

gefunden. Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist Phytinsäure vor allem auf Grund ihrer anti-nutritiven Eigenschaften bekannt. Sie bildet stabile Komplexe mit Proteinen und essentiellen Mineralstoffen und setzt dadurch deren Bioverfügbarkeit herab. Deshalb muss Phytinsäure auch im Rahmen einer Sicherheitsbewertung neuartiger Lebensmittel beachtet werden. Analytische Methoden zu ihrer Bestimmung in Getreiden sind aufwändig und beruhen häufig auf der Gewinnung eines salzsauren Extraktes, der nach anionenchromatographischer Aufreinigung mittels photometrischer oder flüssigkeitschromatographischer Verfahren untersucht wird.

Die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) stellt eine interessante Alternative zu nasschemischen Analysemethoden dar. Sie wird seit langem erfolgreich zur schnellen und nicht-destruktiven Quantifizierung der Hauptinhaltsstoffe von Getreiden (z.B. Wasser, Fett, Protein) eingesetzt. Weit weniger Methoden wurden bisher für Minorbestandteile beschrieben.

Ziel dieser Studie war die Entwicklung einer NIRS-Methode zur Bestimmung von Phytinsäure in Braunreis und deren Anwendung auf die vergleichende Untersuchung von gentechnisch veränderten und konventionellen Reisproben. Zur Methodenentwicklung wurde zunächst ein großes Spektrum von Braunreisproben ($n = 67$) mit einer nasschemischen Referenz-

methode analysiert und auf der Basis des ermittelten Phytinsäuregehaltes (0,3–1,5%) und weiterer Charakteristika (Herkunft, Erntejahr) in einen Kalibrations- und einen Validationsprobensatz eingeteilt. NIR-Spektren (Wellenlängenbereich: 1000–2500 nm) der gemahlten und gefriergetrockneten Reismehle wurden durch Messung in diffuser Reflektion erhalten. Zur Aufstellung eines Algorithmus, der die Berechnung des Phytinsäuregehaltes eines Reismehles aus seinen NIR-spektroskopischen Daten erlaubt, wurden verschiedene Methoden, z. B. Partial-Least-Squares, Principal Component Regression, Ridge Regression, Multiple Linear Regression (MLR), getestet. Dabei stellte sich die MLR als das robusteste Verfahren heraus. Die Crossvalidierung der erstellten Kalibrationsmethode erbrachte eine durchschnittliche Abweichung des NIR-spektroskopisch vorhergesagten vom referenzanalytisch bestimmten Phytinsäuregehalt (RMSECV) von 0,10%. Für den unabhängigen Validationsprobensatz betrug dieser Wert (RMSEP) durchschnittlich 0,12%. Durch Bezug der Spannweite (1,2%) und der Standardabweichung (0,30%) der Phytinsäuregehalte im Kalibrationsprobensatz auf den RMSECV wurde die Leistungsfähigkeit der Kalibrationsmethode als adequat für das zugrundeliegende Probenkollektiv erkannt. Die erzielten Werte für die Leistungsparameter waren deutlich besser als die von in der Literatur

beschriebenen NIRS Methoden zur Phytinsäurebestimmung in mit Reis vergleichbaren Matrices (RMSECV: 0,28–0,35%; RMSEP: 0,32% [1–3]).

Die validierte NIRS Methode wurde zur vergleichenden Untersuchung von konventionellem und gentechnisch verändertem insektenresistentem Bt-Reis [4] eingesetzt. Dabei wurde kein Unterschied zwischen den Phytinsäuregehalten der Bt-Linien und der unter gleichen Bedingungen angebauten Elternlinien festgestellt. Die NIR-spektroskopisch ermittelten Werte lagen innerhalb der für konventionellen Reis beobachteten natürlichen Schwankungsbreite. Als wichtigstes Ergebnis stellte sich heraus, dass eine Beurteilung quantitativer NIRS Daten für die gentechnisch veränderten Linien nur unter Einbeziehung der Daten für die Elternlinien möglich ist [5].

Literatur:

1. Parrish FW, Madacsy JP, Phillippy BQ, Wilfred AG, Buco SM (1990) J Agric Food Chem 38: 407–409
2. De Boever JL, Eeckhout W, Boucque CV. (1994) Neth J Agric Sci 4: 357–369
3. Smith TN, Pesti GM, Bakalli RI, Kilburn J, Edwards HM (2001) Poultry Sci 80: 314–319
4. Shu Q, Ye G, Cui H, Cheng X, Xiang Y, Wu D, Gao M, Xia Y, Hu C, Sardana R, Altosaar I (2000) Mol Breed 6: 433–439
5. Frenzel T, Stoiber B, Engel K-H (2001) J Agric Food Chem, eingereicht

Regionalverband Nord – Tagung am 24./25.03.2003 in Hamburg

Direkte Bestimmung von Chloramphenicol in Honig und honighaltigen Produkten mittels online-SPE-LC-MS

D. Grotewahl¹, K.-P. Raezke¹, H. Meisel²

¹APPLICA GmbH, Bremen

²Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel

Chloramphenicol (CAP) ist ein Breitband-Antibiotikum und wirkt bakteriostatisch. Zwar besteht sowohl in der EU als auch in den USA, in Kanada und Thailand ein Anwendungsverbot für Lebensmittel liefernde Tiere, jedoch ist in China der Einsatz Chloramphenicol-haltiger Arzneimittel noch erlaubt. Wegen des breiten Wirkungsspektrums und der damit verbundenen Treffsicherheit bei Infektionen kann Chloramphenicol sowohl therapeutisch als auch prophylaktisch angewendet werden.

Bienen-Erkrankungen, gegen die Antibiotika eingesetzt werden, sind z.B. die europäische und die amerikanische Faulbrut. Die Behandlung der Bienen kann durch Fütterung mit antibiotikahaltigem Zuckerwasser oder durch die direkte Behandlung

der Waben, z.B. durch Besprühen, erfolgen. Die Möglichkeit einer Kontamination des Honigs mit Antibiotika ist dabei sehr hoch.

1994 wurde Chloramphenicol in der EU für die Anwendung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, durch die Aufnahme in den Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 verboten, daher darf es eigentlich nicht nachweisbar sein. Seit einiger Zeit gilt für CAP eine Mindestleistungsgrenze (MRPL) von 0,3 µg/kg. Diese Mindestleistungsgrenzen sind jedoch nicht wie Grenzwerte zu sehen, d.h. sie sind nicht gesetzlich verankert.

Die vorgestellte Methode beschreibt eine Möglichkeit der schnellen und einfachen CAP-Bestimmung durch Miniaturisierung in der Aufarbeitung und gleichzeitiger Automatisierung der Analyse von CAP in Honig, honighaltigen Säften, Honigwein und in frischem sowie lyophilisiertem Gelee Royal mit einer Nachweisgrenze von 0,1 µg/kg.

Probenvorbereitung

Die Aufarbeitung unterscheidet sich für die jeweiligen Produkte durch die Einwaage und die Extraktion.

Die Einwaage wirkt sich stark auf die Extraktion des Chloramphenicols aus, eine

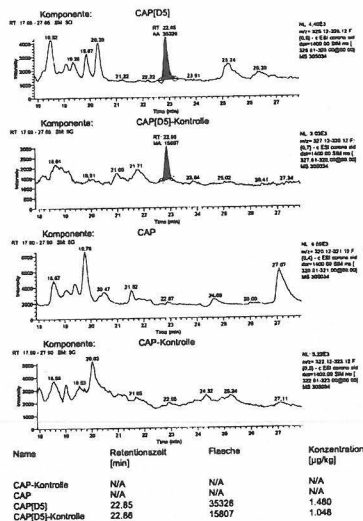
Reduzierung führt zu einer verbesserten Wiederfindung. Dieser Effekt ist bei lyophilisiertem Gelee Royal besonders ausgeprägt. Die direkt in Zentrifugenröhrchen eingewogene Probe wird mit internem Standard (5-fach deuteriertes Chloramphenicol) versetzt. Zur Extraktion des CAP aus Honig und honighaltigen Produkten wird Ethylacetat verwendet, Gelee Royal wird mit Chloroform extrahiert. Die Extraktion erfolgt mittels eines IKA-Vibrax, dies ermöglicht die gleichzeitige Extraktion von 36 Proben (Dauer ca. 30 min).

Nach dem Zentrifugieren wird ein Aliquot des Extraktes in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein wichtiger Schritt zur Miniaturisierung und Effektivitätssteigerung der Probenvorbereitung ist das Einengen bis zur Trockene bei 60°C im Concentrator (EPPENDORF 5301) (Dauer ca. 20 min). Dies ermöglicht die gleichzeitige Aufkonzentrierung von 48 Proben. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser aufgenommen.

online-SPE

Die Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP 2000 zur online-Festphasen-Extraktion wird in das bestehende LC-MS-System zwischen Autosampler und Trennsäule in-

A.



B.

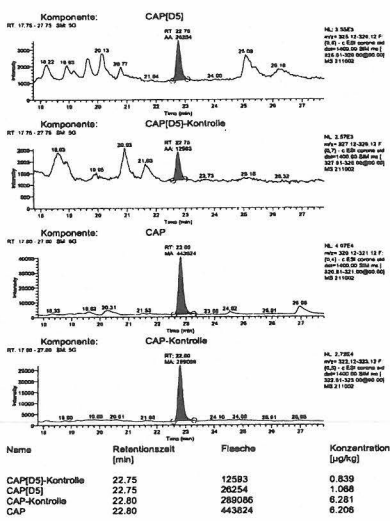


Abb. 1: A. unbelasteter Honig; B. mit 6,2 $\mu\text{g/kg}$ CAP belasteter Honig getriggert. Die einzelnen Schritte der Festphasenextraktion werden durch ein Programm, das mit der Injektion des Autosamplers gestartet wird, im Gerät abgespeichert.

Die zur SPE genutzte Kartusche (2 cm \times 3 mm ID) kann mit praktisch jedem handelsüblichen SPE-Material gefüllt werden, im Fall des CAP nutzt man RP 18-Material. Eine Füllung reicht für etwa 200 Analysen.

Bei der Probenaufgabe injiziert der Autosampler direkt auf die mit RP18-Material gefüllte SPE-Kartusche statt wie sonst üblich auf die HPLC-Säule.

Hierzu fördert die geräteeigene Pumpe die in der Probenschleife befindliche Probe über Kapillarverbindungen auf die SPE-Kartusche. Nicht absorbierte Matrixbestandteile werden in den Abfall gepumpt, der Analyt wird zurückgehalten und aufkonzentriert. Im folgenden Wachschrumpump das Modul Wasser über die Kartusche in den Abfall und sorgt so für eine weitere Reinigung. Danach erfolgt der Transfer des Analyten, indem nach Schaltung des Ventils der HPLC-Eluent, von der HPLC-Pumpe kommend, über die SPE-Kartusche fließt und auf diesem Weg den Analyten auf die Trennsäule transfert. Nach erneuter Schaltung in die Ausgangsposition wird die SPE-Kartusche mit Methanol gereinigt und mit Wasser rekonditioniert. Danach steht sie für eine weitere automatisierte Probenvorbereitung zur Verfügung. Währenddessen läuft die HPLC-Trennung an der C 18-Phase weiter.

Durch die SPE erreicht man eine Reduzierung oder Eliminierung von Interferenzen und Matrixeinflüssen; gleichzeitig wird der Analyt aufkonzentriert, was eine Steigerung der Empfindlichkeit zur Folge hat.

Bedeutende Vorteile der online-SPE mittels der Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP 2000 sind der geringe Zeit- und Personalaufwand, der geringe Lösungsmit-

telverbrauch, die Reduzierung von Probenverlusten und die hohe Reproduzierbarkeit.

Chromatographische Bedingungen

Injektionsvolumen: 400 μL ; Säule: Pronto-sil 120-5 C18 ace-EPS, 5 μm , 250 \times 3 mm; Eluenten: Wasser, Methanol; Gradient: in 30 min linear von 5% MeOH auf 90% MeOH; Fluß: 0,4 mL/min; Temperatur: 25 $^{\circ}\text{C}$

Detektion

Die Detektion des CAP erfolgt nach der Ionisierung durch Elektronenspray-Ionisation (ESI) im Negativen Ionen Modus mittels eines Single Quadropolmassenspektrometers (ThermoFinnigan Surveyor MSQ).

Auswertung

Zur Absicherung der Identität des Chloramphenicols wird zum einen die Retentionszeit des internen Standards (5-fach deuteriertes Chloramphenicol) genutzt, da es fast gleichzeitig (etwa 0,05 min früher) mit Chloramphenicol eluiert. Andererseits kann das Chlorisotopenverhältnis ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) genutzt werden.

Da Chloramphenicol zwei Chlormoleküle enthält, erhält man im Scan drei verschiedene Quasimolekülmassen. Da das Signal für m/z 325 ($\text{Cl } 37/37$, M-H)- zu gering ist, beschränkt sich die Analyse auf die Quasimolekülmassen 321 ($\text{Cl } 35/35$, M-H)- und 323 ($\text{Cl } 35/37$, M-H)-. Gemessen werden im Single Ion Modus vier Massenspuren: 321 und 323 für das zu analysierende Chloramphenicol und entsprechend 326 und 328 für das 5-fach deuterierte Chloramphenicol, den internen Standard (siehe Abb. 1). Das Verhältnis der korrespondierenden Quasimolekülonen (m/z 321 und 323 bzw. m/z 326 und 328) beträgt 0,6. Die Quantifizierung erfolgt über die Methode des externen Standards.

Zusammenfassung

Die direkte Bestimmung von Chloramphenicol in Honig und honighaltigen Produkten mittels online-SPE-LC-MS bietet folgende Vorteile:

Durch die Miniaturisierung der Aufarbeitung erreicht man einen geringen Lösungsmittelevbrauch und eine Aufarbeitung von vielen Proben gleichzeitig. Des weiteren muss nur wenig Probe eingesetzt werden.

Die Automatisierung der Analyse führt zu Zeitersparnis bei der Aufarbeitung und zu verringerten Probenverlusten. Durch die Reduzierung des Personalaufwands erhält man weniger zufällige Fehler und erreicht daher eine bessere Reproduzierbarkeit. Erwähnt sei auch die dadurch erzielte Kostenersparnis.

Aromatisierung aus lipidreichen Lebensmitteln mittels Dünnschicht-Hochvakuumdestillation – Evaluierung und Anwendung

U. Krings*, D. S. Banavara, R. G. Berger
 Institut für Lebensmittelchemie im Zentrum Angewandte Chemie der Universität Hannover

Eine quantitative Isolierung, insbesondere hydrophober Aromastoffe, aus lipidreichen Lebensmitteln kann immer noch nicht zufriedenstellend geleistet werden. Viele Variationen der simultanen Destillation-Extraktions-(SDE) Methode sind beschrieben worden [1]. Auch mit der kürzlich entwickelten Lösungsmittel unterstützten Vakuumdestillation (SAFE, solvent assisted flavor evaporation) wurden für eine Isolierung aus einer lipidhaltigen Matrix (50% Lipidanteil) Wiederfindungen < 40% für die Inhaltsstoffe einer Modellaromamischung erzielt [2]. Basierend auf diesen Arbeiten wurde die Hochvakuumdestillation modifiziert, dass für einige Aromastoffklassen eine nahezu vollständige Isolierung, auch aus reinen Lipidphasen, erhalten wurde. Die verbesserte Aromastoffisolierung basiert auf einem Versprühen der Lipidmatrix im Hochvakuum zu einem dünnen Film, der bei moderaten Temperaturen über 2 h dem Hochvakuum ausgesetzt bleibt. Die Destillation einer Aromamodellmischung aus Neutralfett (Miglyol 812) führte zu unterschiedlichen Wiederfindungen für die jeweiligen Substanzen. Es wurde eine umgekehrt proportionale Korrelation zwischen dem Produkt aus logP-Wert und Siedepunkt der Substanzen mit den entsprechenden Wiederfindung ermittelt [3]. Lediglich die untersuchten Lactone zeigten ein abweichendes Verhalten mit signifikant niedrigeren Ausbeuten. Für die Lactone wurde ebenfalls eine lineare Korrelation, jedoch mit einer deutlich steileren negativen Steigung gefunden.