscle extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 10:349-354.
- (5) AGASØSTER T. (1992) Automated determination of oxytetracycline residues in muscle, liver, milk and egg by on-line dialysis and post-column reaction detection HPLC. *Food Additives and Contaminants* 9:615-622.
- (6) AHMAD N., SAFDER J., MUNIR CH. (1999) Circular Dichroism Studies on the Formation of Complexes of (-)-7-Chlorotetracycline with Vanadium, Chromium, and Cobalt. *Monatshefte für Chemie* 130 (2): 267-274.

- (7) AHMED B. M., JEE R. D. (1984) Fluorescence investigation of isochlorotetracycline: ground-state and excited-state acid-base equilibria. *Analytica Chimica Acta* 156:263-271.
- (8) ALBERT A. (1953) Avidity of Terramycin and Aureomycin for Metallic Cations. *Nature* 172:201.
- (9) ALBERT A., REES C. W. (1958) Avidity of the Tetracyclines for Cations of Metals. *Nature* 177:433-434.
- (10) Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung nach dem Fleischhygienegesetz und Geflügelfleischhygienegesetz vom 19. Februar 2002. (*Bundesanzeiger* Jahrgang 56, Nr.44a).
- (11) ANONYMUS (2005)
http://www.warenverein.de/pdf/wv_jb_2005_marktberichte_honig.pdf
- (12) ANONYMUS (2006) Honigbleute trafen sich in Villip. D.I.B. Aktuell 1/2006, Seite 2,
http://www.deutscherimkerbund.de/phpwcms_ftp/aktuell2006-1.pdf
- (13) ARANDA M., CISTERNAS E., VILLEGAS R. (2006) Determination of oxytetracycline in honey by ion-pair HPLC with cationic-SPE. *Electronic Journal of Food and Plants Chemistry* 1(1):12-15.
- (14) ARNAUD N., GEORGES J. (2001) Sensitive detection of tetracyclines using europium-sensitized fluorescence with EDTA as co-ligand and cetyltrimethylammonium chloride as surfactant. *The Analyst* 126:694-697.

- (15) Arzneimittelgesetz-Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394;), zuletzt geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 21. Dezember 2006 (BGBl. I S. 3367).
- (16) ASHWORTH R.B. (1985) Liquid Chromatographic Assay of Tetracyclines in Tissues of Food-Producing Animals. *Journal of AOAC International* 68:1013-1017.
- (17) ASZALOS A., HANEKE C., HAYDEN M. J., CRAWFORD J. (1982) Analyses of Tetracycline Antibiotics by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* 15:367-373.
- (18) AZSALOS A. (1985) Fast Determination of Tetracycline Antibiotics in Different Media by High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* 20:313-322.
- (19) BÄCKMAN C., TÖRNOVIST P. (2000) Automated determination of antimicrobial drug residues in honey. *Proceedings EuroResidue IV*: 193-195.
- (20) BELITZ H.-D., GROSCH W. (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Vierte Auflage, Springer-Verlag, Berlin
- (21) Bienenseuchen-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2004 (BGBl. I S. 2738), geändert durch Artikel 10 der Verordnung vom 20. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3499).

- (22) BOATTO G., PAU A., PALOMBA M., ARENARE L., CERRI R. (1999) Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 20:321-326
- BOTSOGLU N. A., VASSILOPOULOS V. N., KUFIDIS D. C. (1984) Reversed-phase high pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines in eggs. *Chimika Cronika* 13:37-44.
- (23) BRION M., BERTHION G., FOURTILAN J-B. (1981) Metal Ion–Tetracyclines Interactions in Biological Fluids. Potentiometric Study of Calcium Complexes with Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline and Minocycline and Simulation of their Distributions under Physiological Conditions. *Inorganica Chimica Acta* 55:47-56.
- (24) BRYAN P. D., HAWKINS K. R. , STEWART J. T, CAPOMACCHIA A. C. (1992) Analysis of Chlortetracycline by High Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Alkaline-induced Fluorescence Detection. *Biomedical Chromatography* 6:305-310.
- (25) BRYAN P. D., STEWART J. T. (1994a) Separation of tetracyclines by liquid chromatography with acidic mobile phases and polymeric columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 11: 971-976.
- (26) BRYAN P. D., STEWART J. T. (1994b) Chromatographic analysis of selected tetracyclines from dosage forms and bulk drug substance using polymeric columns with acidic mobile phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 12:675-692.
- (27) Bundesgesundheitsblatt 10/95: Nachweismethoden für Rückstände von Tierarzneimitteln: Bestimmung der Rückstände von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in eßbaren Geweben von Rind, Schaf, Schwein, Pute, Forelle, Karpfen sowie in Kuhmilch und Hühnerei (Routineverfahren) *Bundesgesundheitsblatt* 10/95 410-413.

- (28) BUTTERFIELD A. G., HUGHES D. W., POUND N. J., WILSON W. L. (1973) Separation and Detection of Tetracyclines by high-Speed Liquid Chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4:11-15.
- (29) BUYSKE D. A., EISNER H. J., KELLY R. G. (1960) Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 130:150-156.
- (30) BVL, NRKP (2002) Nationaler Rückstandskontrollplan für Lebensmittel tierischer Herkunft, [«http://www.bvl.bund.de/nn_491658/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/04__NRKP/nrkp.html»](http://www.bvl.bund.de/nn_491658/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/04__NRKP/nrkp.html).
- (31) BVL, NRKP (2007) Jahresbericht 2007 zum Nationalen Rückstandskontrollplan, Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft, [«http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_493680/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/04__NRKP/01__berichte__nrkp/02__ErgaenzendeDokumente__2007/nrkp__bericht__2007.html»](http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_493680/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/04__NRKP/01__berichte__nrkp/02__ErgaenzendeDokumente__2007/nrkp__bericht__2007.html).
- (32) CARRASCO-PANCORBO A., CASADO-TERRONES S., SEGURA-CARRETERO A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. (2008) 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. *Journal of Chromatography* 1195:107-116.
- (33) CARSON M. C. (1993) Simultaneous Determination of Multiple Tetracycline Residues in Milk Using Metal Chelate Affinity Chromatography. *Journal of AOAC International* 76: 329-334.

- (34) CARSON M. C., BRESLYN W. (1996) Simultaneous Determination of Multiple Tetracycline Residues in Milk by Metal Chelate Affinity Chromatography: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 79:29-42.
- (35) CARSON M. C., BULLOCK G., BEBAK-WILLIAMS J. (2002) Determination of Oxytetracycline Residues in Matrixes from a Freshwater Recirculating Aquaculture System. *Journal of AOAC International* 85:341-348.
- (36) CERNIGLIA C. E., KOTARSKI S. (1999) Evaluation of Veterinary Drug Residues in Food for Their Potential to Affect Human Intestinal Microflora. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 29:238-261.
- (37) CHAPPELL G. S., HOUGLUM J. E., KELLEY W. N. (1986) Determination of Oxytetracycline in Premixes and Veterinary Products by Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International* 69:28-30.
- (38) CHARM S. E., CHI R. (1988) Microbial Receptor Assay for Rapid Detection and Identification of Seven Families of Antimicrobial Drugs in Milk: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 71:304-316.
- (39) COOPER J. D. H., TURNELL D. C., GREEN B. (1988) Automated sequential trace enrichment of dialysates and robotics. A technique for the preparation of biological samples prior to high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 456:53-69.
- (40) COUTO, C., LIMA, J., CONCEIÇÃO M., MONTENEGRO, B.S.M., REIS, S. (1998) Tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline determination by flow injection potentiometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18:527-533.

- (41) CROUBELS S., VAN PETEGHEM C., BAEYENS W. (1994) Sensitive Spectrofluorimetric Determination of Tetracycline Residues in Bovine Milk. *Analyst* 119:2713-2716.
- (42) CROUBELS, S., BAEYENS, W., VAN PETEGHEM, C. (1995) Post-column zirconium chelation and fluorescence detection for the liquid chromatographic determination of tetracyclines. *Analytica Chimica Acta* 303:11-16.
- (43) CROUBELS S., VANOOSTHUYZE K. E. I., VAN PETEGHEM C. H. (1997) Use of metal chelate affinity chromatography and membrane-based ion-exchange as clean-up procedure for trace residue analysis of tetracyclines in animal tissues and egg. *Journal of Chromatography* 690:173-179.
- (44) DEBAYLE D., DESSALCES G., GRENIER-LOUSTALOT M. F. (2008) Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 391:1011-1020.
- (45) DAY S. T., CROUTHAMEL W. G., MARTINELLE L. C., MA J. K. H. (1978) Mechanism of Fluorometric Analysis of Tetracycline Involving Metal Complexation. *Journal of pharmaceutical Sciences* 67:1518-1523.
- (46) DEGROODT J. M., WYHOWSKI DE BUKANSKI B., SREBRINK S. (1993) Multiresidue analysis of tetracyclines in kidney by HPLC and photodiode array detection. *Journal of Liquid Chromatography* 16:3515-3529.
- (47) DE RUYCK H., DE RIDDER H., VAN RENTERGHEM R., VAN WAMBEKE F. (1999) Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial. *Food Additives and Contaminants* 16:47-56.

- (48) DING X., MOU S. (2000) Ion chromatographic analysis of tetracyclines using polymeric column and acidic eluent. *Journal of Chromatography* 987:205-214.
- (49) DINKOV D., KANELOV I., ZHELYAZKOVA I., VASHIN I. (2005) Persistence of tetracycline and oxytetracycline in bee honey after improper application on bee families. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 3(3):205-209.
- (50) DISERENS J.-D. (2005) Honey contamination with antibiotics. ALP-Reports. [www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?lang=de].
- (51) DOLUISIO J. T., MARTIN A. N. (1963) Metal complexation of the Tetracycline Hydrochlorides. *Journal of Medicinal Chemistry* 6:16-20.
- (52) DÜRCKHEIMER W. (1975) Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen. *Angewandte Chemie* 87:751-764.
- (53) DUISBERG H. (1967) Honig und Kunsthonig. In: Handbuch der Lebensmittelchemie ACKER L., BERGNER K.-G., DIEMAIR W., HEIMANN W., KIERMEIER F., SCHÖRMÜLLER J. und SOUCI S. W. [Hrsg.] Band V/1. Teil S. 491-550.] Band V/1. Teil S. 491-550
- (54) EDELHÄUSER M., BERGNER K-G. (1987) Proteine des Bienenhonigs. IX. Honigsaccharase: Isoelektrische Focussierung und Herkunft des Enzyms. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* 188:237-242.
- (55) EKSBORG S. (1981) Reversed-phase ion-pair chromatography of tetracyclines on a LiChrosorb NH₂ column. *Journal of Chromatography* 208:78-82.

- (56) Entscheidung 97/747/EG der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorhergesehenen Probenahmen zum Zweck der Untersuchung in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände bestimmten tierischen Erzeugnissen vom 6. November 1997 (*Amtsblatt EG L 303/12*).
- (57) FALBE J., REGITZ M. [cf.] (1989) *Römpp Chemie Lexikon*. 9. Auflage, Georg Thieme Verlag.
- (58) FARRINGTON W. H. H., TARBIN J., BYGRAVE J., SHEARER J. (1991) Analysis of trace residues of tetracyclines in animal tissues and fluids using metal chelate affinity chromatography / HPLC. *Food Additives and Contaminants* 8:55-64.
- (59) FEDESA (1998) Pressemitteilung vom 6. September 1998, zitiert in: *Deutsches Tierärzteblatt* 11:1093.
- (60) FRIESER J. GEDEK W., DORN P. (1989) Zum Nachweis und zur Bedeutung von Tetracyclin-Rückständen im Ei. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 93:17-20.
- (61) GILLIAM M., ARGAUER R. J. (1975) Stability of Oxytetracycline in Diets Fed to Honeybee colonies for Disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 26:383-386.
- (62) GOODMAN J. J. (1985) Fermentation and Mutational Development of the Tetracyclines. In: HLAVKA, BOOTHE [Hrsg.] (1985) *The Tetracyclines*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 5-57.
- (63) HALLING-SØRENSEN B., SENGELØV G., TJØRNELUND J. (2002) Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmental Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42:263-271.

- (64) HEERING W., USLEBER E., DIETRICH R., MÄRTLBAUER E. (1998) Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. *Analyst*, 123:2759-2762.
- (65) HEESCHEN W., SUHREN G. (1986) On the position of a microbial receptor test (Charm Test II) in a system for the detection and identification of antibiotically effective inhibitors in milk. *Milchwissenschaft* 41:749-753.
- (66) HERMANSSON J., ANDERSSON M. (1982) Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography of Tetracycline, Tetracycline Analogs, and Their Potential Impurities. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71:222-229.
- (67) HLAVKA J. J., BOOTHE J. H. [Hrsg.] (1985) *The Tetracyclines*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 1-3.
- (68) Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (BGBl. I S. 92), geändert durch Artikel 6 der Verordnung vom 22. Februar 2006 (BGBl. I S. 444).
- (69) HOOGMARTENS J., KHAN N. H., VANDERHAEGHER H., VAN DER LEEDEN A. L., OOSTERBAAN M., VELD-TULP G. L., PLUGGE W., VAN DER VLIES C., MIALANNE D., MELAMED R., MILLER J. H. MCB. (1989) A collaborative study of the analysis of doxycycline hyclate by high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene packing materials. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 7:601-610.
- (70) HOOGMARTENS J., NAIDONG W., KHAN N. H., MALLEY A., HEARTY U., MELAMED R., GOUSSET J. P., CREED P., WOOLLAM C., MILLER J. H. MCB., FUCHS J., VANDERHAEGHE H. (1990) Collaborative study of the analysis of oxytetracycline and oxytetracycline hydrochloride by liquid chromatography. *Pharmaceutica* 2:75-83.

- (71) HORII S. (1994) Liquid chromatographic determination of oxytetracycline and chlortetracycline residues in animal tissues. *Journal of Liquid Chromatography* 17:213-221.
- (72) HÜTTENRAUCH R, KEINER I. (1968) Dissoziationskonstanten von Mannich-Basen der Tetracyclin-Antibiotika. *Archiv der Pharmazie* 301:97-102.
- (73) HSIAO Y.-M., KO J.-L., LO C.-C. (2001) Determination of Tetracycline and Streptomycin in Mixed Fungicide Products by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:1669-1674.
- (74) HUSSAR D. A., NIEBERGALL P. J., SUGITA E. T., DOLUISIO J. T. (1968) Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20:539-546.
- (75) IBSEN K. H., SAUNDERS R. L., URIST M. R. (1963) Fluorometric Determination of Oxytetracycline in Biological Material. *Analytical Biochemistry* 5:505-514
- (76) IKAI Y., OKA H., KAWAMURA N., YAMADA M., HARADA K.-I., SUZUKI M. (1987) Improvement of chemical Analysis of antibiotics: XIII. Systematic simultaneous analysis of residual tetracyclines in animal tissues using thin-layer and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 422:313-323.
- (77) IWAKI K., OKUMURA N., YAMAZAKI M. (1992) Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 623:153-158.

- (78) JUHEL-GAUGAIN M., MCEVOY J. D. G., VANGINKEL L. A. (2000) Measurements for certification of chlortetracycline reference materials within the European Union Standards, Measurements and Testing programme. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 368:656-663.
- (79) JÜRGENS U. (1981) Zuur hochdruckflüssigchromatographischen Analyse von Arzneimittelrückständen in Honig. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* 173:356-358.
- (80) KATZ S. E., FASSBENDER C. A. (1972) Improved Procedures for the Determination of Oxytetracycline in Milk, Milk Products; Chicken Muscle, Liver; and Eggs. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 7:229-236.
- (81) KAWATA S., KAZUHIKO S., NISHIKAWA Y., IWAMA K. (1996) Liquid Chromatographic Determination of Oxytetracycline in Swine Tissues. *Journal of AOAC International* 79:1463-1465.
- (82) KELLY R. G., PEETS L. M., HOYDT K. D. (1969) A Fluorometric Method of Analysis for Tetracycline. *Analytical Biochemistry* 28:222-229.
- (83) KENNEDY, D.G., MCCRACKEN, R.J., CAREY, M.P., BLANCHFLOWER, W.J., HEWITT, S.A. (1998b) Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg. *Journal of Chromatography A* 812:327-337.
- (84) KHAN N. H., ROETS E., HOOGMARTENS J., VANDERHAEGHE H. (1987) Quantitative analysis of oxytetracycline and related substances by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 405:229-245.

- (85) KHISMATOULLIN R., KUZYAEV R., LYAPUNOV Y., ELOVIKOVA E. (2003) Modification of the microbiological detection method of tetracycline in honey. *Apiacta* 38:246-248.
- (86) KIJAK P. J., LEADBETTER M. G., THOMAS M. H., THOMPSON E. A. (1991) Confirmation of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline residues in milk by particle beam liquid chromatography/mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* 20:789-795.
- (87) KNOX J.H., JURAND J. (1979) Mechanism of reversed-phase separation of tetracycline by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 186:763-782.
- (88) KOCHANSKY J. (2000) Analysis of oxytetracycline in extender patties. *Apidologie* 31:517-524.
- (89) KOHN K. W. (1961a) Determination of Tetracyclines by Extraction of Fluorescent Complexes. *Analytical Chemistry* 33:862-866.
- (90) KOHN K. W. (1961b) Mediation of divalent metal ions in the binding of tetracycline to macromolecules. *Nature* 191:1156-1158.
- (91) KROKER R., LÖSCHER W., ŠIMŇEK J., TROLLDENIER H., UNGEMACH F. R. (1996) Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: FREY und LÖSCHER W. [Hrsg.]: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Verlag Enke, Stuttgart, S. 454-508.
- (92) KÜHNE M., WENZEL S. (2001) 4-epi chlortetracycline residues in muscle. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 52:40-42.
- (93) KURITTU J., LÖNNBERG S., VIRTA M., KARP M. (2000) A Group-Specific Microbiological Test for the Detection of Tetracycline Residues in Raw Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3372-3377.

- (94) LEHNERT T., SHIMANUKI H (1981) Oxytetracycline residues in honey following three different methods of administering the antibiotic. *Apidologie* 12:133-136.
- (95) LIANG Y., SIMON R. E., BONNER DENTON M. (1999) Utilization of a scientifically operated charge-coupled device detector for high-performance thin-layer chromatographic analysis of tetracyclines. *The Analyst* 124:1577-1582.
- (96) LINDGREN I., NEVALAINEN T., KOHONEN J. (1970) Tetracyclines and egg shell calcification. *Poultry Science* 49:1357-1358.
- (97) LIPPOLD R. (2001) Möglichkeiten und Grenzen von Screening-Verfahren. Vortrag beim GDCh-Fortbildungskurs 663/01 „Analytik von Tierarzneimittelrückständen in Lebensmitteln“, Wuppertal 2001.
- (98) LONG A. R., HSIEH L. C., MALBROUGH M. S., SHORT C. R., BARKER S. A. (1990a) Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Isolation and Liquid Chromatographic Determination of Oxytetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline in Milk. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 73:379-384.
- (99) LONG A. R., HSIEH L. C., MALBROUGH M. S., SHORT C. R., BARKER S. A. (1990b) Matrix Solid Phase Dispersion Isolation and Liquid Chromatographic Determination of Oxytetracycline in Catfish (*Ictalurus punctatus*) Muscle Tissue. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 73:864-867.
- (100) LOPEZ M. I., PETTIS J. S., SMITH I. B., CHU P. S. (2008) Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:1553-1559.

- (101) MANIKIS I., THRASYVOULOU, A. (2001) Das Verhältnis zwischen den physikalischen-chemischen Merkmalen des Honigs und den Empfindlichkeitsparametern der Kristallisierung. *Apiacta*, 36 (3), 106 – 112.
- (102) Manual CHARM II Analysis, Charm Sciences Inc., Lawrence, Massachusetts, USA
- (103) MARTIN P. (2003) Veterinary drug residues in honey. *Apiacta* 38:21-23
- (104) MARZO A., DAL BO L. (1998) Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *Journal of Chromatography A* 812:17-34.
- (105) MASCHER A., LAVAGNOLI S., CURATOLO M. (1996) Determination of residual oxytetracycline in honey with an immunoassay kit. *Apidologie*, 27:229-233.
- (106) MATHEW M. K., BALARAM P. (1980) A Reinvestigation of Chlortetracycline Fluorescence: Effect of pH, Metal Ions, and Environment. *Journal of Inorganic Biochemistry* 13:339-349.
- (107) MCCORMICK J. R. D., FOX S.M., SMITH L. L., BITLER B. A., REICHENTHAL J., ORIGONI V. E., MULLER W. H., WINTERBOTTOM R., DOERSCHUK A. P. (1957) Studies of the Reversible Epimerization occurring in the Tetracycline Family. The preparation, properties and proof of structure of some 4-epi-Tetracyclines. *Journal of the American Chemical Society* 79:2849-2858.
- (108) MCCRACKEN R. J., BLANCHFLOWER W. J., HAGGAN S. A., KENNEDY D. G. (1995) Simultaneous Determination of Oxytetracycline, Tetracycline and Chlortetracycline in Animal Tissues Using Liquid Chromatography, Post-column Derivatization With Aluminium, and Fluorescence Detection. *Analyst* 120:1763-1766.

- (109) McCracken R. J., Spence D.E., Kennedy D.G. (2000) Comparison of extraction techniques for the recovery of veterinary drug residues from animal tissues. *Food Additives and Contaminants* 17(11):907-914.
- (110) Mercer H. D. (1975) Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. Control Mechanisms of Governmental Agencies. *Veterinary Clinics of North America* 5:3-35.
- (111) Michaud V. (2005) Antibiotic residues in honey. *Apiacta* 40:52-54.
- (112) Milch R. A., Rall D. P. Tobie J. E. (1957) Bone Localization of the Tetracyclines. *Journal of the National Cancer Institute* 19:87-91.
- (113) Mitscher L. A. (1978) *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*. Marcel Dekker, New York, S. 1-3, 93-94, 103-105.
- (114) Moats W. A. (1986) Determination of tetracycline antibiotics in tissues and blood serum of cattle and swine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 358:253-259.
- (115) Moats W. A. (2000) Determination of tetracycline antibiotics in tissues and blood serum of cattle and swine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:2244-2248.
- (116) Moats W. A., Harik-Khan R. (1995) Rapid HPLC Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:931-934.
- (117) Monser, L., Darghouth, F. (2000) Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-Epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23:353-362.

- (118) MOUROT D., DELÉPINE B., BOISSEAU J., GAYOT G. (1980) Reversed-phase ion pair chromatography of oxytetracycline, epioxytetracycline and anhydrooxytetracycline. *Journal of Chromatography* 190:486-488.
- (119) MULDER W. A. W., VAN DER HULST-VAN ARKEL M. C. (1977) Rückstände von Antibiotika in Muskulatur und Organen von Schlachtgeflügel. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 6:214-216.
- (120) MULDER E. J., VAN DE LAGEMAAT D. (1989) Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 7:1829-1835.
- (121) MYLLYNIEMI A.-L., RINTALA R., BÄCKMAN C., NIEMI A. (1999) Microbiological and chemical identification of antimicrobial drugs in kidney and muscle samples of bovine cattle and pigs. *Food Additives and Contaminants* 16:339-351.
- (122) NAIDONG W., THURANIRA J., VERMEULEN K., ROETS E., HOOGMARTENS J. (1992) Quantitative analysis of minocycline by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene). *Journal of Liquid Chromatography* 15:2529-2549.
- (123) NAGGAR V., DAABIS N. A., MOTAWI M. M. (1974a) Solubilization of Tetracycline and Oxytetracycline. *Pharmazie* 29:122-125.
- (124) NAGGAR V., DAABIS N. A., MOTAWI M. M. (1974b) Effect of Solubilizers on the Stability of Tetracycline. *Pharmazie* 29:122-125.
- (125) OESER A. R. (1994) Gewinnung von Referenzmaterial mit Rückständen an Nitrofuranen in Hühnereiern mit Stabilitätsuntersuchungen mit einem automatisierten Probenaufarbeitungssystem, *Dissertation* Universität Wuppertal, Verlag Mainz, Aachen.

- (126) OKA H. MATSUMOTO H., UNO K., HARADA K., KADOWAKI S., SUZUKI M. (1985) Improvement of chemical analysis of antibiotics. VIII. Application of prepacked C18 cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver. *Journal of Chromatography* 325(1):265-274.
- (127) OKA H., IKAI Y., KAWAMURA N., UNO K., YAMADA M., HARADAD K.-I., SUZUKI M. (1987a) Improvement of Chemical Analysis of Antibiotics. XII. Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey. *Journal of Chromatography*, 400:253-261.
- (128) OKA H., IKAI Y., KAWAMURA N., UNO K., YAMADA M., HARADA K., MACHIKO U., ASUKABE H., MORI Y., SUZUKI M. (1987b) Improvement of Chemical Analysis of Antibiotics IX. A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean-up system. *Journal of Chromatography*, 389:417-426.
- (129) OKA H., IKAI Y., HAYAKAWA J., MASUDA K., HARADA K. SUSZUKI M (1994) Improvement of Chemical Analysis of Antibiotics. Part XIX: Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk by Liquid chromatography and Thin-Layer Chromatography/Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 77: 891-895.
- (130) ONJI Y., UNO M., TANIGAWA K. (1984) Liquid Chromatographic Determination of Tetracyclines in Meat and Fish. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 67:1135-1137.
- (131) PENA, A., CARMONA, A., BARBOSA, A., LINO, C., SILVEIRA, I., CASTILLO, B. (1998) Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18:839-845.

- (132) PENA, A., LINO, C. M., SILVEIRA, I. N. (1999) Determination of Oxytetracycline, Tetracycline and Chlortetracycline in Milk by Liquid Chromatography with Postcolumn Derivatization and fluorescence Detection. *Journal of AOAC International* 82:55-60.
- (133) PLAN CREHA (2004) PLAN NACIONAL DE CONTROL DE RESIDUOS E HIGIENE EN ALIMENTOS. http://www.senasa.gov.ar/oldweb/documentos/fiscalizacion/plancreha_2004.pdf
- (134) POMP E. J., BÜNING-PFAUE H. (1996) Mobilization and analytical availability of drug residues in food. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* 202:263-265.
- (135) RAEZKE, K-P., MATTER L. (2003) Direkte Bestimmung von Antibiotika in Honig durch. on-line SPE-LC und SPE-LC-MS, *Lebensmittelchemie* 57:7-8.
- (136) RAY A., HARRIS R. (1989) High-performance liquid chromatography as an alternative to microbiological measurements in the assay of tetracyclines. *Journal of Chromatography* 467:430-435.
- (137) REEUWIJK H. J. E. M., TIADEN U. R. (1986) High-performance liquid chromatography of tetracyclines. *Journal of Chromatography* 353:339-350.
- (138) REMMERS E. G., SIEGER G. M., DOERSCHUK A. P. (1963) Some Observations on the Kinetics of the C-4 Epimerization of Tetracycline. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52:752-756.

- (139) 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, 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG vom 23. Mai 1996 (*Amtsblatt EG* L 125/10).
- (140) Richtlinie 2001/110/EG des Rates vom 20. Dezember 2001 über Honig (Abl. EG 2002 Nr. L 10 S. 47)
- (141) ROGSTAD A., HORMAZABAL V., YNDESTAD M. (1988) Optimization of solid phase extraction of oxytetracycline from fish tissue and its determination by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography* 11:2337-2347
- (142) SALVATORE M. J., KATZ S. E. (1993) Solubility of Antibiotics Used in Animal Feeds in Selected Solvents. *Journal of AOAC International* 76:192-956.
- (143) SCHNEIDERREIT M. (2006) Vortrag: Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin – Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen.
»http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz_in_der_veterinaermedizin_folien.pdf«
- (144) SCHWABE U., PAFFRATH D. (2003). *Arzneiverordnungsreport 2003*, Springer Verlag, Berlin, ISBN 3-540-40188-1.
- (145) SHARMA R. K., JOSEPH S. (1996) Formation constants and molecular modelling studies of metal ion-tetracycline complexes. *Indian Journal of Chemistry* 35A:639-642.

- (146) SHARMA J. P., KORITZ G. D., PERKINS E. G. BEVILL R. F. (1977) High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Tetracyclines in Urine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 66:1319-1322.
- (147) SOKOLOVA L. I., CHERNAEV A. P. (2001) Determination of Benzylpenicillin, Levomycetin (Chloramphenicol), and Tetracycline in food Products by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* 51:177-1180.
- (148) SPORNS P., KWAN S., ROTH L. A. (1986) HPLC Analysis of Oxytetracycline Residues in Honey. *Journal of Food Protection* 49:383-388.
- (149) STEPHENS C. R., MURAI K., BRUNINGS K. J., WOODWARD R. B. (1956) Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* 78:4155-4159.
- (150) STUBBINGS G., TARBIN J.A., SHEARER G. (1996) On-line metal chelate affinity chromatography clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal tissues. *Journal of Chromatography* 679:137-145.
- (151) THOMAS M. H. (1989) Simultaneous Determination of Oxytetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline in Milk by Liquid Chromatography. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 72:564-567
- (152) TOURAKI M., RIGAS P., PERGANDAS P., KASTRITSIS C. (1995) Determination of oxytetracycline in the live fish feed Artemia using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 663:167-171.
- (153) TSUJI K., MOROZOWICH W. [Hrsg.] (1978) *GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents: Part I*. Marcel Dekker New York, Basel, S. 767-773.

- (154) TSUJI K., ROBERTSON J. H. (1973) Formation of trimethylsilyl derivatives of tetracyclines for separation and quantitation by gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 45:2136-2140.
- (155) TSUJI K., ROBERTSON J. H., Beyer W. F. (1974) High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Tetracyclines. *Analytical Chemistry* 46:539-543.
- (156) UNGLAUB W., MÄRTLBAUER E. (1995) Enzymimmunologische Tetrazyklinbestimmung in Urin, Serum und Gewebesaft von Schlachttieren. *Fleischwirtschaft* 75(10):1231-1233.
- (157) UNGLAUB W., MARTINI S., NEUMANN F. (1995) Tetrazyklinnachweis in Honig mittels Enzymimmunologie. *Deutsches Bienen Journal*, 12:33-35.
- (158) Verordnung des Eidgenössischen Departement des Innern über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln vom 26. Juni 1995. (*Amtsblatt EG* Nr. L 99/5).
- (159) Verordnung (EG) Nr. 600/2005 der Kommission vom 18. April 2005 über die Neuzulassung eines Kokzidiostatikums als Zusatzstoff in Futtermitteln für zehn Jahre, die vorläufige Zulassung eines Zusatzstoffes und die Zulassung bestimmter Zusatzstoffe in Futtermitteln für unbefristete Zeit. *Amtsblatt EG* Nr. L 99/5.
- (160) Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. *Amtsblatt EG* Nr. L 268/29.

- (161) Verordnung (EWG) 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festlegung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (ABl. EG Nr. L 244/1), zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 324/04 der Kommission vom 25. Februar 2004. *Amtsblatt EG* Nr. L 58/16.
- (162) WENZEL T. J., COLLETTE L. M., DAHLEN D. T., HENDRICKSON S. M., YARMALOFF L. W. (1988) Liquid chromatographic and flow injection analysis of tetracycline using sensitized europium(III) luminescence detection. *Journal of Chromatography* 433:149-158.
- (163) WHITE C.R., MOATS WA., KOTULA K. L. (1993) Optimization of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Oxytetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline in Milk. *Journal of AOAC International* 76:549-554.
- (164) WINCKLER, GRAFE (2000) *Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden*. Umweltbundesamt, Texte 44/00.
- (165) ZANDER E., BÖTTCHER F. K. (1984) *Krankheiten der Biene*, 7. Auflage, Ulmer Verlag, Stuttgart (Hohenheim) ISBN 3-8001-7413-8.
- (166) ZHAO Y., CI Y., CHANG W. (1997) Fluorescence enhancing by alkaline degradation of tetracycline antibiotics and its application. *Science in China* 40:434-441.
- (167) ZURHELLE G., PETZ M., MÜLLER-SEITZ E., SIEWERT E. (1999) Tetracyclines and their metabolites in egg white and yolk. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung A* 108:299-300.

- (168) ZURHELLE G. (2000) Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse – Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetracycline bei Legehennen. Elektronische *Dissertation* Universität Wuppertal, «http://elpub.bib.uni-wuppertal.de/edocs/fachbereiche/c_mathematik_und_naturwissenschaften/09_chemie/dissertationen/2000_34/index.html».
- (169) ZURHELLE G, MÜLLER-SEITZ E, PETZ M. (2000a) 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* 739:191-203.
- (170) ZURHELLE G, PETZ M, MUELLER-SEITZ E, SIEWERT E. (2000b) Metabolites of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline and their distribution in egg white, egg yolk, and hen plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:6392-6396

4.2 Abkürzungsverzeichnis

Abk. / abbr.	english	deutsch
%	percent	Prozent
§	article	Paragraph
°C	degree Centigrade	Grad Celsius
µg	microgram	Mikrogramm
Σ	sum	Summe
Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)
ABl	Official Journal	Amtsblatt
ASCII	american standard code for information interchange	Amerikanischer Standard-Code für den Informationsaustausch
ASTED	automated sequential trace enrichment of dialysates	automatisierte sequentielle Spurenanreicherung von Dialysaten
ASU	Official collection of determination methods	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
BASIC	beginner's all-purpose symbolic instruction code	„vielseitige, symbolische Programmiersprache für Anfänger“
BfR	Federal Institute for Risk Assessment	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Federal Institute for Consumer Health Protection and Veterinary Medicine	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BRT	brilliant black reductase test	Brilliant-schwarzreduktionstest
BVL	Federal Office of Consumer Protection and Food Safety	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	respectively (resp.)	beziehungsweise
ca.	approximately (approx.)	circa

Verzeichnisse

CCD	charge-coupled device	ladungsgekoppelter Baustein
cpm	counts per minute	Zählungen pro Minute
CTC	chlortetracycline	Chlortetracyclin
DAD	diode-array detector	Dioden-Array-Detektor
DC	doxycycline	Doxycyclin
DDD	defined daily dose	definierte Tagesdosis (WHO)
d.h.	that is (i. e.), id est	dass heißt
e-CTC	epi-chlortetracycline	epi-Chlortetracyclin
e-OTC	epi-oxytetracycline	epi-Oxytetracyclin
e-TC	epi-tetracycline	epi-Tetracyclin
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno- sorbent assay	Enzymgekoppelter Immunsorbens-Test
EMA	European Medicines Agency	Europäische Arzneimittelagentur
et al.	and others, et alii	und andere
etc.	et cetera	et cetera
EU	European Union	Europäische Union
FEDESA	European Federation of Animal Health	Europäischer Verband für Tiergesundheit
g	gram	Gramm
HLB	hydrophilic-lipophilic balanced	HLB-Wert
HMF	hydroxymethyl furfural	Hydroxymethylfurfural
HPIC	high performance ion chromatography	Hochleistungsflüssigionschromatographie
HPLC	high performance liquid chromatography	Hochleistungsflüssigchromatographie

Verzeichnisse

HPLC-MS/MS	high performance liquid chromatography coupled in line with tandem MS	Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-MS
HPTLC	high performance thin layer chromatography	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
Hrsg.	editor	Herausgeber
I.D.	inner diameter	Innendurchmesser
kByte	= 10 ³ Byte	= 10 ³ Byte
kg	kilogramme	Kilogramm
L	litre	Liter
LFGB	food and commodities law	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LMBG	food and commodities law	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LOD	limit of detection	Nachweisgrenze
m	metre	Meter
mg	milligram	Milligramm
Mio	Million	Million(en), 10 ⁶
mL	millilitre	Milliliter
MS	mass spectrometry	Massenspektrometrie
MSPD	matrix solid phase dispersion	Matrix-Festphasendispersion
NRKP	national monitoring programme of residues	Nationaler Rückstandskontrollplan
OTC	oxytetracycline	Oxytetracyclin
PC	personal computer	Arbeitsplatzrechner
PGC	porous graphitic carbon	poröser Graphit-Kohlenstoff
PRP	polymeric reversed phase	polymere Umkehrphase
PS-DVB	polystyrene divinyl benzene polymere	Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer
PTFE	poly-tetra-fluoro-ethylene	Polytetrafluorethylen (Teflon®)

Verzeichnisse

SPE	solid phase extraction	Festphasenextraktion
TC	tetracycline	Tetracyclin
TEC	trace enrichment column	(Spuren-) Anreicherungssäule
UV	ultraviolet	Ultraviolett
VK	coefficient of variation	Variationskoeffizient
WHO	World Health Organization	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	for example (e. g.)	zum Beispiel

5 Anhang

5.1 Arbeitsvorschrift

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.		Gültig ab: 14.06.2002 Version: 1.3 ersetzt Version: 1.2 Programmversion: 2.5
	Th. Münstedt	FB C – Lebensmittelchemie	Bergische Universität Wuppertal

Standardarbeitsanweisung

Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in Honig mittels HPLC und UV-Detektion nach Metallchelate-Affinitätschromatographie und automatisierter Festphasenextraktion.

1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclinrückständen sowie deren Epimeren in Honig.

2 Begriffserklärungen

Oxytetracyclin (OTC), Tetracyclin (TC) und Chlortetracyclin (CTC) gehören zur Gruppe der Tetracyclinantibiotika und werden in der Veterinärmedizin zur Behandlung von bakteriellen Infektionen eingesetzt. Ein EU-MRL existiert in Gegensatz zu Muskulatur und Milch (je 100 µg/kg), Eiern (200 µg/kg), Leber (300 µg/kg) und Nieren (600 µg/kg) für Honig nicht. Die vorgenannten MRL beziehen sich auf die Summe von Muttersubstanz und das jeweilige 4-Epimer.

3 Kurzbeschreibung

Mit dem hier beschriebenen automatisierten Analysensystem können Honige nach einer Metallchelate-Affinitätschromatographie und einer folgenden on-line Festphasenextraktion mittels eines HPLC-Systems mit UV-Detektion quantitativ bestimmt werden.

Die zu untersuchenden Honige werden mit einem Puffer verdünnt, filtriert und direkt dem automatisierten System zugeführt. Das Analysensystem gibt diese Extrakte auf eine mit Kupferionen beladene Metallchelate-Affinitätsanreicherungssäule, an der die Tetracycline gebunden werden. Nach mehreren Waschschritten werden die Tetracycline mit einem EDTA-haltigen Puffer eluiert und an einer RP-Phase angereichert und gewaschen. Die Tetracycline werden durch den sauren Eluenten eluiert und chromatographisch an einer RP-Phase per HPLC getrennt und mit einem UV-Detektor detektiert.

Mit diesem System können 36 Probenlösungen in 20 Stunden analysiert werden.

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.		Gültig ab: 14.06.2002 Version: 1.3 ersetzt Version: 1.2 Programmversion: 2.5
	Th. Münstedt	FB C – Lebensmittelchemie	Bergische Universität Wuppertal Seite: 2/9

4 Geräte und Hilfsmittel

4.1 Allgemeine Laborgeräte

- Messkolben 25 mL, 100 mL, 1000 mL
- Messpipetten 1 mL, 10 mL,

4.2 Verbrauchsmaterial

- Polypropylen-Röhrchen 15 mL, konisch, mit Schraubverschluss
- Einmal-Spritzen aus Polyethylen (10 mL)
- Braunglasflaschen 4 mL, 11 × 30 mm mit Schraubverschluss und PTFE-Dichtung (Probenvials)
- Membran-Spritzenfilter für wässrige Lösungen (CME), 0,45 µm Porengröße

4.3 Ultraschallgerät

4.4 Schüttelmaschine

4.5 Analysenwaage

4.6 Laborzentrifuge

(einstellbar auf mind. 4000 g^1)

5 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben,

- sind analysenreine Chemikalien zu verwenden
- muss Wasser destilliert oder von entsprechender Reinheit sein
- ist unter Lösung eine wässrige Lösung zu verstehen

5.1 Allgemeine Chemikalien

- tridest. Wasser = vollentsalztes Wasser (HPLC-geeignet)
- Acetonitril (HPLC-geeignet)
- Methanol
- Oxalsäure Dihydrat
- Kupfersulfat Pentahydrat
- Bernsteinsäureanhydrid
- Heptansulfonsäure, Na-Salz

¹ $g = 9,81 \text{ ms}^{-2}$

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.	Stand: 14.06.2002 Version: 0.3 Programmversion: 2.5
Th. Münstedt	FB 9 – Lebensmittelchemie	BU Wuppertal
		Seite: 3/7

5.2.1.2 Einzelstandard

Sollen die Tetracycline als einzelne Standards gemessen werden, wird aus der jeweiligen Stammlösung eine Einzelstandardlösung mit $c=0,1 \text{ mg/mL}$ hergestellt, in dem diese mit Probenverdünnungslösung (5.3.11) verdünnt wird.

5.2.1.3 Mischstandard

Zur Herstellung eines Mischstandards ($c=100 \text{ µg/mL}$) wird aus den drei Stammlösungen jeweils 10 mL in einen 100 mL Messkolben vorgelegt und mit Probenverdünnungslösung (5.3.11) aufgefüllt.

5.2.1.4 Dotierungslösung

Zur Herstellung der Dotierungslösung ($c=1 \text{ µg/mL}$) werden in einem 100 mL Messkolben 1 mL Mischstandard (5.2.1.3) vorgelegt und mit Probenverdünnungslösung (5.3.11) aufgefüllt.

5.3 Lösungen

5.3.1 Spüllösung PEC

Wasser (HPLC-Qualität, entgast).

5.3.2 Spüllösung 1

identisch mit 5.3.1.

5.3.3 Spüllösung 2

Methanol (HPLC-Qualität).

5.3.4 Spüllösung 3

identisch mit 5.3.11.

5.3.5 Konditionierungslösung

5 g Kupfersulfat-Pentahydrat gelöst in 1000 mL Wasser.

5.3.6 Elutionslösung

37,2 g Ethylendiamin-tetraessigsäure Natriumsalz-Dihydrat gelöst in 1000 mL Probenverdünnungslösung (5.3.11).

5.3.7 Nachsäulenderivatisierungslösung

3,1 g Borsäure und 4,5 g Magnesiumacetat-Tetrahydrat in 500 mL Wasser lösen. 10 mL 2 mol/L NaOH zugeben und mischen. Die Trübung verschwindet nach 5 minütiger Behandlung im Ultraschallbad zum Entgasen.

5.3.8 Stammlösungspuffer

1,26 g Oxalsäure-Dihydrat in 1000 mL Wasser lösen.

5.3.9 Fließmittel HPLC-Eluent A

1,26 g Oxalsäure-Dihydrat und 2,20 g Heptansulfonsäure-Na-Salz in 1000 mL Wasser lösen. Täglich mit Helium entgasen.

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.		Gültig ab: 14.06.2002 Version: 1.3 ersetzt Version: 1.2 Programmversion: 2.5
	Th. Münstedt	FB C – Lebensmittelchemie	Bergische Universität Wuppertal Seite: 4/9

5.3.4 Dotierungslösung

Zur Herstellung der Dotierungslösung ($c=1 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$) werden in einem 100 mL Messkolben 1 mL Mischstandard (5.3.3) vorgelegt und mit Probenverdünnungslösung (5.4.11) aufgefüllt.

5.4 Lösungen

5.4.1 Spüllösung PEC

Wasser (HPLC-Qualität, entgast).

5.4.2 Spüllösung 1

identisch mit 5.4.1.

5.4.3 Spüllösung 2

Methanol (HPLC-Qualität).

5.4.4 Spüllösung 3

identisch mit 5.4.11.

5.4.5 Konditionierungslösung

5 g Kupfersulfat-Pentahydrat gelöst in 1000 mL Wasser.

5.4.6 Elutionslösung

37,2 g Ethylendiamin-tetraessigsäure Natriumsalz-Dihydrat gelöst in 1000 mL Probenverdünnungslösung (5.4.11).

5.4.7 Nachsäulenderivatisierungslösung

3,1 g Borsäure und 4,5 g Magnesiumacetat-Tetrahydrat in 500 mL Wasser lösen. 10 mL 2 mol/L NaOH zugeben und mischen. Die Trübung verschwindet nach 5 minütiger Behandlung im Ultraschallbad zum Entgasen.

5.4.8 Stammlösungspuffer

1,26 g Oxalsäure-Dihydrat in 1000 mL Wasser lösen.

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.		Gültig ab: 14.06.2002 Version: 1.3 ersetzt Version: 1.2 Programmversion: 2.5
	Th. Münstedt	FB C – Lebensmittelchemie Bergische Universität Wuppertal	Seite: 5/9

5.4.9 *Fließmittel HPLC-Eluent A*

1,26 g Oxalsäure-Dihydrat und 2,20 g Heptansulfonsäure-Na-Salz in 1000 mL Wasser lösen. Täglich mit Helium entgasen.

5.4.10 *Fließmittel HPLC-Eluent B*

Acetonitril HPLC-Qualität. Täglich mit Helium entgasen.

5.4.11 *Probenverdünnungslösung*

5,0 g Bernsteinsäureanhydrid werden in 1000 mL Wasser gelöst und mit Natriumhydroxidlösung (5.4.12) auf pH 4,0 ± 0,1 eingestellt.

5.4.12 *Natriumhydroxidlösung*

39,97 g Natriumhydroxid werden in 1000 mL Wasser gelöst ($c=1,0 \text{ mol/L}$).

6 **Probenaufarbeitung**

6.1 **Probenvorbereitung**

Es werden 3 g Honig in ein 15 mL PE-Gefäß eingewogen und mit 3 mL Probenverdünnungslösung (5.4.11) versetzt. Das Gefäß wird verschlossen und so lange geschüttelt, bis der gesamte Honig in Lösung gegangen ist. Anschließend wird 15 Minuten bei ca. 4000 g zentrifugiert und von dem Überstand ca. 4 mL über einen 0,45 µm CME-Spritzenfilter (4.2) in ein 4 mL Autosamplerglas überführt.

6.2 **Probendotierung**

6.2.1 *Dotierung zur Aufstellung einer Kalibrierfunktion*

Zur Herstellung dotierter Honige werden die nach 6.1 behandelten Honige (6 g Honig-Puffer-Mischung) vor oder nach dem Zentrifugationsschritt entsprechend untenstehender Tabelle dotiert:

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.	Gültig ab: 14.06.2002 Version: 1.3 ersetzt Version: 1.2 Programmversion: 2.5
Th. Münstedt	FB C – Lebensmittelchemie	Bergische Universität Wuppertal Seite: 6/9

Zielkonzentration [µg/kg]	Dotierungslösung (5.3.4) [µL]	Probenverdünnungslösung (5.4.11) [µL]
5	15	2985
10	30	2970
15	45	2955
20	60	2940
25	75	2925
30	90	2910
50	150	2850
100	300	2700
200	600	2400
300	900	2100
400	1200	1800

7 Durchführung der Analyse

7.1 Vorbereitung des Systems

Nach dem Wechsel oder dem Auffüllen der einzelnen Lösungen ist eine gründliche Spülung des Analysensystems durchzuführen. Dazu dient das Spülprogramm 51. Das Spülprogramm wird durch die am Autosampler befindliche kleine Steuerungstastatur gestartet. Dazu wird nach dem Drücken der Taste [Edit File] und der Eingabe [51] das Programm mit der [Enter]-Taste aktiviert.

Der Autosampler muss folgende Einstellungen anzeigen:

Anzeige	Taste	Bedeutung
RACK CODE 34	[Enter]	Für das Spülprogramm bedeutungslos.
DIL. SYR 0=5000 µL	[Enter]	Das Programm verlangt am Dilutor 0 eine 5 mL Spritze.
DIL. SYR 1=5000 µL	[Enter]	Das Programm verlangt am Dilutor 1 eine 5 mL Spritze.

PRESS START

Der Autosampler ist jetzt bereit, die Spülung durchzuführen. Gestartet wird das Programm mit der Taste [Start]. Dieses Spülprogramm entfernt Lösungsmittelreste

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.	Gültig ab: 14.06.2002 Version: 1.3 ersetzt Version: 1.2 Programmversion: 2.5
Th. Münstedt	FB C – Lebensmittelchemie	Bergische Universität Wuppertal
		Seite: 7/9

und Luftblasen aus den einzelnen Zuleitungen der Probenaufarbeitungseinheit. Dieses Spülprogramm führt nur einen einzelnen Durchlauf aus, wobei jede der Zuleitungen einmal mit je 5 mL gespült wird. Dazu empfiehlt es sich, die MCAEC für die Dauer der Spülung aus dem System zu entfernen.

7.2 Ausgangsbedingungen

Ausgangsbedingungen für die Tetracyclin-Analyse mit Programm 54:

Gerät	Status	Bemerkung
Ventil I	<undefiniert>	wird vom Programm eingestellt
Ventil II	INJECT	WICHTIG! BEACHTEN!
Ventil III	<undefiniert>	wird vom Programm eingestellt
Pumpe I	Fluß: 0,5 ^{mL} /min	
Pumpe II	Fluß: 0,15 ^L /min	nur für Fluoreszenzdetektion
Detektor	360 nm	
APEX-System	Methode geladen	

7.3 Benötigte Lösungsmengen

Lösung	Vorlage (n=1) [mL]	max. Vorlage (n=36) [mL]
Puffer	21	756
Methanol	2	72
Wasser (Dil. 0)	5,3	190,8
EDTA-Puffer	1	36
Kupferlösung	1	36
Eluent	21	756
Wasser (Dil. 1)	6	216

7.4 Programmstart

Das automatisierte Verfahren wird durch die am Autosampler befindliche kleine Steuerungstastatur gestartet. Dazu wird nach dem Drücken der Taste [Edit File] und der Eingabe [54] das Programm mit der [Enter]-Taste aktiviert.

Der Autosampler muss folgende Einstellungen anzeigen:

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.	Gültig ab: 14.06.2002 Version: 1.3 ersetzt Version: 1.2 Programmversion: 2.5
Th. Münstedt	FB C – Lebensmittelchemie	Bergische Universität Wuppertal
		Seite: 8/9

Anzeige	Taste	Bedeutung
RACK CODE 34	[Enter]	Das Programm verlangt ein Probenrack mit 36 Gläsern á 4 mL.
DIL. SYR 0=5000 µL	[Enter]	Das Programm verlangt am Dilutor 0 eine 5 mL Spritze.
DIL. SYR 1=5000 µL	[Enter]	Das Programm verlangt am Dilutor 1 eine 5 mL Spritze.

PRESS START

Der Autosampler ist jetzt bereit, die Analysen durchzuführen. Gestartet wird das Programm mit der Taste [Start].

Einzugeben ist jetzt noch die Anzahl der zu analysierenden Proben und mit der Taste [Enter] zu bestätigen.

8 Wartung und Pflege

Wird das Analysensystem längere Zeit (> 2 Tage) nicht benutzt, ist eine Durchspülung des Probenvorbereitungssystems mit einem Methanol / Wassergemisch (1:1, v/v) durchzuführen. Dazu werden alle Zuleitungen mit Ausnahme der Zuleitung für die HPLC-Pumpe I in ein Gefäß mit einem Methanol / Wassergemisch (1:1, v/v) gehängt und das Spülprogramm 51 (siehe 7.1) mit einem Spülvolumen von 5000 µL und drei Durchläufen gestartet.

Die HPLC-Pumpe, die analytische Säule und der Detektor sollten mit einem Acetonitril / Wassergemisch (1:1, v/v) 30 Minuten mit einem Fluß von 0,35 mL/min gespült werden.

MCAEC	Diese Anreicherungssäule wird nach ca. 50 Anreicherungen durch eine neue Säule ersetzt.
PEC	Diese Anreicherungssäule wird nach ca. 1000 Anreicherungen durch eine neue Säule ersetzt.
HPLC-Säule	Diese analytische Säule wird nach ca. 5000 Analysenläufen ausgewechselt. Die Notwendigkeit eines vorzeitigen Austausches wird durch eine Peakverbreiterung und geringe Signalhöhen angezeigt. Durch einen intensiven Spülgang mit 200 mL tridest. Wasser,

SAA	Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin nach SPE mit HPLC und UV-Detektion.	Gültig ab: 14.06.2002 Version: 1.3 ersetzt Version: 1.2 Programmversion: 2.5
Th. Münstedt	FB C – Lebensmittelchemie	Bergische Universität Wuppertal Seite: 9/9

Vorsäule	200 mL Methanol, 200 mL Dichlormethan, 200 mL Isopropanol und 200 mL tridest. Wasser in umgekehrter Fließrichtung ohne Vorsäule kann die Säule gereinigt werden. Gelagert wird die Säule nach Spülung mit einem Acetonitril / Wasser-Gemisch (1:1 v/v).
UV-Lampe	Bei erhöhten Rückdrücken, Peakverformungen und bei starken Kontaminationen des Systems mit Matrixbestandteilen ist die Vorsäule durch eine neue auszutauschen. Der Detektor arbeitet mit einer Longlife UV-Lampe, deren Lebensdauer lt. Hersteller 1000 Betriebsstunden beträgt.

9 Auswertung

Die Auswertung erfolgt über die Methode des externen Standards durch Integration der Peakflächen oder durch Ermittlung der Peakhöhen. Die Identität der detektierten Analyten ist über die Retentionszeit zu ermitteln. Da eine Trennung von Oxytetracyclin und epi-Oxytetracyclin mit dem vorliegenden Trennsystem nicht erreicht werden kann, ist die der Gehalt in diesem Fall als Summe von Oxytetracyclin und epi-Oxytetracyclin anzugeben.

10 Abkürzungen

MCAEC	Metal chelate affinity enrichment column
PEC	polymeric enrichment column

5.2 Programme

5.2.1 Programm 011

```
; MODEL ASTED V1.11
* Dilutor Nr. 0 mit Spritze 5000 µL
*****
' Programmname      : FILE011.SST      Version : 0.91
' Erstellt am      : 18.01.2002      um 07:05 Uhr
' Letzte Änderung am: 18.01.2002      um 11:10 Uhr
' Filenummer       : 011      Teil von Programm : ---
' Beschreibung     : Honig-Analyse C18/COOH
' Autor           : Thorsten Münstedt
'
' =====
'
' Externe Geräte sind konfiguriert:
'
' Externes Hochdruckventil beim Start auf Position 'LOAD'
'
' Kommunikationsanschlüsse:
'   AUXIL 0 : Niederdruckventil Position 6 (unbelegt)
'   AUXIL 1 : Niederdruckventil Position 1 (unbelegt)
'   AUXIL 2 : Niederdruckventil Position 2 (unbelegt)
'   AUXIL 3 : Niederdruckventil Position 3 (unbelegt)
'   AUXIL 4 : Niederdruckventil Position 4 (unbelegt)
'   AUXIL 5 : Niederdruckventil Position 5 (Pumpe II START/STOP)
'   AUXIL 6 : APEX-Datenaufnahme (Start-Signal)
'             Auto-Zero-Signal für den Detektor
'             HPLC-Pumpe (Start-Signal über D-Line)
'   AUXIL 7 : Externes Hochdruckventil (Ventil II) - Umschalter
'
'   WAIT 3 : APEX-Datenaufnahme (Ready-Signal)
'   WAIT 4 :
'   WAIT 5 :
'   WAIT 6 :
'   WAIT 7 :
'
' Ventilkonfiguration:
'   Internes Hochdruckventil (Ventil I):
'     1 : IEC-Anreicherungssäule (über 100 µL Probenschleife)
'     2 : HPLC-Pumpe I
'     3 : Analytische Säule (über manuelles Ventil)
'     4 : IEC-Anreicherungssäule
'     5 : Externes Hochdruckventil (Ventil II)
'     6 : Abfall
'
```

Anhang

```
'      Schaltung:
'
'          LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'          INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'
'
'      Externes Hochdruckventil (Ventil II):
'
'          1 : Probenschleife 5 mL
'          2 : Internes Hochdruckventil
'          3 : HPLC-Pumpe II
'          4 : Probenschleife 5 mL
'          5 : Abfall
'          6 : Niederdruckventil (Ventil III)
'
'
'      Schaltung:
'
'          LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'          INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'
'      HPLC-Pumpe I-Programm:
'
'
'      Anschluß A: Oxalsäure 0,1 mol/L
'      Anschluß B: Acetonitril
'      Anschluß C: Wasser
'      Anschluß D: Oxalsäure 0,1 mol/L : Acetonitril = 50 : 50
'
'
'          0,0      0% A,   0% B,   0% C, 100% D (Initialeinstellung)
'
'
'      Fluß: 0,35 mL/min
'
'
'      Säulenvolumen:
'
'          IEC: ca. 250 µL
'
'
'      =====
'      Verwendete Variablen:
'
'
' * A      Aktuelles Vial y-Richtung
' * B      Aktuelles Vial x-Richtung
' * B1     Probenvolumen
' * B16    Aktuelle Probennummer
' * C0     Vialanzahl
' * C1     Aktuelle Vialnummer
'
'
'
' *****
'          RACK CODE   34           'Rackdefinition.
'          B1=1000     'Probenaufgabevolumen (1 mL).
'          INJECT      0
' *****
'
'      Parameterabfrage und Plausibilitätskontrolle
' *****
'
'      Eingabe:
'
'          INPUT  C0/51           'Eingabe 'NB OF VIALS'.
'          IF     C0>36           'Mehr als 36 Vails geht nicht!
```

Anhang

```
GOTO   Eingabe           'Nochmal fragen.
' *****
' Programmvariablen in den Grundzustand
' Beginn der Programmschleife
' *****

      C1=0                'Aktuelle Vialnummer löschen.
      B16=0              'Aktuelle Probennummer löschen.
' *****
' Probenaufgabesystem spülen
' *****
'      PRINT  B16/81      'Ausgabe 'DEGASSING' und Probennummer.
'      RINSE                'Nadel in die Spülstation bewegen.
'      DISP   0/10000/7    'Nadel spülen.
'      WAIT   200          '2 Minuten warten.
' *****
' Schleifenkopf
' *****

      A=1                'Anfangswert für äußere Schleife (y).

LoopA:
      B=1                'Anfangswert für innere Schleife (x).

LoopB:
      C1=C1+1            'Vialnummer weiterzählen.
      B16=B16+1         'Probennummer weiterzählen.
' *****
' Nächste Probe berechnen und Programm evtl. fortsetzen
' *****
      IF     C1>C0        'Ist das letzte Vial schon bearbeitet?
      GOTO   Finito      'Wenn ja, dann ist jetzt Schluß!
' *****
' IEC konditionieren
' *****

      PRINT  B16/75      'Ausgabe 'PREPARATION' und Probennr.
      TUBE   A/B         'Aktuelles Vial wählen.
      ASPIR  0/3000/4    'Dielutor 0 zieht 3 mL Probe auf.
      TUBE   0/0         'Injektionsport wählen.
      DISP   0/3000/4    'Dilutor 0 gibt 3 mL Probe ab.
      DISP   0/500/4     'Dilutor 0 spült mit 0,5 mL Wasser nach.
      AUXIL  7/1         'IEC-Anreicherungs säule umschalten.
      WAIT   2           'Kurze Bedenkzeit.
      AUXIL  7/0         'Signal löschen.
      AUXIL  5/1         'Pumpe II starten.
      WAIT   500        'warten.
      AUXIL  5/0         'Pumpe II anhalten.
' *****
' Prüfen, ob APEX bereit ist, Daten aufzunehmen
' *****

      PRINT  B16/74      'Ausgabe 'ANALYSIS' und Probennr.

Warten2:
      IF     /3/=0       'Ist APEX ready?
      GOTO   Start      'Dann kann's losgehen.
      PRINT  B16/149     'Ausgabe 'WAIT CTRL.' und Probennummer
```

Anhang

```
GOTO    Warten2          ' dann noch warten.

Start:
        WAIT    10        'APEX eine kleine Pause einräumen.
' *****
' Gradientenprogramm der HPLC-Pumpe I und Datenaufnahme starten
' *****
        PRINT   B16/17    'Ausgabe 'INJECTION' und Probennnummer.
        INJECT  1
        AUXIL   6/2       'Pumpe I und APEX bekommen Startsignal.
        WAIT    1000     'Warten, bis Analyten eluiert sind.
' *****
' Ende der Programmschleife
' *****
        B=B+1           'Schleifenzähler weiterzählen.
        IF      B<4     'Noch innerhalb der Schleife?
        GOTO    LoopB   'Innere Schleife durchführen.
        A=A+1          'Schleifenzähler weiterzählen.
        IF      A<13    'Noch innerhalb des Racks?
        GOTO    LoopA   'Nächster Schleifendurchlauf.

Finito:
        WAIT    100     'Pause machen.
        HOME     'Programm beenden.
```

5.2.2 Programm 012

```
; Model ASTED V1.11
* Dilutor Nr. 0 mit Spritze 5000 µL
* Dilutor Nr. 1 mit Spritze 5000 µL
' *****
' Programmname      : FILE012.SST      Version : 2.7
' Erstellt am      : 21.01.2002      um 10:00 Uhr
' Letzte Änderung am: 14.06.2002      um 14:10 Uhr
' Filenummer       : 012      Teil von Programm : ---
' Beschreibung     : Analyse nur TEC (aus 3 Vials)
' Autor           : Thorsten Münstedt
'
' =====
' Externe Geräte sind konfiguriert:
'
' Externes Hochdruckventil (Ventil II) beim Start auf Position 'LOAD'.
'
' Kommunikationsanschlüsse:
'   AUXIL 0 : Niederdruckventil Position 6 (unbelegt)
'   AUXIL 1 : Niederdruckventil Position 1 (unbelegt)
'   AUXIL 2 : Niederdruckventil Position 2 (unbelegt)
'   AUXIL 3 : Niederdruckventil Position 3 (unbelegt)
'   AUXIL 4 : Niederdruckventil Position 4 (unbelegt)
'   AUXIL 5 : HPLC-Pumpe II - Start : 1   Stop : 0
'   AUXIL 6 : APEX-Datenaufnahme (Start-Signal)
```

Anhang

```
'
      Auto-Zero-Signal für den Detektor
'
      Start des Programms von HPLC-Pumpe I
'
AUXIL 7 : Externes Hochdruckventil II - Umschalter
'
'
'
WAIT 3 : APEX-Datenaufnahme (Ready-Signal)
'
WAIT 4 :
'
WAIT 5 :
'
WAIT 6 :
'
WAIT 7 :
'
'
Ventilkonfiguration:
'
  Internes Hochdruckventil:
'
    1 : PEC-Anreicherungssäule
'
    2 : HPLC-Pumpe I
'
    3 : Analytische Säule (über manuelles Ventil)
'
    4 : PEC-Anreicherungssäule
'
    5 : Externes Hochdruckventil II
'
    6 : Abfall
'
'
  Schaltung:
'
      LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'
      INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'
'
  Externes Hochdruckventil:
'
    1 : Probenschleife
'
    2 : Internes Hochdruckventil II
'
    3 : HPLC-Pumpe II
'
    4 : Probenschleife
'
    5 : Abfall
'
    6 : Injektionsport
'
'
  Schaltung:
'
      LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'
      INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'
'
  Säulenvolumina:
'
      PEC: ca. 250 µL
'
  Probenschleifenvolumen:
'
      7000 µL
'
'
'
=====
'
  Verwendete Variablen:
'
'
' * A      Aktuelles Vial y-Richtung
' * B      Aktuelles Vial x-Richtung
' * B1     Probenvolumen
' * B16    Aktuelle Probennummer
' * A15    Dilutor-Rate(n)
' * A17    Dilutor-Rate (für die Probenanreicherung an der MCAEC).
' * C0     Vialanzahl
```


Anhang

```
'* C1      Aktuelle Vialnummer
'
' *****
      RACK CODE 34      'Rackdefinition.
      A15=4             'Dilutor-Rate Spülen (3,0 mL/min).
      A16=5             'Dilutor-Rate Ansaugen (6,0 mL/min).
      A17=3             'Dilutor-Rate Aufgeben (1,5 mL/min).
      B1=3750           'Probenaufgabevolumen (3,75 mL).
' *****
' Parameterabfrage und Plausibilitätskontrolle
' *****
Eingabe:
      INJECT 0          'Ventil I auf 'LOAD'.
      AUXIL  5/1        'Pumpe II starten.
      INPUT  C0/51      'Eingabe 'NB OF VIALS'.
      IF     C0>12      'Mehr als 12 Proben geht nicht!
      GOTO  Eingabe     'Nochmal fragen.
' *****
' Programmvariablen in den Grundzustand
' Beginn der Programmschleife
' *****
      C1=0              'Aktuelle Vialnummer löschen.
      B16=0             'Aktuelle Probennummer löschen.
' *****
' Schleifenkopf
' *****
      A=1               'Anfangswert für äußere Schleife (y).
LoopA:
      B=1               'Anfangswert für innere Schleife (x).
LoopB:
      C1=C1+1          'Vialnummer weiterzählen.
      B16=B16+1        'Probennummer weiterzählen.
' *****
' Nächste Probe berechnen und Programm evtl. fortsetzen
' *****
      IF B16>C0        'Ist das letzte Vial schon bearbeitet?
      GOTO FINITO      'Wenn ja, dann ist jetzt Schluß!
' *****
' Probe aufziehen
' *****
      PRINT B16/132     'Ausgabe 'RINSING' und Probennummer.
      RINSE             'Nadel in die Spülstation.
      DISP 0/5000/7     'Nadel innen und außen abspülen.
' *****
' Probe aufgeben
' *****
      PRINT B16/72      'Ausgabe 'COLLECTION' und Probennummer.
      TUBE  A/B         'Nadel in das aktuelle Vial tauchen.
      ASPIR 0/B1/A16    'Dil. 0 zieht <B1> µL Probe auf.
      TUBE  0/0         'Nadel in den Injektionsport bewegen.
      DISP 0/B1/A17/    'Dilutor 0 gibt <B1> µL Probe ab,
      ASPIR 1/-B1/A17   ' während Dil. 1 die Probe anzieht.
```

Anhang

```
WAIT 10 'Kurz warten.
DISP 1/B1/A16/ 'Dilutor 1 gibt Lösung wieder ab.
B=B+1 'Zweites Vial dieser Probe nehmen.
C1=C1+1 'Vialnummer weitersetzen.
TUBE A/B 'Nadel eintauchen.
ASPIR 0/B1/A16 'Dilutor 0 zieht <B1> µL Probe auf.
TUBE 0/0 'Nadel in den Injektionsport tauchen.
DISP 0/B1/A17/ 'Dilutor 0 gibt <B1> µL Probe wieder ab.
ASPIR 1/-B1/A17 'Dilutor 1 zieht gleichzeitig.
WAIT 10 'Kurze Pause.
DISP 1/B1/A16/ 'Dilutor 1 gibt Angesaugtes in den Abfall.
B=B+1 'Drittes Vial dieser Probe berechnen.
C1=C1+1 'Vialnummer hochzählen.
TUBE A/B 'Nadel ins dritte Vial eintauchen.
ASPIR 0/B1/A16 'Dil. 0 zieht <B1> µL Probe auf.
TUBE 0/0 'Nadel in den Injektionsport.
DISP 0/B1/A17/ 'Aufgezogene Probe wieder abgeben,
ASPIR 1/-B1/A17 ' während Dil. 1 diese entgegennimmt.
WAIT 10 'Kleine Auszeit.
DISP 1/B1/A16 'Dilutor 1 verwirft das Angesaugte.
' *****
' Probe zur PEC fördern und mit Wasser nachspülen
' *****
PRINT B16/69 'Ausgabe 'ENRICHMENT' und Probennummer.
AUXIL 7/1 'Ventil II auf Position 'INJECT'.
WAIT 2 '
AUXIL 7/0 '
ASPIR 0/-5000/7 'Dilutor 0 zieht 5 mL Wasser auf.
DISP 0/5000/A17/ 'Dilutor 0 spült Zuleitungen mit Wasser.
ASPIR 1/-5000/A17 'Dilutor 1 saugt Spüllösung an.
WAIT 20 'Kleine Pause.
DISP 1/5000/A16 'Dilutor 1 verwirft Spüllösung.
WAIT 2000 '20 Minuten warten.
' *****
' Prüfen, ob APEX bereit ist, Daten aufzunehmen
' *****
PRINT B16/74 'Ausgabe 'ANALYSIS' und Probennr.
Warten2:
IF /3/=0 'Ist APEX ready?
GOTO Start 'Dann kann's losgehen.
PRINT B16/149 'Ausgabe 'WAIT CTRL.' und Probennummer
GOTO Warten2 ' dann noch warten.
Start:
WAIT 100 'APEX eine kleine Pause einräumen.
' *****
' Analyten von der PEC auf die analytische Säule eluieren
' *****
PRINT B16/17 'Ausgabe 'INJECTION' und Probennummer.
AUXIL 6/2 'APEX bekommt gepulstes Startsignal.
INJECT 1 'Ventil I auf 'INJECT'
'Analyttransfer von der Anreicherungssäule
' auf die analytische Säule beginnt.
```

Anhang

```
      WAIT 1000          'Kurze Pause.
      INJECT 0           'Ventil I auf 'LOAD'.
      AUXIL 7/1         'Ventil II auf 'LOAD'.
      WAIT 2            '
      AUXIL 7/0         '
      WAIT 1000         'Warten, bis Analysenlauf beendet.
      A=A+1             'Schleifenzähler weiterzählen.
      IF A<13           'Noch innerhalb des Racks?
      GOTO LoopA       'Nächster Schleifendurchlauf.
Finito:                '
      WAIT 2000         'Pause machen.
      AUXIL 5/0         'Pumpe II anhalten.
      HOME              'Programm beenden.
```

5.2.3 Programm 052

```
; Modell ASTED V1.11
* Dilutor Nr. 0 mit Spritze 5000 µL
* Dilutor Nr. 1 mit Spritze 5000 µL
;*****
' Programmname      : FILE052.SST      Version : 1.6
' Erstellt am       : 22.11.2001      um 11:35 Uhr
' Letzte Änderung am: 27.01.2003      um 06:55 Uhr
' Filenummer        : 052      Teil von Programm : ---
' Beschreibung      : Vollautomatische Analyse (nur SPE)
' Autor            : Thorsten Münstedt
'
' =====
'
' Externe Geräte sind konfiguriert:
'
' Externes Hochdruckventil (Ventil II) beim Start auf Position 'INJECT'.
' Ventil I vor dem Start des Programms manuell auf Position 1 schalten.
' Sepharose-Säule aus dem Gerät entfernen, Leitungen verbinden.
'
' Kommunikationsanschlüsse:
'   AUXIL 0 : Startsignal HPLC-Pumpe und DAD-Datenaufnahme
'   AUXIL 1 : Niederdruckventil Position 1 (Injektionsport / Wasser)
'   AUXIL 2 : 1:6-Ventilschaltung (Schaltsignal)
'   AUXIL 3 : Schaltung für 1:6-Ventil (Low-Bit)
'   AUXIL 4 : Schaltung für 1:6-Ventil (High-Bit)
'   AUXIL 5 : HPLC-Pumpe II - Start : 1   Stop : 0
'   AUXIL 6 : APEX-Datenaufnahme (Start-Signal)
'             Auto-Zero-Signal für den Detektor
'   AUXIL 7 : Externes Hochdruckventil II - Umschalter
'
'   WAIT 3 : APEX-Datenaufnahme (Ready-Signal)
'   WAIT 4 :
'   WAIT 5 :
'   WAIT 6 :
```

Anhang

```
'   WAIT 7 :
'
' Ventilkonfiguration:
'   Ventil III (Internes Hochdruckventil):
'     1 : PEC-Anreicherungssäule
'     2 : HPLC-Pumpe II
'     3 : Analytische Säule (über manuelles Ventil)
'     4 : PEC-Anreicherungssäule
'     5 : Externes Hochdruckventil II
'     6 : Abfall
'
'   Schaltung:
'           LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'           INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
' Ventil II (Externes Hochdruckventil):
'     1 : Probenschleife (10 mL)
'     2 : Internes Hochdruckventil II
'     3 : HPLC-Pumpe I
'     4 : Probenschleife
'     5 : Abfall
'     6 : Injektionsport
'
'   Schaltung:
'           LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'           INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'   Anmerkung: Der apparative Aufbau braucht gegenüber dem Aufbau für
'               Programm 53 nicht verändert zu werden. Lediglich die
'               Sepharose-Säule muß ausgebaut und die Leitungen
'               entsprechend angeschlossen werden.
'
' Säulenvolumina:
'           PEC: ca. 250 µL
' Probenschleifenvolumen:
'           5000 µL
'
' =====
' Verwendete Variablen:
'
'   A   Aktuelles Vial y-Richtung
'   B   Aktuelles Vial x-Richtung
'   B1  Probenvolumen
'   B10 Gesamtvolumen (Probenvolumen + 2 * Luftvolumen)
'   B16 Aktuelle Probennummer
'   A15 Dilutor-Rate(n)
'   A17 Dilutor-Rate (für die Probenanreicherung an der MCAEC).
'   C0  Vialanzahl
'   C1  Aktuelle Vialnummer
'   C8  Dauer der Aufgabe der Kupferlösung [1/100 min]
```

Anhang

```
' C9      Spüldauer nach Aufgabe der Probe [1/100 min]
' C10     Aufgabezeit für den Analyten auf der MCAEC [1/100 min]
' C11     Spüldauer MCAEC (Wasser) [1/100 min]
' C12     Spüldauer MCAEC (Acetonitril) [1/100 min]
' C13     Konditionierungsdauer PEC (Wasser) [1/100 min]
' C14     Spüldauer MCAEC (EDTA) [1/100 min]
'
'
' *****
      RACK CODE 34          'Rackdefinition.
      A15=6                'Dilutor-Rate Entsorgen (12ml/min)
      A16=5                'Dilutor-Rate Ansaugen (6,0 mL/min).
      A17=3                'Dilutor-Rate Aufgeben (1,5 mL/min).
      B1=3750              'Probenaufgabevolumen (3,75 mL).
' *****
' Parameterabfrage und Plausibilitätskontrolle
' *****
Eingabe:
      AUXIL  5/1           'Pumpe I starten.
      INPUT  C0/51         'Eingabe 'NB OF VIALS'.
      IF     C0>36         'Mehr als 36 Proben geht nicht!
      GOTO   Eingabe       'Nochmal fragen.
' *****
' Programmvariablen in den Grundzustand
' Beginn der Programmschleife
' *****
      C1=0                 'Aktuelle Vialnummer löschen.
      B16=0                'Aktuelle Probennummer löschen.
      INJECT 0              'Ventil III auf Position 'LOAD'.
' *****
' Schleifenkopf
' *****
      A=1                  'Anfangswert für äußere Schleife (y).
LoopA:
      B=1                  'Anfangswert für innere Schleife (x).
LoopB:
      C1=C1+1              'Vialnummer weiterzählen.
      B16=B16+1            'Probennummer weiterzählen.
' *****
' Nächste Probe berechnen und Programm evtl. fortsetzen
' *****
      IF B16>C0            'Ist das letzte Vial schon bearbeitet?
      GOTO FINITO          'Wenn ja, dann ist jetzt Schluß!
' *****
' Nadel vorspülen
' *****
      PRINT B16/132        'Ausgabe 'RINSING' und Probennummer.
      RINSE                'Nadel in die Spülstation.
      DISP  0/5000/A15     'Nadel innen und außen abspülen (5 mL).
' *****
' Probe aufgeben
' *****
```

Anhang

```
PRINT B16/69          'Ausgabe 'ENRICHMENT' und Probennummer.
TUBE A/B              'Nadel in das aktuelle Vial tauchen.
ASPIR 0/B1/A17        'Dil. 0 zieht <B1> µL Probe auf.
WAIT 33               'Ca. 20 Sekunden warten.
TUBE 0/0              'Nadel in den Injektionsport bewegen.
AUXIL 7/2             'Ventil II auf 'LOAD'.
DISP 0/B1/A17/        'Dilutor 0 gibt <B1> µL Probe ab,
ASPIR 1/-B1/A17       ' während Dil. 1 die Probe anzieht.
WAIT 10               'Kurz warten.
DISP 1/B1/A15/        'Dilutor 1 gibt Lösung wieder ab.
ASPIR 0/-1000/A17     'Dilutor 0 zieht 1 mL Wasser auf.
DISP 0/1000/A17/     'Dilutor 0 gibt Wasser ab,
ASPIR 1/-1000/A17    ' und Dilutor 1 nimmt es entgegen.
DISP 1/1000/A17      'Dilutor 1 gibt Wasser in den Abfall.
' *****
' Analyten zur Anreicherungs säule transferieren
' *****
AUXIL 7/2             'Ventil II auf 'INJECT' schalten.
A3=6                  'Wartevariable setzen.
Zeigel:
PRINT B16*100+A3/72   'Ausgabe 'COLLECTION', Probennummer, Zeit.
WAIT 100              'Eine Minute warten.
A3=A3-1               'A3 dekrementieren.
IF A3>0               'Schon das Ende erreicht?
GOTO Zeigel           'Wenn nicht, dann weiter warten.
' *****
' Anreicherungs säule mit Wasser nachspülen
' *****
A3=10                 'Wartenzeit in Minuten festlegen.
Zeige2:
PRINT B16*100+A3/130 'Ausgabe 'WASHING', Probennummer, Zeit.
WAIT 100              'Eine Minute warten.
A3=A3-1               'Wartevariable runterzählen.
IF A3>0               'Zeit abgelaufen?
GOTO Zeige2           'Wenn nicht, dann oben weiter.
' *****
' Prüfen, ob Datenaufnahmeeinheit bereit ist
' *****
PRINT B16/149        'Ausgabe 'WAIT CTRL' und Probennummer.
Warten2:
IF /3/=0              'Aufnahmegerät bereit?
Goto Start2           'Dann geht's los!
Goto Warten2          'Sonst noch warten!
' *****
' Analyten von der Anreicherungs säule zur analytischen Säule eluieren.
' *****
Start2:
PRINT B16/17          'Ausgabe 'INJECTION' und Probennummer.
AUXIL 6/2             'Startsignal für Datenaufnahme geben.
AUXIL 0/2             'Startsignal für HPLC-Pumpe geben.
INJECT 1              'Ventil III auf 'INJECT'.
```

Anhang

```
WAIT 1000          '10 Minuten warten.
INJECT 0           'Ventil III wieder auf 'LOAD' schalten.
WAIT 1000          'Noch 10 Minuten warten.
B=B+1              'Schleifenzähler weiterzählen.
IF B<4             'Noch innerhalb einer Spalte?
GOTO LoopB        'Dann geht's oben weiter...
A=A+1              'Schleifenzähler weiterzählen.
IF A<13           'Noch innerhalb des Racks?
GOTO LoopA        'Nächster Schleifendurchlauf.
```

Finito:

```
WAIT 30
HOME
```

' * Variablenbelegung *

```
' A 117 138 193 193 194
' A3 155 157 159 159 160 165 167 169 169 170
' A15 95 133 146
' A16 96
' A17 97 139 143 144 147 148 149 150
' B 119 138 190 190 191
' B1 98 139 143 144 146
' B16 112 122 122 126 131 137 157 167 175 185
' C0 104 105 126
' C1 111 121 121
```

5.2.4 Programm 053

```
; Modell ASTED V1.11
* Dilutor Nr. 0 mit Spritze 5000 µL
* Dilutor Nr. 1 mit Spritze 5000 µL
*****
' Programmname      : FILE053.SST      Version : 3.10
' Erstellt am      : 20.09.2001
' Letzte Änderung am: 12.03.2002
' Filenummer       : 053 Teil von Programm : ---
' Beschreibung     : Vollautomatische Analyse nach §35 LMBG
' Autor            : Thorsten Münstedt
'
' =====
' Externe Geräte sind konfiguriert:
'
' Externes Hochdruckventil (Ventil II) beim Start auf Position 'INJECT'.
'
' Kommunikationsanschlüsse:
'   AUXIL 0 : Startsignal HPLC-Pumpe
'             Startsignal für Dioden-Array-Detektor
'   AUXIL 1 : Niederdruckventil Position 1 (Injektionsport / Wasser)
```

Anhang

```
' AUXIL 2 : 1:6-Ventilschaltung (Schaltsignal)
' AUXIL 3 : Schaltung für 1:6-Ventil (Low-Bit)
' AUXIL 4 : Schaltung für 1:6-Ventil (High-Bit)
' AUXIL 5 : HPLC-Pumpe II - Start : 1   Stop : 0
' AUXIL 6 : APEX-Datenaufnahme (Start-Signal)
'           Auto-Zero-Signal für den Detektor
' AUXIL 7 : Externes Hochdruckventil II - Umschalter
'
' WAIT 3 : APEX-Datenaufnahme (Ready-Signal)
' WAIT 4 :
' WAIT 5 :
' WAIT 6 :
' WAIT 7 :
'
' Ventilkonfiguration:
'   Ventil III (Internes Hochdruckventil):
'     1 : PEC-Anreicherungssäule
'     2 : HPLC-Pumpe II
'     3 : Analytische Säule (über manuelles Ventil)
'     4 : PEC-Anreicherungssäule
'     5 : Externes Hochdruckventil II
'     6 : Abfall
'
'   Schaltung:
'           LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'           INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'   Ventil II (Externes Hochdruckventil):
'     1 : Probenschleife (10 mL)
'     2 : Internes Hochdruckventil II
'     3 : HPLC-Pumpe I
'     4 : Probenschleife
'     5 : Abfall
'     6 : Ventil I (über Sepharose-Säule)
'
'   Schaltung:
'           LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'           INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'   Ventil I (ABC 1:6-Ventil):
'     1 : Injektionsport / Wasser
'     2 : Kupfersulfatlösung
'     4 : Methanol
'     5 : EDTA-Puffer pH 4,0
'     6 : Succinatpuffer pH 4,0
' Schalttabelle Ventil I:
'
'   AUXIL   2 3 4   Position
'           0 0 0     1
'           1 0 0     2
'           0 1 0     3
```


Anhang

```
AUXIL 2/0
'
' *****
' Schleifenkopf
' *****
      A=1                      'Anfangswert für äußere Schleife (y).
LoopA:
      B=1                      'Anfangswert für innere Schleife (x).
LoopB:
      C1=C1+1                  'Vialnummer weiterzählen.
      B16=B16+1                'Probennummer weiterzählen.
' *****
' Nächste Probe berechnen und Programm evtl. fortsetzen
' *****
      IF B16>C0                 'Ist das letzte Vial schon bearbeitet?
      GOTO FINITO               'Wenn ja, dann ist jetzt Schluß!
' *****
' Nadel und Sepharose vorspülen
' Parallel erfolgt der Proben transfer von der Probenschleife zur PEC
' *****
      PRINT B16/132             'Ausgabe 'RINSING' und Probennummer.
      RINSE                     'Nadel in die Spülstation.
      DISP 0/5000/A15           'Nadel innen und außen abspülen ( 5 mL).
      AUXIL 4/0                 'Ventil I auf Position 1.
      AUXIL 3/0                 '
      AUXIL 2/0                 '
      WAIT 5                    'Kurz warten.
      ASPIR 0/-5000/A15         'Dilutor 0 zieht 5 mL Wasser an.
      TUBE 0/0                  'Nadel in den Injektionsport bewegen.
      ASPIR 1/-5000/A17/        'Dilutor 1 nimmt Wasser entgegen...
      DISP 0/5000/A17           '... während Dilutor 0 Wasser abgibt.
      DISP 1/5000/A15           'Dilutor 1 gibt Spüllösung in den Abfall.
' *****
' Sepharose beladen
' *****
      PRINT B16/126             'Ausgabe 'LOADING' und Probennummer.
      AUXIL 2/1                 'Ventil I schalten (Pos. 2, Kupferlsg.).
      WAIT 2                    'Kurz warten.
      ASPIR 1/-5000/A18         'Dilutor 1 saugt 5 mL Lösung an.
      DISP 1/5000/A15           'Dilutor 1 gibt Lösung in den Abfall.
' *****
' Sepharose mit Puffer spülen
' Parallel wird die PEC mit Wasser gespült
' *****
      PRINT B16/75              'Ausgabe 'PREPARATION' und Probennummer.
      AUXIL 4/1                 'Ventil I schalten (Pos. 6, Puffer).
      WAIT 2                    'Kurz warten.
      ASPIR 1/-5000/A18         'Dilutor 1 saugt 5 mL Lösung an.
      DISP 1/5000/A15           'Dilutor 1 gibt Lösung in den Abfall.
' *****
' Probe aufgeben
' *****
      PRINT B16/69              'Ausgabe 'ENRICHMENT' und Probennummer.
```

Anhang

```
TUBE A/B 'Nadel in das aktuelle Vial tauchen.
ASPIR 0/B1/A17 'Dil. 0 zieht <B1> µL Probe auf.
WAIT 5 'kurz warten.
TUBE 0/0 'Nadel in den Injektionsport bewegen.
AUXIL 2/0 'Ventil I auf Position 1 schalten
AUXIL 4/0
WAIT 10 'Kurz warten.
ASPIR 1/-B1/A17/ 'Dilutor 1 nimmt <B1> µL Probe entgegen..
DISP 0/B1/A17 '... die Dilutor 0 abgibt.
WAIT 5 'Kurz warten.
DISP 1/B1/A15/ 'Dilutor 1 gibt Lösung wieder ab.
' *****
' Prüfen, ob Datenaufnahmeeinheit bereit ist
' *****
PRINT B16/149 'Ausgabe 'WAIT CTRL' und Probennummer.
Warten:
IF /3/=0 'Aufnahmegerät bereit?
Goto Start 'Dann geht's los!
Goto Warten 'Sonst noch warten!
' *****
' Analyten von der Anreicherungsäule zur analytischen Säule transferieren
' *****
Start:
AUXIL 6/2 'Startsignal für Datenaufnahme; AutoZero UV Detektor
AUXIL 0/2 'Startsignal für HPLC-Pumpe, DAD
INJECT 1 'Ventil III auf 'INJECT'.
' *****
' Aufgabesystem und Sepharose nachspülen
' *****
PRINT B16/68 'Ausgabe 'CLEAN UP' und Probennummer.
ASPIR 0/-5000/A15 'Dilutor 0 zieht 5 mL Wasser an.
DISP 0/5000/A17/ 'Dilutor 0 gibt 5 mL Wasser ab...
ASPIR 1/-5000/A17 '...während Dilutor 1 5 mL ansaugt
DISP 1/5000/A15 'Dilutor 1 gibt Spüllösung in den Abfall
' *****
' Sepharose mit Methanol spülen
' *****
PRINT B16/78 'Ausgabe 'EXTRACTION' und Probennummer.
AUXIL 3/1 'Ventil I schalten (Pos. 4).
AUXIL 2/1 '
WAIT 10 'Warten.
ASPIR 1/-5000/A18 'Dilutor 1 saugt 5 mL Methanol an.
DISP 1/5000/A15 'Dilutor 1 gibt Lösung in den Abfall.
' *****
' Sepharose mit Wasser spülen
' *****
PRINT B16/130 'Ausgabe 'WASHING' und Probennummer.
AUXIL 3/0 'Ventil I auf Position 1.
AUXIL 2/0 '
WAIT 20 'Kurz warten.
ASPIR 0/-5000/A15 'Dilutor 0 zieht 5 mL Wasser an.
```

Anhang

```
INJECT 0          'Ventil III auf Position 'LOAD'.
DISP  0/5000/A17/ 'Dilutor 0 gibt 5 mL Wasser ab...
ASPIR 1/-5000/A17 ' ...während Dilutor 1 5 mL ansaugt.
DISP  1/5000/A15  'Dilutor 1 gibt Spüllösung in den Abfall.
' *****
' Analyten mit EDTA zur Probenschleife eluieren
' *****
PRINT B16/131     'Ausgabe 'ELUTING' und Probennummer.
AUXIL 4/1         'Ventil I schalten (Pos. 5).
WAIT 10          'Warten.
AUXIL 7/2         'Ventil II auf 'LOAD' schalten.
ASPIR 1/-5000/A18 'Dilutor 1 zieht 5 mL EDTA-Puffer an.
DISP  1/5000/A15/ 'Dilutor gibt Lösung in den Abfall.
AUXIL 7/2         'Ventil II auf 'INJECT' schalten, damit
                  ' Analytttransfer beginnt.
B=B+1            'Schleifenzähler weiterzählen.
IF B<4           'Noch innerhalb einer Spalte?
GOTO LoopB
                  'Dann geht's oben weiter...
A=A+1            'Schleifenzähler weiterzählen.
IF A<13          'Noch innerhalb des Racks?
GOTO LoopA       'Nächster Schleifendurchlauf.
' *****
' Programm beenden und letzten Analysenlauf abschließen
' *****
Finito:
' *****
' Analyten zur Anreicherungssäule transferieren
' *****
PRINT B16/72     'Ausgabe 'COLLECTION' und Probennummer.
WAIT 600         '6 Minuten warten.
' *****
' Anreicherungssäule mit Wasser nachspülen
' *****
PRINT B16/130    'Ausgabe 'WASHING' und Probennummer.
WAIT 1000        '10 Minuten warten.
' *****
' Prüfen, ob Datenaufnahmeeinheit bereit ist
' *****
PRINT B16/149    'Ausgabe 'WAIT CTRL' und Probennummer.
Warten2:
IF /3/=0         'Aufnahmegerät bereit?
Goto Start2     'Dann geht's los!
Goto Warten2    'Sonst noch warten!
' *****
' Analyten von der Anreicherungssäule zur analytischen Säule eluieren.
' *****
Start2:
AUXIL 6/2        'Startsignal für Datenaufnahme geben.
AUXIL 0/2        'Startsignal für HPLC-Pumpe geben.
INJECT 1         'Ventil III auf 'INJECT'.
```

Anhang

```
' *****
' Aufgabesystem und Sepharose nachspülen
' *****
      PRINT B16/68          'Ausgabe 'CLEAN UP' und Probennummer.
      AUXIL 4/0            'Ventil I in Position 1 schalten.
      AUXIL 3/0            '
      AUXIL 2/0            '
      ASPIR 0/-5000/A15    'Dilutor 0 zieht 5 mL Wasser an.
      DISP 0/5000/A17/    'Dilutor 0 gibt 5 mL Wasser ab,
      ASPIR 1/-5000/A17    ' ... und Dilutor 1 nimmt 5 mL entgegen.
      DISP 1/5000/A15     'Dilutor 1 gibt Spüllösung in den Abfall
' *****
' Analysen beendet, Pumpen abschalten
' *****
      AUXIL 3/1            'Ventil I auf Position 3 (Leerpositon)
      WAIT 500             'Pause machen.
      AUXIL 5/0            'Pumpe II anhalten.
      PRINT B16/86        'Ausgabe 'DELAY' und lange warten.
      WAIT 9999
      HOME                 'Programm beenden.
```

5.2.5 Programm 060

```
; Model ASTED V1.11
* Diluter Nr. 1 mit Spritze 5000 µL
* Diluter Nr. 0 mit Spritze 5000 µL
' *****
' Programmname      : FILE060.SST      Version : 1.1
' Erstellt am      : 21.03.2000      um 15:30 Uhr
' Letzte Änderung  : 07.03.2001      um 10:50 Uhr
' Filenummer       : 060      Teil von Programm : ---
' Beschreibung     : Spülprogramm: Vorbereitung Dialyse
' Autor            : Thorsten Münstedt
' AUXIL 2 : LMV870 auf Position 2 (Spüllösung)
' AUXIL 4 : LMV870 auf Position 3 (Luft)
' AUXIL 5 : LMV870 auf Position 1 (Akzeptorkammerlösung)
'
' Externes Hochdruckventil beim Start auf Position "INJECT"
' Erst wird mit Akzeptorkammerlösung gespült, um die Zuleitungen zu säubern
' Anschließend wird mit Spüllösung gespült
'
' *****
      RACK CODE 34          'Rackdefinition
      PRINT /75            'Ausgabe "PREPARATION"
      WAIT 5                'Kurze Wartezeit
      INPUT B13/144        'Eingabe "WASH VOL."
      AUXIL 5/1            'Niederdruckventil auf Pos. 1
      WAIT 2                'Kurz warten
      AUXIL 5/0            'Signal löschen
      TUBE 0/0             'Nadel in den Injektionsport
```

Anhang

```
DISP 0/B13/5/      'Donorkammer mit <B13> µL spülen
DISP 1/B13/3      'Akzeptorkammer mit <B13> µL spülen
AUXIL 2/1         'Niederdruckventil auf Pos. 2
WAIT 2            'Bedenkzeit lassen
AUXIL 2/0         'Signal löschen
DISP 0/B13/5/      'Donorkammer mit <B13> µL spülen
DISP 1/B13/3      'Akzeptorkammer mit <B13> µL spülen
HOME              'Programm beenden.
,
' * Variablenbelegung *
,
' B13  23  28  29  33  34
```

5.2.6 Programm 070

```
; Model ASTED V1.11
* Dilutor Nr. 0 mit Spritze 5000 µL
* Dilutor Nr. 1 mit Spritze 5000 µL
*****
' Programmname      : FILE070.SST      Version : 1.7
' Erstellt am      : 28.07.2000      um 11:04 Uhr
' Letzte Änderung am: 15.11.2000      um 18:05 Uhr
' Filenummer       : 070      Teil von Programm : ---
' Beschreibung     : Dialyse-Programm für Rack 34
' Autor           : Thorsten Münstedt
' Dynamisches Warten!
' Gepulstes Startsignal für APEX-Aufnahme
' Gepulstes Startsignal für DAD-Aufnahme
' Schleifen ohne FOR / NEXT - Konstruktionen
,
' DAD muß nicht angeschlossen sein, Startsignal wird immer ausgegeben.
' APEX-Datenaufnahme muß bereit sein, sonst erfolgt keine Injektion!
,
' ACHTUNG! Dieses Programm erfordert immer Spülvials!
,
' Spül- und Probenvials wechseln sich ab, erstes Vial ist Spülvial.
,
' Spüldauer der Anreicherungskartusche kann eingegeben werden
' (in 1/100 Minuten): Standard = 650 --> 6,5 Minuten.
,
' Spülvolumen für Aufgabesystem kann eingegeben werden
' (in µL): Standard = 25000 --> 25 mL Dilutor-0 Lösung.
,
' =====
,
' Externe Geräte sind konfiguriert:
'   Externes Niederdruckventil:
'     Position 1: Akzeptorkammerlösung
'     Position 2: Akzeptorkammerspüllösung
'     Position 3: Luft
```

Anhang

```
'
'
' Externes Hochdruckventil beim Start auf Position "LOAD"
'
'
' Kommunikationsanschlüsse:
'   AUXIL 0 : Externes Hochdruckventil (Umschalter)
'   AUXIL 1 : Diodenarray-Detektor (Start-Signal)
'   AUXIL 2 : Niederdruckventil Position 2
'   AUXIL 3 : APEX-Datenaufnahme (Ready-Signal)
'   AUXIL 4 : Niederdruckventil Position 3
'   AUXIL 5 : Niederdruckventil Position 1
'   AUXIL 6 : APEX-Datenaufnahme (Start-Signal)
'
'
' Ventilkonfiguration:
'   Internes Hochdruckventil:
'     1 : Anreicherungssäule
'     2 : HPLC-Pumpe I
'     3 : Analytische Säule (über manuelles Ventil)
'     4 : Anreicherungssäule
'     5 : Externes Hochdruckventil
'     6 : Abfall
'
'
'   Schaltung:
'           LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'           INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'
'
'   Externes Hochdruckventil:
'     1 : Dialysatsammelschleife
'     2 : HPLC-Pumpe II
'     3 : Internes Hochdruckventil
'     4 : Dialysatsammelschleife
'     5 : Dilutor 1
'     6 : Abfall
'
'
'   Schaltung:
'           LOAD   : 6---1   2---3   4---5   6
'           INJECT : 6   1---2   3---4   5---6
'
'
' =====
' Verwendete Variablen:
'
'
'   A   Aktuelles Vial y-Richtung
'   B   Aktuelles Vial x-Richtung
'   B16  Aktuelle Probennummer
'   A16  Volumen, mit dem das Aufgabesystem gespült werden soll
'   A17  Luftvolumen in der Dosiernadel-Schleife (vor und hinter der Probe)
'   C0   Vialanzahl
'   C1   Aktuelle Vialnummer
'   C11  Spüldauer der TEC in 1/100 Minuten
'
'
'
' *****
```

Anhang

```
RACK CODE 34          'Rackdefinition
A17=50                'Luftvolumen = 50 µL
' *****
' Parameterabfrage und Plausibilitätskontrolle
' *****
Eingabe:
INPUT C0/51           'Eingabe "NB OF VIALS"
IF C0>36              'Mehr als 36 Vails geht nicht!
GOTO Eingabe         'Nochmal fragen.
INPUT A16/138         'Eingabe "DON. PG. VOL."
INPUT C11/90          'Eingabe "CLEANUP TIME"
' *****
' System vorspülen und luftfrei machen (neu 01.08.2000)
' *****
PRINT 1/81            'Ausgabe "DEGASSING 1"
TUBE 0/0              'Nadel in den Injektionsport
DISP 0/7000/2/4/     'Probenaufgabesystem und DK spülen
AUXIL 5/1             'Externes Niederdruckventil auf Pos. 1
WAIT 2                'Warten
AUXIL 5/0             'Signal löschen
DISP 1/2000/3/1      'Akzeptorkammer wird mit 5 mL gespült
PRINT 2/81           'Ausgabe "DEGASSING 2"
AUXIL 2/1            'Externes Niederdruckventil auf Pos. 2
WAIT 2                'Kurz warten
AUXIL 2/0            'Signal wegnehmen
DISP 1/2000/3/1/     'Akzeptorkammer wird mit 5 mL gespült
' *****
' Programmvariablen in den Grundzustand
' Beginn der Programmschleife
' *****
C1=0                  'Aktuelle Vialnummer löschen
B16=0                 'Aktuelle Probennummer löschen
A=1                   'Anfangswert für äußere Schleife (y)
LoopA:
  B=1                  'Anfangswert für innere Schleife (x)
LoopB:
' *****
' Nadel außen und Probenaufgabesystem spülen
' *****
PRINT B16/132        'Ausgabe "RINSING" und letzte Probennr.
RINSE                'Nadel in Spülposition
DISP 0/1500/5        'Nadel mit 1,5 mL spülen
TUBE 0/0             'Nadel zum Injektionsport bewegen
INJECT 1             'Int. Hochdruckventil umschalten (INJECT)
DISP 0/4000/5        'Aufgabesystem spülen
' *****
' Nächste Probe berechnen und Programm evtl. fortsetzen
' *****
C1=C1+1              'Vialnummer weiterzählen
IF C1>C0              'Ist das letzte Vial schon bearbeitet?
GOTO Finito          'Wenn ja, dann ist jetzt Schluß!
' *****
```


Anhang

```
' Akzeptorkammer mit Spüllösung aus dem Spülvial spülen
' Donorkammer, Injektionsport und Nadel spülen
' *****
      PRINT /94           'Ausgabe "PURGING"
      AUXIL 2/1          'Externes Niederdruckventil auf Pos. 2
      WAIT 2             'Warten
      AUXIL 2/0          'Signal löschen
      DISP 1/4000/3/1/   'Dilutor 1 spült AK mit 4 mL
      TUBE A/B           'Nadel zum aktuellen Vial bewegen
      HEIGHT             'Nadel ganz hoch
      ASPIR 0/A17/1      'Dilutor 0 saugt <A17> mL Luft an
      TUBE A/B           'Nadel ins Vial eintauchen
      ASPIR 0/3500/2     'Dilutor 0 saugt 3,5 mL Spüllösung an
      WAIT 2             'Kurz warten
      HEIGHT             'Nadel ganz hoch
      ASPIR 0/A17/1      'Dilutor saugt <A17> mL Luft an
      TUBE 0/0           'Nadel zum Injektionsport bewegen
      PRINT /130         'Ausgabe "WASHING"
      DISP 0/3500/2/3    'Dilutor gibt 3,5 mL Spüllösung ab
      RINSE              'Nadel in die Reinigungstation bewegen
      DISP 0/4000/4/5    'Dilutor 0 spült mit 4 mL Dil-0-Lösung
      WAIT 200           'Warten ???
      TUBE 0/0           'Nadel zum Injektionsport bewegen
      DISP 0/A16/3/5/    'Dilutor spült mit 25 ml Dil-0-Lösung
' *****
' Akzeptorkammer mit Akzeptorkammerlösung spülen
' Akzeptorkammer und Probenschleife mit Akzeptorkammerlösung spülen
' *****
      PRINT B16/128      'Ausgabe "REGENERATING" und Probennr.
      AUXIL 5/1          'Externes Niederdruckventil auf Pos. 1
      WAIT 5             'Bedenkzeit lassen
      AUXIL 5/0          'Schaltsignal löschen
      DISP 1/4000/4/2    'Dilutor 1 spült AK mit 4 mL AK-Lösung
      WAIT 2             'Kurz warten
      DISP 1/2000/4/2    'Dilutor 1 spült AK mit 2 ml AK-Lösung
      AUXIL 0/1          'Ext. Hochdruckventil umschalten (INJECT)
      WAIT 2             'Signal stehenlassen, warten
      AUXIL 0/0          'Signal wegnehmen
      DISP 1/4000/4/1    'Dilutor 1 spült AK mit 4 mL AK-Lösung
' *****
' Akzeptorkammer spülen
' Akzeptorkammer und Probenschleife vorbereiten
' *****
      PRINT B16/75       'Ausgabe "PREPARATION" und Probennr.
      AUXIL 4/1          'Externes Niederdruckventil auf Pos. 3
      WAIT 3             'Kurz abwarten
      AUXIL 4/0          'Signal löschen
      DISP 1/600/3/1     'Dilutor 1 saugt 600 µL Luft durch
      WAIT 2             'Warten
      AUXIL 5/1          'Externes Niederdruckventil auf Pos. 1
      WAIT 5             'Kurz warten
      AUXIL 5/0          'Signal löschen
```

Anhang

```
DISP 1/810/4/1      'Dilutor 1 saugt 810 µL AK-Lösung durch
                   'Probenschleife an Dilutor 1 anschließen
AUXIL 0/1           'Ext. Hochdruckventil umschalten (LOAD)
WAIT 2             'Kurz warten
AUXIL 0/2           'Signal wegnehmen
DISP 1/950/4/1     'Dilutor 1 saugt 950 µL AK-Lösung durch
WAIT 2             'Warten
' *****
' Nächste Probe und dazugehöriges Vial berechnen und Programm fortsetzen
' *****
      B=B+1          'Schleifenzähler weiterzählen
      IF B<4         'Noch innerhalb einer Spalte?
      GOTO Probe    ' dann mit Probenvial weitermachen
      B=1           'Neue Spalte beginnen
      A=A+1         'Schleifenzähler weiterzählen
      IF A>13       'Außerhalb des Racks?
      HOME          ' NOTAUS!
                   ' Diese Stelle darf vom Programm nie
                   ' erreicht werden (FATALER FEHLER)
' *****
' Probe in die Donorkammer einfüllen
' *****
Probe:
      C1=C1+1       'Vialnummer weiterzählen
      B16=B16+1     'Probennummer weiterzählen
      IF C1>C0      'Wenn alle Vials abgearbeitet sind
      GOTO Finito  ' dann ist jetzt Schluß
      PRINT B16/1   'Ausgabe "SAMPLE NB." und Probennr.
      TUBE A/B      'Probenposition anfahren
      HEIGHT        'Nadel ganz nach oben
      ASPIR 0/A17/1 ' <A17> mL Luft ansaugen
      TUBE A/B      'Nadel eintauchen
      ASPIR 0/2000/2 'Dilutor 0 saugt 2,0 mL Probe an
      WAIT 2        'Kurz warten
      HEIGHT        'Nadel ganz hoch
      ASPIR 0/A17/1 'Dilutor 0 saugt <A17> µL Luft an
      TUBE 0/0      'Nadel zum Injektionsport
' *****
' Dialyse beginnen
' *****
      PRINT B16/127 'Ausgabe "DIALYSING" und Probennummer
      INJECT 0      'Int. Hochdruckventil schalten (LOAD)
                   'Externes Ventil wird mit der Anreicherungs-
                   'säule verbunden
      DISP 0/1300/2/3 'Dilutor 0 gibt 1,3 mL Probe+Luft in DK
      WAIT 300      'Warten
      DISP 1/1350/3/1 'Dilutor 1 saugt 1350 µL Dialysat an
      WAIT 60       'Warten
      DISP 1/1350/3/1 'Dilutor 1 saugt 1350 µL Dialysat an
      WAIT 60       'Warten
      DISP 1/1350/3/1 'Dilutor 1 saugt 1350 µL Dialysat an
      WAIT 60       'Warten
```

Anhang

```
DISP 1/1450/3/1      'Dilutor 1 saugt 1450 µL Dialysat an
WAIT 12              'Kurz warten
' *****
' Analyttransfer auf die Anreicherungssäule beginnen
' Die Pumpe II pumpt das Dialysat auf die Anreicherungssäule
' und spült mit der TEC-Spüllösung nach
' *****
PRINT B16/17         'Ausgabe "INJECTION" und Probennr.
                    'Probenschleife ins System bringen
AUXIL 0/1            'Ext. Hochdruckventil umschalten (INJECT)
WAIT 2               'Kurze Bedenkzeit
AUXIL 0/0            'Signal löschen
' *****
' Dilutor 0 kann während der Anreicherung die Nadel
' und die Donorkammer spülen
' *****
PRINT B16/69         'Ausgabe "ENRICHMENT" und Probennummer
RINSE                'Nadel in die Reinigungsstation
DISP 0/1500/4/5      'Dilutor 0 spült mit 1,5 mL Dil-0-Lösung
DISP 0/3500/4/5      'Dilutor 0 spült mit 3,5 mL Dil-0-Lösung
TUBE A/B             'Nadel zum aktuellen Vial bewegen
HEIGHT               'Nadel ganz hoch
ASPIR 0/A17/1        'Dilutor 0 saugt <A17> µL Luft an
TUBE 0/0             'Nadel zum Injektionsport
DISP 0/1200/2/5      'Dilutor 0 spült mit 1,2 mL Dil-0-Lösung
DISP 0/2000/2/5/     'Dilutor 0 spült mit 2,0 mL Dil-0-Lösung
WAIT 2               'Kurz warten
WAIT C11             'Warten, bis TEC genug gespült wurde
' *****
' Prüfen, ob APEX bereit ist, Daten aufzunehmen
' *****
PRINT B16/74         'Ausgabe "ANALYSIS" und Probennr.
Warten2:
IF /3/=0             'Ist APEX ready?
GOTO Start           'Dann kann's losgehen
PRINT B16/149        'Ausgabe "WAIT CTRL." und Probennummer
GOTO Warten2         ' dann noch warten
Start:
WAIT 30              'APEX eine kleine Pause einräumen
' *****
' Analysenlauf starten
' *****
PRINT B16/17         'Ausgabe "INJECTION" und Probennummer
AUXIL 6/2            'APEX bekommt gepulstes Startsignal
AUXIL 1/2            'DAD bekommt gepulstes Startsignal
INJECT 1             'Int. Hochdruckventil umschalten (INJECT)
                    'Analyttransfer von der Anreicherungssäule
                    'auf die analytische Säule beginnt
AUXIL 0/1            'Ext. Hochdruckventil umschalten (LOAD)
                    'Dilutor 1 kann Probenschleife reinigen
WAIT 2               'Reaktionszeit abwarten
AUXIL 0/0            'Signal löschen
```

Anhang

```
      B=B+1                'Schleifenzähler weiterzählen
      IF B<4              'Noch innerhalb der Schleife?
      GOTO LoopB          'Innere Schleife durchführen
      A=A+1              'Schleifenzähler weiterzählen
      IF A<13            'Noch innerhalb des Racks?
      GOTO LoopA          'Nächster Schleifendurchlauf
Finito:                    '
      HOME                'Programm beenden.
'
' * Variablenbelegung *
'
'  A  115 143 146 201 201 202 215 218 259 294 294 295
' A17   85 145 150 217 222 261
'  B  117 143 146 197 197 198 200 215 218 259 291 291 292
' B16  114 122 163 178 211 211 214 227 246 255 270 274 281
'  C0   90  91 132 212
'  C1  113 131 131 132 210 210 212
' C11   93 266
```

5.3 Pufferlösungen

Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine

Chemikalien

1. Wasser (HPLC-Qualität)
2. Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)
3. Dinatriumhydrogenphosphat-Dedecahydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$)

Stammlösungen

- A. 21,38 g Citronensäure-Monohydrat in 1000 mL Wasser lösen.
- B. 71,62 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dedecahydrat in 1000 mL Wasser lösen.

Zum Ansetzen eines Puffers mit dem pH-Wert x,y wird das am Schnittpunkt der Tabelle 21 abgelesene Volumen der Stammlösung B in mL einem 100 mL Kolben vorgelegt und mit Stammlösung A aufgefüllt.

pH	x,0	x,1	x,2	x,3	x,4	x,5	x,6	x,7	x,8	x,9
2,y							10,8	13,2	15,6	18,1
3,y	20,6	22,6	24,7	26,6	28,5	30,3	32,2	33,9	35,5	37,1
4,y	38,6	40,0	41,4	42,7	44,0	45,4	46,7	48,0	49,3	50,4
5,y	51,5	52,6	53,6	54,7	55,8	56,9	58,0	59,2	60,5	61,8
6,y	63,2	64,6	66,1	67,7	69,3	71,0	72,8	74,8	77,2	79,8
7,y	82,4	85,6	86,9	88,8	90,7	92,1	93,6	94,6	95,7	

Tabelle 21 - Ansatzschema Pufferlösungen