

## VII. NEUE UNTERSUCHUNGSMETHODEN UND PROJEKTE

### 7.1 Bestimmung von Ethylcarbamat in Steinobstbränden mittels Gaschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie

Die herkömmliche Bestimmung von Ethylcarbamat erfolgt nach Flüssig-Flüssig-Extraktion über Extrelut-Säulen mittels Gaschromatographie und eindimensionaler Massenspektrometrie (GC/MS) mit deuteriertem Ethylcarbamat als internem Standard [1]. Dabei werden als Zielmassen die Massenfragmente  $m/z$  62 bzw.  $m/z$  64 und als Qualifiermassen die Massenfragmente  $m/z$  74,  $m/z$  76 und  $m/z$  44 eingesetzt.

Am CVUA Karlsruhe gesammelte Erfahrungen zeigten, dass die Zielmassen in der Regel ungestört sind. Bei den Qualifier-Massenfragmenten  $m/z$  74 und  $m/z$  76 traten jedoch in der Praxis häufig Störungen auf. Auch  $m/z$  44 ( $\text{CONH}_2$ ) ist als Qualifier-Massenfragment häufig nicht geeignet, da sowohl Ethylcarbamat selbst als auch der interne Standard dieses Massenfragment liefert sowie Analyt und interner Standard nur selten chromatographisch voneinander getrennt sind. Zudem kann es bei einer chromatographischen Überlagerung durch eventuelle  $\text{CO}_2$ -Abspaltung ebenfalls zu Störungen auf  $m/z$  44 kommen. Eine eindeutige Identifizierung von Ethylcarbamat über die Qualifier-Massenfragmente ist deshalb häufig nicht gegeben.

Häufig Probleme mit herkömmlicher Analytik

Aus diesem Grunde wurde das Verfahren auf Gaschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (GC/MS/MS) mit einem Triple-Quadrupol-Gerät (Bear Instruments, Kodiak 1200) umgestellt, das eine wesentlich verbesserte Selektivität und Sensitivität bietet. Hierbei werden die charakteristischen Zerfälle von  $m/z$  74 > 44 und  $m/z$  62 > 44 für Ethylcarbamat und  $m/z$  64 > 44 für den internen Standard gewählt. Als Kollisionsgas wird Argon und eine energetische Anregung von  $-20\text{ eV}$  angewandt.

Alternative: Tandem-Massenspektrometrie

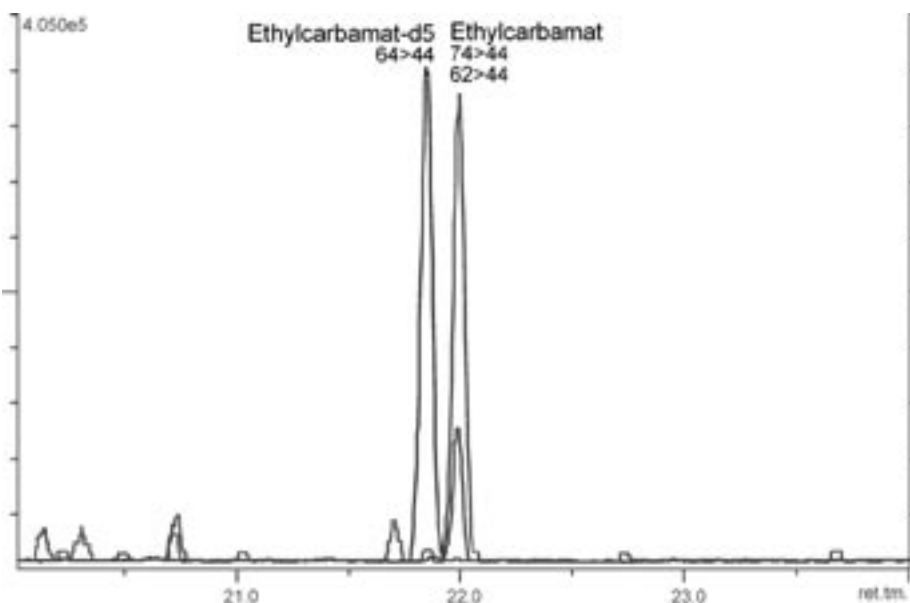


Abbildung: Kirschwasserprobe mit 0,63 mg/L Ethylcarbamatgehalt

---

Der damit erhaltene Variationskoeffizient reeller Probenmatrices unter Berücksichtigung zeitlich versetzter Aufarbeitungstage liegt zwischen 7,9 und 10,1% und die Nachweisgrenze bei 0,014 mg/L. Das Verfahren ist zwischen 0,25 mg/L und 5,0 mg/L linear. Gegenüber herkömmlicher Massenspektrometrie konnte die Empfindlichkeit um den Faktor 10 erhöht werden. Bei der Routineanalytik von Steinobstbränden wurden in allen Fällen störungsfreie Chromatogramme erhalten (s. Abbildung). Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, daß die GC/MS/MS-Technik eine empfindliche und robuste Alternative für die Analyse von Ethylcarbamat in Steinobstbränden darstellt. Genauere Informationen können der Zeitschrift „Rapid Communications in Mass Spectrometry“ entnommen werden [2] (Untersuchungsergebnisse siehe Abschnitt 2.3.11).

1. Mildau G, Preuß A, Frank W, Heering W (1987) Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 83: 69-74.
2. Lachenmeier DW, Frank W, Kuballa T (2005) Rapid Commun. Mass Spectrom. 19: 108-112.

## 7.2 Bestimmung von Anethol in Spirituosen mittels HS-SPME/GC/MS

**Für bestimmte Spirituosen mit Anis wie Pastis, Sambuca oder Mistrà sind in VO (EWG) 1576/89 und VO (EWG) 1014/90 Höchst- und Mindestgehalte für Anethol festgelegt. Bei anderen anishaltigen Spirituosen wie Ouzo oder Raki wird der Anetholgehalt zur Feststellung der Verkehrsüblichkeit herangezogen.**

Aufwändige Referenzanalytik

In der in VO (EG) 2091/2002 mitgeteilten offiziellen Referenzmethode zur Bestimmung von Anethol in Spirituosen durch Gaschromatographie (GC) wird für zuckerhaltige Spirituosen (z.B. Sambuca) ein arbeitsintensives und zeitaufwändiges Extraktionsverfahren vorgeschrieben (Dauer 2,5 Std.), da bei direkter Injektion der Proben eine Kontamination des GC Injektors erfolgen würde. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Extraktion von Anethol aus Spirituosenproben zu verbessern. Dazu wurde eine gegenüber der Referenzmethode wesentlich beschleunigte Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) entwickelt. 1 ml Probe wird nach Zugabe von 1-Undecanol als internem Standard jeweils dreimal mit n-Hexan extrahiert (Dauer ca. 20 min). Die vereinigten Extrakte werden mit n-Hexan auf 50 ml aufgefüllt und direkt mittels GC-FID bestimmt.

Moderne Alternative: HS-SPME

Daneben wurde als moderne Alternative die Headspace-Festphasenmikroextraktion (Solid-phase microextraction, SPME) evaluiert. Die Absorption erfolgt bei der SPME an einer von außen mit Polydimethylsiloxan beschichteten Faser, die zur Anreicherung der Analyten in den Headspace über der Probe gehalten wird. Alle Arbeitsschritte werden ohne manuelle Intervention auf einem Autosampler-Roboter ausgeführt. Probenvorbereitung (pH-Wert, Salzzusatz), Extraktions- und Desorptionsbedingungen (Temperatur, Zeit) der HS-SPME-Methode wurden optimiert. 1 ml pH7-Puffer, 10 µl Probe und Cyclodecanon als interner Standard werden im Autosampler 1 min bei 35 °C konditioniert, 6 min mit einer 100 µm PDMS-SPME Faser extrahiert und anschließend 2 min bei 250 °C im GC-Injektor desorbiert.

Die Anwendbarkeit beider Methoden wurde durch die Analyse von unterschiedlichen Spirituosen unter Beweis gestellt. Sowohl FFE als auch SPME zeigten sehr gute Linearitäten mit Korrelationskoeffizienten über 0,99 und sehr

---

gute Präzisionen zwischen 0,8 und 4,7%. Die Nachweisgrenzen lagen unter Berücksichtigung des mittels Eichkurvenverfahrens nach DIN 32645 evaluierten Bereiches und der jeweiligen Probenverdünnung bei 0,3 mg/L (SPME) bzw. 10 mg/L (FFE). Beim Vergleich beider Verfahren zeigte sich eine signifikante lineare Korrelation der Ergebnisse ( $R=0,90$ ,  $p=0,0003$ ). Erstmals konnte gezeigt werden, daß HS-SPME/GC/MS eine schnelle, empfindliche und robuste Alternative für die Analyse von Anethol in alkoholischen Getränken darstellt.

Die Methodvalidierung ergab, daß sowohl FFE als auch SPME geeignet sind, einen sicheren quantitativen Nachweis von Anethol in Spirituosen zu führen. Gegenüber der Referenzmethode wurde mit beiden Verfahren bei vergleichbarer Präzision eine wesentlich verkürzte und vereinfachte Probenvorbereitung erreicht, wobei HS-SPME durch die nur sechsminütige vollautomatische Extraktion die größten Vorzüge bietet.

### 7.3 Qualitätskontrolle von Bier mit NMR und multivariater Datenauswertung

**In Zusammenarbeit mit der Firma Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten) wurde die Kernresonanzspektroskopie (NMR) für die Qualitäts- und Authentizitätskontrolle von Bier in der amtlichen Lebensmittelanalytik eingeführt.**

Einführung von NMR in die Bieranalytik

Die Messungen wurden an einem 400-MHz-NMR-Spektrometer mit Flüssiginjektionstechnologie zum automatischen Probenwechsel durchgeführt. Zur Vorbereitung der Bierproben ist nur eine Entgasung und die Zugabe von Puffer erforderlich. Die Spektren wurden bei 303 K aufgenommen.

Die Unterschiede der Bierspektren von Proben verschiedener Sorten und Herkünfte wurde mittels multivariater Datenanalyse untersucht, wobei jedes Spektrum als charakteristischer Fingerabdruck betrachtet wird. Erstmals erlaubte der hohe Probendurchsatz des NMR-Systems die effiziente Erstellung einer umfangreichen Datenbank aus Bierspektren zur multivariaten Klassifizierung. Biere, die aus Gerstenmalz hergestellt wurden, konnten von Bieren aus Weizenmalz unterschieden werden. Daneben konnte anhand der NMR-Spektren die Herkunft der Biere aus bestimmten Brauereien zugeordnet werden. Minderwertige Biere mit geschmacklichen Abweichungen oder einer bakteriellen Kontamination konnten von handelsüblichen Produkten unterschieden werden. Mittels Partial Least Squares (PLS) Regression konnten die NMR-Spektren mit Ergebnissen der herkömmlichen Referenzanalytik korreliert werden, so dass Modelle zur Berechnung des Alkoholgehalts, der Stammwürze und des Milchsäuregehaltes erstellt wurden.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß NMR hervorragend für die Qualitätskontrolle von Bierproben geeignet ist, da eine quantitative Bestimmung von Bierinhaltsstoffen und eine chemometrische Klassifizierung in einem einzigen Experiment möglich ist. Verglichen mit herkömmlichen Methoden ist die NMR Spektroskopie schneller und erfordert nur eine einfache Probenvorbereitung.

Weitere Informationen: DW Lachenmeier, W Frank, E Humpfer, H Schäfer, S Keller, M Mörtter, M Spraul (2005) Eur. Food Res. Technol., 220:215–221

---

## 7.4 Analytik von Eierlikör: Bestimmung von Dichte, Alkohol und Extrakt mittels vollautomatischer Wasserdampfdestillation und Biegeschwinger mit Peristaltikpumpe

Herkömmliche Analytik nur manuell möglich

Herkömmliche Methoden zur Bestimmung des Alkoholgehaltes von Eierlikör beinhalten wegen mangelnder Pipettierfähigkeit des Produktes eine Wägung, so dass zur Berechnung des Alkoholgehaltes in Volumenprozent die Kenntnis der Dichte des Likörs erforderlich ist. Die Dichte von derartig hochviskosen Spirituosen läßt sich mit konventionellen Biegeschwingersystemen jedoch nicht automatisch und auch manuell mit Spritzeninjektion nur mit hohem Aufwand und mangelnder Präzision bestimmen, so dass zumeist auf eine pyknometrische Bestimmung zurückgegriffen wird. Die Genauigkeit der Bestimmung des Alkoholgehaltes von Eierlikör ist daher wesentlich geringer als die von anderen Spirituosen [1].

Im vergangenen Jahr wurde erstmals eine vollautomatische Bestimmung von Dichte, Alkohol und Extrakt in Eierlikör vorgestellt, die durch seit kurzem erhältliche, weiterentwickelte Biegeschwingersysteme möglich geworden ist (Mettler-Toledo DR45/SC1). Peristaltische Pumpen transportieren die dickflüssige Matrix blasenfrei in die Meßzelle. Nach jeder Messung wird die Zelle vollautomatisch mit Wasser und Aceton gespült und getrocknet [2]. Zur Bestimmung des Alkoholgehaltes wird die Dichte des Eierlikörs direkt und nach vollständig automatisierter Wasserdampfdestillation (C. Gerhardt Vapodest 30) gemessen. Zusätzlich kann der Extraktgehalt des Likörs indirekt aus der Dichte der Probe und des alkoholischen Destillats berechnet werden. Die Parameter für die automatische Wasserdampfdestillation wurden für die Analyse von Eierlikör optimiert (100% Dampfleistung, 25 g Einwaage, 130 s Destillationszeit, 50 ml Vorlagevolumen). Bei der Validierung hat sich die Methode als sehr robust und präzise erwiesen, die relative Standardabweichung liegt unter 0,56%. Bei der Analyse von Eierlikörproben unter Routinebedingungen wurde eine hervorragende Übereinstimmung ( $R = 0.999$ ) mit der Referenzanalytik erzielt.

Das Verfahren ist wesentlich schneller (ca. 8 min pro Probe) und einfacher zu handhaben als etablierte Referenzmethoden (Destillation, Pyknometrie). Eine leistungsfähige und ökonomische Bestimmung der Dichte und des Alkoholgehaltes sowohl in der amtlichen Lebensmittelüberwachung als auch in Herstellungsbetrieben wird dadurch ermöglicht.

### Literatur

1. Lachenmeier DW, Sviridov O, Frank W, Athanasakis C (2003) Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 99: 439-444
2. Lachenmeier DW, Burri PA, Fauser T, Frank W, Walch SG (2005) Anal. Chim. Acta, 537: 377-384

## 7.5 Nachweis von Gewebe des ZNS auf Rinderschlachttierkörpern

Vor dem Hintergrund der BSE-Krise wurden Gehirn und Rückenmark (zentrales Nervengewebe) von Rindern, als wichtigste Überträgersubstanzen des infektiösen Agens von BSE, zum sogenannten „Spezifizierten Risikomaterial“ deklariert. Seitdem muss es unschädlich beseitigt werden und darf nicht zum Verbraucher gelangen.

---

Dies erforderte einige Änderungen im Ablauf der Rinderschlachtung, bei der, verkürzt dargestellt, nach der Betäubung, Entblutung und Enthäutung zunächst das Absetzen des Kopfes und anschliessend eine Zerteilung des Schlachtkörpers stattfindet. Diese Änderungen beinhalten, dass eine Trennung von Gehirn und Rückenmark von den verwertbaren Anteilen stattfinden muß. Der Schädel wird entsorgt und das Rückenmark mechanisch aus dem bei der Häufelung grossflächig eröffneten Wirbelkanal entfernt.

Jedoch befindet sich am Kopf eine Restmenge an Fleisch, die in Betrieben mit entsprechender Genehmigung gewonnen werden darf. Da bei diesem Kopffleisch ein erhöhtes Risiko einer Kontamination mit ZNS-Material vorliegt, wird von der EU in der Verordnung (EU) Nr. 1139/2003 ein Stichprobenkontrollplan gefordert, der sicherstellt, dass kein kontaminiertes Fleisch weiterverarbeitet wird.

Aus diesem Grund wird zur Zeit am CVUA Karlsruhe ein Untersuchungsverfahren etabliert, mit dem eine mögliche Kontamination von Kopffleisch erfasst wird. Somit wird gewährleistet, dass belastetes Fleisch nicht in die Lebensmittelkette gelangt.

Die Durchführung erfolgt anhand von Tupferproben, mit denen die Beprobungsstellen abgestrichen werden. Im Labor werden die Proben mit einem Enzymimmunoassay, der auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, auf das Vorhandensein von saurem Gliafaserprotein untersucht. Dieses Protein ist nur im Nervengewebe vorhanden. Mit Hilfe dieses Tests werden Kontaminationen mit Nervengewebe bei der Kopffleischgewinnung erfasst, so dass eventuell belastetes Fleisch zum Schutz der Verbraucher entsorgt werden kann.

## **7.6 Nachweis von Bierverderbern mit einem DNA-Hybridisierungsverfahren**

### **Gensondentechnologie zum schnellen Nachweis von Bierverderbern**

Insbesondere *Lactobacillus brevis*, *Megasphaera cerevisiae* und *Pectinatus frisingensis* konnten erfolgreich mit der VIT-Gensondentechnologie in Bierproben nachgewiesen werden (s. Abbildungen), die bereits sensorisch oder mikrobiologisch auffällig gewesen waren.

Bierverderbniskeime können in verschiedenen Stadien der Bierherstellung und -abfüllung das Bier verunreinigen und zu erheblichen geruchlichen und geschmacklichen Abweichungen führen. Dies geht von sauren bis fäkalen Geruchsnoten, sogar ein Geruch nach faulen Eiern tritt manchmal auf. Auch die Konsistenz des Bieres leidet – vom Geschmack ganz zu schweigen!

Zur Untersuchung von Bier sind daher schnelle und sichere Untersuchungsmethoden notwendig. Diese stehen inzwischen mit dem VIT-System (= vermicon identification technology) zur Verfügung. Das Prinzip basiert auf spezifisch programmierten Gensonden, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Die Sonden binden an Zielbakterien (grampositive und gramnegative Bakterienzellen der sogenannten „Bierverderbniskeime“); die spezifisch markierten Bakterienzellen zeigen nun unter dem Fluoreszenzmikroskop grünes oder rotes Leuchten.

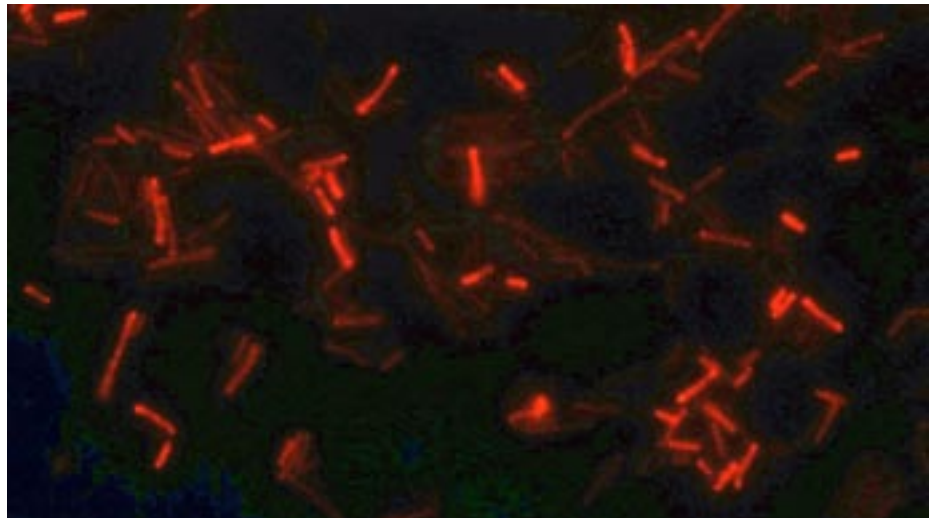


Abbildung: *Lactobacillus brevis* mit der VIT-Gensondentechnologie

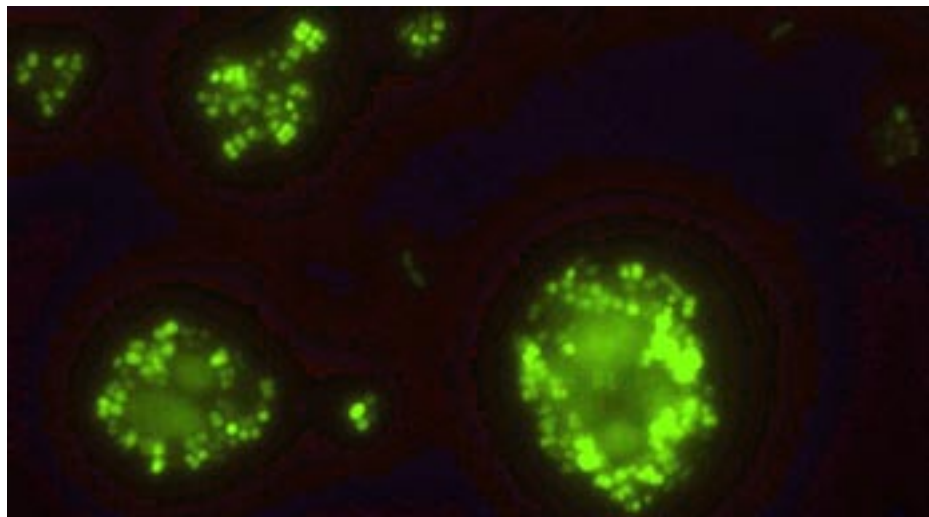


Abbildung: *Megasphaera cerevisiae* mit der VIT-Gensondentechnologie

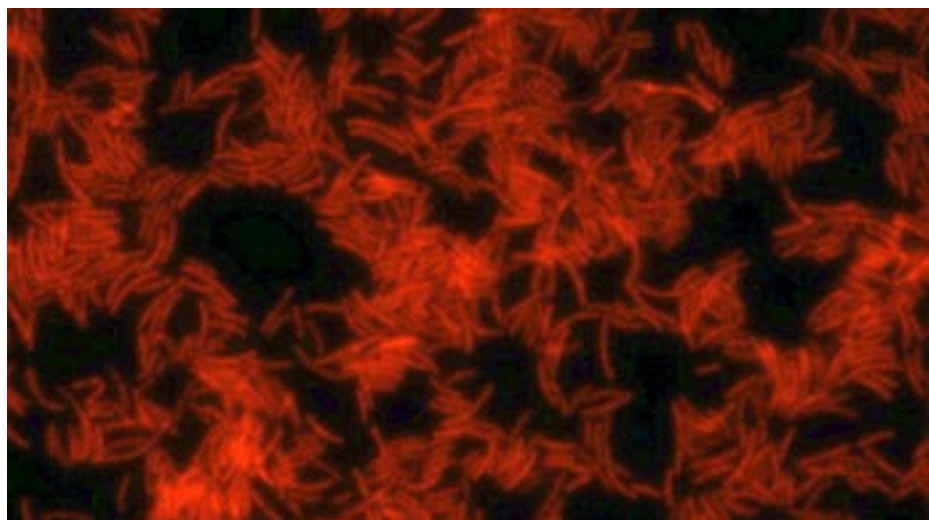


Abbildung: *Pectinatus frisingensis* mit der VIT-Gensondentechnologie

---

Die Bearbeitungszeit mit dem VIT-System beträgt nur wenige Stunden. Ein Vorteil ist, dass Bier ohne vorherigen Anreicherungsschritt eingesetzt werden kann.

Im Laufe des Jahres 2004 wurden 24 Bierproben mit dem VIT-System untersucht, die bereits mit klassischen kulturellen Methoden als kontaminiert aufgefallen oder sensorisch verändert waren. Dabei konnte in jedem Fall die Ursache des Bierverderbs ermittelt werden. Meist konnten Milchsäurebildner nachgewiesen werden, aber auch Pediokokken oder der gefürchtete *Lactobacillus brevis* wurden gefunden. Häufig lag ein ganzer „Cocktail“ von Bierverderbniskeimen in den veränderten Bieren vor.

## **7.7 Analytik von Permanent- und Tönungs-Haarfarben mittels HPLC-DAD**

**Permanente Haarfärbemittel enthalten Entwickler und Kuppler, von denen die wichtigsten aromatische Diamine, Aminophenole und mehrwertige Phenole sind. Sie kommen überwiegend in Haarfarbe-Cremes, selten auch in flüssigen Produkten vor.**

Daneben gibt es direktziehende Tönungsfarben, die häufig in Mischung mit Oxidationshaarfarben angeboten werden. Die Analytik beruht auf der zügigen Isolierung der Farbstoff-Vorstufen und Farbstoffe mittels Ultraschallhomogenisator unter Oxidationsschutzbedingungen und anschließender Chromatographie mittels HPLC-DAD. Mit dieser Methode können 33 Haarfarben bestimmt werden.

Oxidationsbasen und Kuppler sind Verbindungen, die im Laufe der Probenaufarbeitung leicht abbauen können. Daher ist ein zügiger und unter Oxidationsschutz stattfindender Clean-up entscheidend für eine reproduzierbare Bestimmung mit guten Wiederfindungen. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass sowohl bei der bisher üblicherweise verwendeten HPLC-Methode nach Weyland (1) als auch bei einer DC-Bestimmungsmethode (2) zum Oxidationsschutz der Substanzen Ascorbinsäure eingesetzt wurde. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Stabilität der Haarfarben bei Einsatz von Natriumsulfit höher ist. Bei Creme-Haarfarben führt der Einsatz eines Ultraschallhomogenisators dazu, in kurzer Zeit homogene, leicht membranfiltrierbare Extrakte für die unmittelbar anschließende HPLC zu erzielen. Mit dem Prüfverfahren können momentan 33 Haarfarben über Retentionszeit und UV-Spektrum identifiziert und bestimmt werden. Weitere Referenzsubstanzen werden analysiert; angesichts der über 100 Haarfarben, die künftig zugelassen werden, und der Fülle an verbotenen Stoffen wird eine parallele Bestimmung aller Substanzen in einem Lauf sicher nicht gelingen. Nähere Informationen über Haarfarben finden Sie im Kapitel 3.

### **PROBENAUFARBEITUNG UND KALIBRIERLÖSUNGEN**

- Ca. 0,5g Probe werden auf 0,1mg genau in ein Becherglas (i.d.R. 50ml) eingewogen.
- Nach Zugabe von höchstens 20ml Reduktionspuffer (s.u.) wird ca 1 min ultraschallhomogenisiert.
- Überführung in einen 50ml Messkolben (braun).
- Nachspülen und Auffüllen mit Acetonitril. Stickstoffbegasung.

- Filtrieren über Faltenfilter und Membranfilter (0,2µm Porengröße) in Vial (braun) zur HPLC-Messung.
- zusätzlich Verdünnung 1:10: 1ml Probenlösung/10ml Verdünnungspuffer, Stickstoffbegasung, membranfiltrieren, abfüllen zur HPLC-Messung.
- Referenz-Stammlösung: 25mg (auf 0,1mg genau) in 25ml Messkolben (braun) einwiegen. Lösen mit ca 15ml Reduktionspuffer (s.u.), ggf. mit Hilfe Ultraschallbad. Aufgefüllt wird mit Acetonitril. Konzentration: 1mg/ml
- Diese Lösung nach Stickstoffbegasung lichtgeschützt und gekühlt aufbewahren oder für HPLC verwenden.
- Einpunktkalibrierung: 100µg/ml, Verdünnung der Stammlösung 1:10 mit Verdünnungspuffer
- Nach Stickstoffbegasung lichtgeschützt aufbewahren oder direkt zur HPLC-Messung, immer Doppelabfüllungen für Anfang und Ende der Sequenz.
- Zusätzliche Kalibrierlösungen (bei auffälligen Befunden)
- 10µg/ml : Stammlösung 1:100 verdünnt mit Verdünnungspuffer
- 25µg/ml: Stammlösung 1:40 verdünnt
- 50µg/ml: Stammlösung 1:20 verdünnt

## CHEMIKALIEN UND REAGENTIEN

- Stickstoff zur Begasung
- Salzsäure (HCl) konz, 37%, HPLC-geeignet
- Borax, Dinatriumtetraborat-Decahydrat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ),  $M = 381,37\text{g/mol}$
- 0,1M HCl (3,66ml HCl conc in 440ml  $\text{H}_2\text{O}$ )
- 0,05M Borax-Lösung (10,68g Borax in 560ml  $\text{H}_2\text{O}$ )
- Sörensen-Puffer pH = 8,0
- 440ml 0,1M HCl und 560ml 0,05M Borax-Lösung auf pH = 8,0 (überprüfen bzw. tropfenweise einstellen mit HCl conc)
- Natriumsulfit
- Reduktionspuffer : 500mg Natriumsulfit in 100ml Sörensen-Puffer
- Acetonitril, HPLC-geeignet
- Verdünnungspuffer: 50ml Reduktionspuffer und 50ml Acetonitril für die HPLC:
- Reinstwasser, HPLC-taugliche Reinheit, z.B. SeralPur
- Essigsäure konz, (HAc) (Eisessig) 100%, HPLC-geeignet
- Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ), konz
- 10%  $\text{NH}_3$ -Lösung
- 0,02M HAc (1,14g HAc konz auf 1000ml  $\text{H}_2\text{O}$ )
- HPLC-Eluent A: 0,02M HAc mit 10%  $\text{NH}_3$ -Lösung auf pH = 5,9
- HPLC-Eluent B: Acetonitril, HPLC-geeignet + 0,5% Reinstwasser

## GERÄTE/HILFSMITTEL

- Ultraschallhomogenisator, z.B. von Vibracell
- Membranfilter mit 0,2µm Porengröße
- Vakuumfiltrationsgerät
- Rollrandgläser (=Vial) (Braunglas) mit passenden Bördelkappen, geeignet für automatischen HPLC-Probengeber



---

## HPLC-BEDINGUNGEN

- Hochleistungsflüssigkeitschromatograph, bestehend aus einem binären Pumpensystem, automatischem Probengeber, heizbarem Säulenraum, Dioden-Array-Detektor (DAD), Auswertesystem
- Vorsäule 20 mm × 2,1 mm Hypersil ODS 5 µm (Agilent)
- Hauptsäule Purospher Star RP-18, 5 µm, 250 mm × 2 mm (Merck)
- Injektionsmenge: 2 ml
- Flow: 0,2 ml/min

## AUSWERTUNG

- Die Identifizierung der Einzelstoffe erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten der zu analysierenden Substanzen in der Probe mit denjenigen der Referenzsubstanzen.
- Ist ein ausreichendes Signal vorhanden, müssen die UV/VIS-Spektren des Peaks mit dem Bibliotheksspektrum übereinstimmen.
- Die quantitative Bestimmung erfolgt nach der Methode des externen Standards durch Integration der Peakflächen oder durch Ermittlung der Peakhöhen.
- I.d.R. wird lediglich eine Einpunktkalibrierung mit dem Standard 100 µg/ml durchgeführt.
- Bei Gehalten im Bereich des Grenzwertes werden Mehrpunktkalibrierungen nachgezogen.
- Die Grenzwerte in der Kosmetikverordnung beziehen sich i.d.R auf die 1 + 1-Mischung Farbstoffkomponente mit Entwickleremulsion (Wasserstoffperoxid-Komponente).
- Daher ist es wichtig, die Herstellerangabe (i.d.R. Informationsblatt) zur Mischung des für die Haarfärbung bestimmten Endproduktes zu berücksichtigen.

## ERGEBNISSE DER STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN

- Die Entwickler und Kuppler sind lichtempfindlich. Daher immer ohne Deckenbeleuchtung arbeiten, intensive Sonneneinstrahlung unbedingt vermeiden.
- Die Entwickler und Kuppler sind sehr sauerstoffempfindlich. Zügig arbeiten und nach Beschreibung mit Stickstoff begasen.
- Zur HPLC immer nur in Glasvials abfüllen. Keine Kunststoff-Vials verwenden, da z.T. erheblicher Substanzverlust bei Verwendung konischer Kunststoffvials festgestellt wurde.
- Bisherige Erfahrungswerte haben gezeigt, dass die Stammlösungen mindestens zehn Tage stabil bleiben, eingefroren in Braunglasvials oder in Braunschraubglasgefäßen. Die Kalibrierlösungen sollten meßtätlich hergestellt werden.
- Referenz-Mixe sollten möglichst nur Entwicklersubstanzen bzw. Kuppler enthalten; Kombinationen aus Kupplern und Entwicklern können schneller miteinander reagieren als nur Entwickler bzw. Kuppler in den Mix-Lösungen.

---

## RETENTIONSZEITEN DER 33 HAARFARBEN

INCI-Namen	Retentionszeit in min	Mix
p-PHENYLENEDIAMINE	3,36	C
2-AMINOMETHYL-p-AMINOPHENOL HCl	3,448	D
p-AMINOPHENOL	4,00	A
DIAMINOPHENOXYETHANOL HCl	4,898	B
m-PHENYLENEDIAMINE	4,95	Einzel
TOLUENE-2,5-DIAMINE (m)	5,03	C
m-AMINOPHENOL	5,638	A
4-AMINO-m-CRESOL	5,80	B
N,N-Dimethyl-2,6-pyridinediamin nicht sicher	6,04	E
RESORCINOL	6,48	A
2-AMINO-3-HYDROXYPYRIDINE	6,50	C
p-METHYLAMINOPHENOL	6,86	B
o-AMINOPHENOL	7,11	C
2-METHYLRESORCINOL	7,26	A
2-AMINO-4-HYDROXYETHYLAMINOANISOLE	7,47	B
2-NITRO-p-PHENYLENEDIAMINE	7,50	Einzel
HYDROXYBENZOMORPHOLINE	7,73	Einzel
4-AMINO-2-HYDROXYTOLUENE	8,60	A
2-HYDROXYETHYL PICRAMIC ACID	8,639	D
4-AMINO-3-NITROPHENOL	8,69	F
HC BLUE NO. 2	8,74	G
2-AMINO-6-CHLORO-4-NITROPHENOL	8,86	E
1,3-BIS-(2,4-DIAMINOPHENOXY)PROPANE	9,49	D
HC YELLOW NO. 5	9,75	F
4-HYDROXYPROPYLAMINO-3-NITROPHENOL	9,95	G
4-CHLORORESORCINOL	10,41	D
1,5-NAPHTHALENEDIOL	11,11	F
2,7-NAPHTHALENEDIOL	11,28	G
PHENYL METHYL PYRAZOLONE	11,33	B
HYDROXYETHYL-2-NITRO-p-TOLUIDINE	14,55	D
DISPERSE VIOLET 1	15,26	E
HC YELLOW NO. 12	15,33	F
1-NAPHTHOL	16,08	A

## LITERATUR

- 1) J.W.Weyland, Rooselaar, HPLC of oxidative hair dye analysis, Separation and stability testing, J.Liq.Chrom.Rel. Technol. 21, 883-901 (1988).
- 2) H.Gottschalk, R.Machens, Identifizierung und quantitative Bestimmung von Oxidations-farbstoffen in Haarfärbemitteln, J.Soc. Cosm. 33, 97-114 (1982).
- 3) E. Vogt, G. Mildau, M. Metzler, Lebensmittelchemie 57, 156-157 (2003)

## 7.8 Bestimmung von Kohlenmonoxid mittels Headspace-GC

### Ist der Fisch wirklich frisch?

Thunfisch in Top Qualität ist eines der teuersten Lebensmittel auf dem Weltmarkt. Auch in Europa erfreut sich roher Thunfisch in Form von Sushi, Filets und Steaks zunehmender Beliebtheit. Rohes Fischfleisch zählt jedoch zu

---

den empfindlichen, leichtverderblichen Lebensmitteln. Rotes Fischfleisch, wie Thunfisch, wird bei Luftkontakt zunehmend bräunlich. Eine Behandlung mit Kohlenmonoxid oder sogenanntem gereinigtem Rauch stabilisiert dagegen die rote Fischfleischfarbe. Nach längerer Kühlung oder nach dem Auftauen wirken die Stücke immer noch wie frisch.

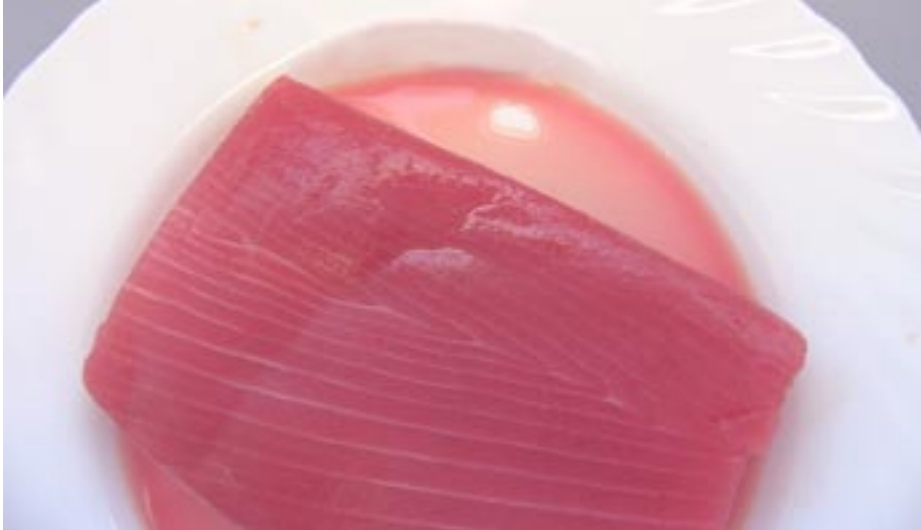


Abbildung: Mit Kohlenmonoxid behandeltes Thunfischfleisch

Auch wenn für den Verbraucher nach bisherigem Kenntnisstand durch das Kohlenmonoxid alleine keine Gesundheitsgefahr besteht, wird er über die tatsächliche Qualität des Produktes getäuscht. Alter und beginnender Verderb des Produktes lassen sich nicht mehr eindeutig an Farbveränderungen erkennen.

### **RECHTLICHE SITUATION**

Kohlenmonoxid, das zur Farberhaltung eingesetzt wird, ist als Lebensmittelzusatzstoff einzustufen. Eine derartige Verwendung ist aber EU-weit nicht zugelassen. Eine Behandlung mit Kohlenmonoxid kann jedoch auch durch speziell aufbereiteten Räucherrauch erfolgen: Hierbei handelt es sich um sogenannten „gereinigten Rauch“ oder „clear smoke“, bei dem die übrigen Rauchbestandteile soweit herausgefiltert werden, dass Kohlenmonoxid als Hauptbestandteil übrigbleibt. Durch Verwendung von „gereinigtem Rauch“ entsteht kein Raucharoma. In der EU wird auch diese Behandlung als nicht zulässig angesehen.

In Japan ist eine Behandlung ebenfalls unzulässig, in anderen Drittländern, unter anderem den USA und in einigen Ländern Asiens wie z.B. Taiwan und Indonesien ist die Behandlung jedoch erlaubt. Bei aus diesen Ländern importierten rotfleischigen Fischarten, wie Thunfisch, Schwertfisch, Haifisch, Tilapia, Red Snapper und Marlin kann daher eine Behandlung stattgefunden haben.

### **BISHERIGE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE**

Ein Wert von 200 µg Kohlenmonoxid pro kg Fischmuskelfleisch gilt derzeit europaweit als sicherer Unterscheidungswert für Kohlenmonoxid-behandelten und unbehandelten Thunfisch. Kohlenmonoxid-Gehalte über 200 µg pro kg Fischmuskelfleisch können bei Thunfisch nicht natürlich bedingt sein.

---

Untersucht wurden am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe sowohl Thunfisch (Steaks, Filets), Schwertfisch, Red Snapper und Marlin unterschiedlicher Herkunft. In 14 der 36 untersuchten Fischproben wurden Gehalte über 200 µg Kohlenmonoxid pro kg Fischfleisch nachgewiesen, davon dreizehn Proben Thunfischfleisch und eine Probe Schwertfisch-Steak. Sieben dieser Thunfisch-Proben, alle mit auffallend rotem Farbton, wiesen Kohlenmonoxid-Gehalte von 1100 µg pro kg bis 1840 µg pro kg auf. In dem auffallend hellroten Schwertfisch-Steak konnte ein Gehalt von 1320 µg Kohlenmonoxid pro kg Fischmuskelfleisch festgestellt werden.

### **ANALYTIK**

Im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe wird der empfindliche Nachweis von Kohlenmonoxid in Lebensmitteln mit einem Gaschromatographen mit Nickelkatalysator durchgeführt.

Das aus der Probe mit Schwefelsäure freigesetzte Kohlenmonoxid wird nach der Reduktion zu Methan mittels FID (Flammenionisationsdetektor) detektiert.

## **7.9 Zellzählung in Mastitis-Milch mittels Zellzahlmessgerät**

### **DeLaval DCC**

**Die Zählung somatischer Zellen in der Milch hat sich zu einer weit verbreiteten Methode entwickelt, mit der sich der Gesundheitszustand des Euters überprüfen lässt. Gleichzeitig ermöglicht dieses Vorgehen eine Aussage über den hygienischen Standard der Sammelmilch. Am CVUA Karlsruhe wurde eine optische Methode zur Zellzahlbestimmung in der Milch erkrankter Kühe etabliert.**

Bei der Beurteilung der Milchproben wurde früher eine Schätzung (Kieler Zellschätzmethode) der Entzündungszellen vorgenommen. Dafür wurde das Sediment der Milch auf ein Objektträger verbracht und mit Methylenblau angefärbt. Jede Probe musste in zeitaufwändiger Feinarbeit im Mikroskop durchgemustert und die Zahl somatischer Zellen angegeben werden.

Mit Hilfe des Zellzahlmessgerätes ist die Bestimmung der Zellen genauer, und bei weitem nicht so zeitintensiv wie mit der „Methylenblaumethode“. Die Ergebnisse ließen sich, wie Ringversuche zeigten, mit den mittels Fossomat bestimmten Zahlen vergleichen. Es gab nur geringe Abweichungen bei den Messungen (siehe Tabelle).

Das DCC- Messgerät ist ein tragbares, batteriebetriebenes optisches Zellzahlmessgerät. In einer Kassette wird vor Beginn der Zellzählung Milch gesammelt. Darüber hinaus befinden sich in der Kassette kleine Mengen an Reagenzien, die bei Vermischen mit der Milch mit den Zellkernen der somatischen Zellen reagieren. Die Milchprobe im DCC wird durchleuchtet, wodurch Fluoreszenzsignale ausgelöst werden. Anhand dieses Bildes wird die Anzahl somatischer Zellen in der Milch ermittelt. Nach dem Aufziehen der Milch in die Kassette und einführen dieser in das Gerät ist nach ca. 1 Minute die Anzahl der Zellen auf dem Display sichtbar. Der abgelesene Wert wird mit 1000 multipliziert und ergibt die Zellzahl pro ml Milch.



Abbildung: Zellzahlgerät



Abbildung: Einmalkassette

Tabelle: Vergleich Ringversuch Fossomat und DeLaval- Messgerät

Probe	Foss 1	Foss 2	Foss 3	DeLaval
1	1258	2329	2060	1318
2	526	989	947	554
3	663	999	767	650
4	689	616	758	616
5	344	485	488	368
6	116	141	124	123
7	564	570	675	439
8	989	856	1307	788
9	921	834	836	918
10	142	161	152	125
11	1062	979	896	905
12	753	977	575	683

---

## 7.10 Quantitative Analyse von Sudanfarbstoffen mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS in unterschiedlichen Lebensmittelmatrices

**Nach ersten Warnmeldungen im Jahr 2003 aus Frankreich betreffend des Nachweises des nicht für Lebensmittel zugelassenen künstlichen Farbstoffes Sudan 1 in Chiligewürz folgten bald weitere Meldungen über den Nachweis von Sudan 2 bis 4. Am CVUA Karlsruhe wurde eine robuste Messmethode zur Quantifizierung verschiedener Sudanfarbstoffe etabliert.**

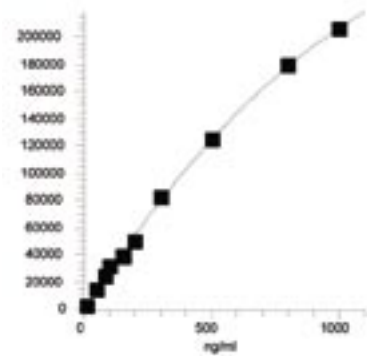
Als Folge des offensichtlich recht hohen Marktanteils von Gewürzen, die zur Farbverbesserung mit künstlichen Farbstoffen versetzt waren (s. Jahresbericht 2003, Abschnitt 2.26), wurden die genannten Farbstoffe bald nicht nur in Gewürzen, sondern auch weiterverarbeiteten Produkten, wie Gewürz-Soßen und Palmöl nachgewiesen. Teig- und Wurstwaren, mit Gewürzen versetzte Öle und Palmöl wurden daraufhin ebenfalls einer verstärkten Überwachung unterzogen.

Dies machte die Entwicklung einer robusten Universalmethode zur Bestimmung von fettlöslichen Farbstoffen in sehr unterschiedlichen Lebensmittel-Matrices erforderlich. Der gleichzeitig mit der ersten Warnmeldung übermittelte Methodenvorschlag für die Probenaufarbeitung und Messung mittels HPLC-DAD und HPLC-MS zeigte bereits bei der Analyse von Sudan 1 Schwachstellen und erwies sich für die Messung weiterer Sudanfarbstoffe wie Sudan 4 als stark optimierungsbedürftig. Anfänglich vorgeschlagene Proben-Extraktionsmittel wie Acetonitril (Frankreich) bzw. Methanol (Großbritannien) erwiesen sich schnell als ungeeignet zur quantitativen Extraktion der unpolareren fettlöslichen Farbstoffe wie Sudan 4. Nachdem sich bereits die etwas polarere Substanz Sudan 1 in Acetonitril nur leidlich, in Methanol nur mäßig gut löst, wurde die Extraktion mit einer Extraktionsmischung aus Acetonitril/Aceton (9:1) durchgeführt. Dadurch konnte auf das ebenfalls vorgeschlagene, toxikologisch ungünstigere Chloroform verzichtet werden.

Die Etablierung einer HPLC-Methode mit DAD-Detektion erwies sich als relativ unproblematisch. Unbefriedigend war, dass Matrixstörungen durch Probenbegleitstoffe häufig die eindeutige Identifizierung und Zuordnung unsicher machten und auch bei Proben mit kleinen Gehalten mittels DAD-Detektion keine ausreichend eindeutigen Spektren erhalten werden konnten. Wegen der großen wirtschaftlichen Tragweite positiver Befunde für Herstellerbetriebe war eine Absicherung über HPLC-MS/MS deshalb unumgänglich. Die Etablierung der HPLC-MS/MS-Methode erwies sich als nicht unproblematisch. Bei Verwendung von Acetonitril/Wasser als Elutionsmittel waren schlecht reproduzierbare, nicht lineare Kalibriergeraden (siehe Abb. 1) die Folge, was nur einen sehr engen Messbereich zuließ und die Quantifizierung erschwerte. Daher erfolgte anfänglich lediglich die Absicherung der Anwesenheit des betreffenden Farbstoffs über die Masse und das Fragmentierungsmuster.

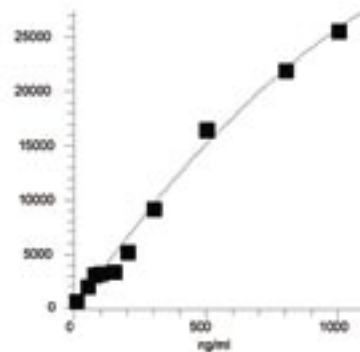
Bereits die Umstellung auf Methanol/Wasser als Eluent ergab eine erhebliche Verbesserung der Kalibrierkurven (siehe Abb. 2). Eine möglicher Erklärung hierfür ist, dass die schlechte Löslichkeit der Sudan-Farbstoffe in Methanol bei der Tröpfchenbildung bei der Vernebelung des Eluenten im Verlauf der Elektrospray-Ionisierung (ESI) zu einer Anreicherung des Analyten an der Tröpfchenoberfläche und damit zu einer effektiveren Ionisierung führt.

Sudan 1 + c ESI SRM ms2 249.10@25.00 [ 92.10-94.10]



Equation:  $Y = 657091 + 289254 * X - 0.0004703 * X^2$   $R^2 = 0.9986$

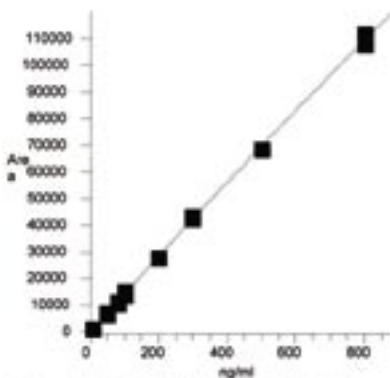
Sudan 4 + c ESI SRM ms2 381.00@25.00 [ 275.00-277.00]



Equation:  $Y = -195.58 + 35.0316 * X - 0.0000111 * X^2$   $R^2 = 0.9910$

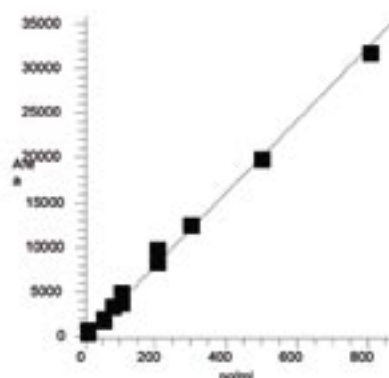
Abbildung 1: Kalibrierkurven der LC-MS/MS (ESI+) Messung bei Verwendung von Acetonitril im Elutionsmittel

Sudan 1 + c ESI SRM ms2 249.10@25.00 [ 92.10-94.10]



Equation:  $Y = 144.543 * X - 0.00090857 * X^2$   $R^2 = 0.9993$

Sudan 4. + c ESI SRM ms2 381.00@25.00 [ 275.00-277.00]



Equation:  $Y = 40.461 * X$   $R^2 = 0.9947$

Abbildung 2: Kalibrierkurven der LC-MS/MS-(ESI+)-Messung bei Verwendung von Methanol im Elutionsmittel

Weitere Probleme ergaben sich für die Quantifizierung von Sudanfarbstoffen in Palmöl. Die parallele Messung von Proben mittels HPLC-DAD und HPLC/MS/MS ergab für Palmöle bei etwa 50% der Proben falsch positive Befunde von bis zum vierfachen des tatsächlichen Gehaltes. Die Vergleichsmessungen bei Gewürzproben, Gewürzmischungen und Gewürzsoßen stimmten dagegen unter Berücksichtigung der anfänglichen Schwierigkeiten bei der HPLC/MS/MS-Messung gut mit den mittels HPLC-DAD ermittelten Gehalten überein (siehe Tabelle 1 Spalte 1 und 2).

Die Signalsuppression durch Anwesenheit von Matrixbestandteilen wie z.B. Salzen oder Tensiden sind ein bekanntes Problem bei der LC-MS-Messung, weniger gut bekannt sind Effekte die zu einer Signalverstärkung durch Matrixbestandteile führen. Im vorliegenden Fall wirkten in der Messlösung vorhandene Fette, die chromatographisch nicht abgetrennt wurden als Modifier, die als „Schlepper-Moleküle“ eine Anreicherung des Analyten an der Töpfchenoberfläche und damit eine Verbesserung der Ionisierung bewirkten. Da keine deuterierten Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, eine Matrix-

kalibrierung oder die Messung mittels Standardadditionsverfahren zu einem höheren Analysenaufwand geführt hätte, wurde die Ionisierungstechnik von ESI auf APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) umgestellt. Beide Ionisierungstechniken unterscheiden sich grundlegend in der Art der Ionenbildung. Bei der ESI wird durch das Versprühen des von der HPLC-Anlage gelieferten Eluentenstroms in einem Hochspannungsfeld ein feiner Nebel geladener Tröpfchen erzeugt. Unterstützt wird die Ionenbildung durch Zusatz geringer Konzentrationen schwacher Säuren wie Ameisensäure oder Essigsäure zum Eluenten. Aus den geladenen Tröpfchen werden durch Trocknung und nachfolgenden Coulomb-Explosionen Ionen unter Atmosphären-Druck erzeugt, die im weiteren, auch nach Fragmentierung, massenspektroskopisch untersucht werden können (MS/MS). Bei der APCI hingegen wird der Eluentenstrom zunächst bei hoher Temperatur verdampft, nach Passieren einer Korona-Entladungzone an der APCI-Nadel wirken ionisierte Lösungsmittelmoleküle als Reaktandgas, die den Analyten ionisieren.

Durch die Wahl von APCI als Ionisierungstechnik konnte der oben beschriebene Effekt der Signalverstärkung durch mitelueierende Probenbegleitstoffe verhindert werden. Die so erhaltenen Messwerte zeigten bei Palmölen sehr gute Übereinstimmung mit den Messergebnissen für die HPLC-DAD-Messung (siehe Tabelle 1 Spalte 2 und 3).

Tabelle 1: Sudan 4 in Palmöl, Gehalte in mg/100g Probe

	ESI	DAD	APCI
Palmöl 1	4,3	0,9	0,9
Palmöl 2	3,0	1,3	1,3
Palmöl 3	2,2	0,7	0,7
Palmöl 4	4,0	3,4	3,6
Palmöl 5	4,0	3,4	3,6
Palmöl 6	2,3	2,5	2,5
Palmöl 7	2,6	2,9	3,0
Palmöl 8	2,5	2,2	2,3
Palmöl 9	2,1	2,1	2,1
Hackfleisch-Gewürz 1	1,9	1,8	-
Hackfleisch-Gewürz 2	33,5	25,9	-
Ketchup scharf*	0,4	0,5	-
Paprika-Gewürz	29,1	19,4	-
Pul Biber** 1	33,9	31,4	-
Pul Biber 2	28,7	26,3	-
Pul Biber 3	32,4	23,4	-
Pul Biber 4	17,5	19,6	-
Pul Biber 5	32,4	27,8	-

\* Sudan 4 zugesetzt (Wiederfindungsversuch)

\*\* türkische Gewürzmischung mit Chili

Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, dass Sudan4 und SudanB als Stellungsisomere (unterschiedliche Ausrichtung einer Methylgruppe am aromatischen Ring) chromatographisch zunächst nicht voneinander getrennt werden konnten. Zur Unterscheidung beider Substanzen stand lediglich eine Farbreaktion beim DC-Screening zur Verfügung. Nach Testen von verschiedenen RP18-Phasen mit unterschiedlicher Selektivität (siehe Tabelle 2) konnte mit der Aqua/Phenomenex (RP18 Phase mit polarem endcapping) ein Säulenmaterial



gefunden werden, mit dem eine sichere chromatographische Differenzierung von Sudan4 und SudanB möglich wurde.

Tabelle 2 : Vergleich HPLC-Säulen

Bezeichnung	Hersteller	Eigenschaften
Aqua	Phenomenex	RP18, polares endcapping
Luna	Phenomenex	RP18
Superspher-RP	VWR	RP18
Synergi Polar_RP	Phenomenex	RP18, Ether linked phenyl Column, polares Endcapping
Zorbax Bonus RP	Agilent	RP18, polar embedded groups, tripple endcapped
Synergi Max RP	Phenomenex	RP12

Durch weitere Optimierung der angelegten Kapillarensparnung und tunen auf jedes einzelne Molekularion konnte zudem die Empfindlichkeit der Messung erheblich verbessert werden (siehe Tabelle 1). Die Gegenüberstellung zeigt deutlich, dass entgegen den üblicherweise lautenden Empfehlungen eine erneute Optimierung des Tunefiles nach Umstellung von ESI auf APCI durchaus lohnenswert sein kann.

Tabelle 3 : Vergleich der Signalstärken

Fragment	ESI (Optimierter Tunefile)	APCI (ESI-Tunefile)	APCI (nach Optimieren)
Sudan1 m/z 93	659	78	4529
Sudan1 m/z 156	155	n.a.	n.a.
Sudan1 m/z 128	42	79	1886
Sudan1 m/z 232	515	215	3632
Sudan4 m/z 91	229	220	679
Sudan4 m/z 225	682	336	511
Sudan4 m/z 276	269	355	1122

## MESSBEDINGUNGEN HPLC-DAD

Gerät: HPLC-Anlage von Agilent, 1100er Baureihe, binäres Pumpensystem, automatischer Probengeber, thermostatisierbarer Säulenraum, UV-VIS-Dioden-Array-Detektor (DAD)

Trennsäule: Aqua (Phenomenex), 5µ, C18, 125Å, 250 × 2,00mm

Eluent A : 0,2% Essigsäure

Eluent B : Acetonitril

Gradient:	Zeit in min.	Eluent A (VT)	Eluent B (VT)
	0	30	70
	20	10	90
	30	5	95
	40	0	100
	45	30	70

Stop Time: 45,0 min

Post Time: 12,0 min

Fluß: 0,2 ml

Säulenraum: 40 °C

Injektion: 2µl

Detektion und Datenaufnahme:

Signal	Wellenlänge, BW	/	Referenzwellenlänge, BW
A	478,8	/	Ref 900,50
B	380,8	/	Ref 900,50
C	520,8	/	Ref 900,50

## MESSBEDINGUNGEN HPLC-MS/MS

HPLC: HPLC-Anlage (Agilent), 1100er Baureihe, binäres Pumpensystem, automatischer Probengeber, thermostatisierbarer Säulenraum gekoppelt mit TSQ 7000 (Thermo Electron)

Trennsäule: Aqua (Phenomenex), 5µ, C18, 125Å, 150 × 2,00 mm

Eluent A: Wasser

Eluent B: Methanol

Gradient:	Zeit in min.	Eluent A (VT)	Eluent B (VT)
	0	15	85
	1	15	85
	5	5	95
	20	5	95
	25	15	85

Stop Time: 25,0 min

Fluß: 0,3,ml

Säulenraum: 40 °C

Injektion: 10 µl

Aquire Time 16,5 min

Number of Segments 6

Polarity positiv

Sheath Gas 50 psi

Auxiliary Gas off

Source Type APCI

Capillary Temperature

200 ° C Vaporizer Temperature 400 °C

Corona Discharge Current 2 µA

Segment	Set	Center	Collision
	Mass	Mass	Energy

1	215	215	25
		197,9	25
		122,1	25
		93	25
2	249	249	25
		232	25
		155,9	25
		128	25
3	277,2	277,2	20
		260,1	20
		155,9	20
		121	20
4	353	353	30
		196	30
		156	30
		77,2	30
5	380	380	15
		183	15
6	381	381	25
		225	25
		224	25
		209	25