



**Entwicklung und Anwendung einer automatisierten  
HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse :  
Metabolismus, Verteilung und Elimination  
dreier Tetracycline bei Legehennen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der  
Bergischen Universität - Gesamthochschule Wuppertal

von

**Georg Zurhelle**

Wuppertal 2000

## Inhaltsverzeichnis

---

### Abstract

Tetracyclines are antibiotics and approved within the EU for treating laying hens with a maximum residue limit of 200 µg/kg in eggs for oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) and chlortetracycline (CTC), respectively, expressed as the sum of parent compound and its 4-epimer.

The development of an automated analytical method for the analysis of tetracycline residues in samples obtained from feeding studies and the results of these analyses are described. The automated method allows the simultaneous determination of the three tetracyclines and their metabolites in whole egg, egg yolk, egg white and blood plasma of the hens. Sample pre-treatment could be restricted to homogenisation and a dilution step. Cleanup is by on-line dialysis and on-line solid phase extraction utilising an extended ASTED<sup>®</sup> system, followed by HPLC with UV or fluorescence detection with post-column pH adjustment and confirmational analysis by LC-MS-MS. The feed samples were only extracted with an acidic aqueous solution prior to HPLC analysis.

The automated method produced no analytical artefacts. The feed administered to the hens and the egg samples spiked with OTC, TC and CTC were equally free of noticeable amounts of 4-epimers and other tetracycline-derived products. After analysing samples with incurred residues, signals not only for the parent compounds but also for the 4-epimers and for the tentatively identified N-desmethyl derivatives of OTC, TC and ICTC were obtained. Although their concentrations changed with the time during the medication and with each individual hen, the ratio of 4-epimer to total amount of all residues remained constant, with a different ratio in egg white and in egg yolk. Also a constant ratio of the N-desmethyl metabolite to the total amount of all residues was observed in egg yolk samples, while in egg white samples no N-desmethyl-derivatives were present. It is also interesting that in plasma and egg yolk samples the same metabolites were present, while in egg white samples only the parent compounds, a low ratio of 4-epimers, no N-desmethyl derivatives and other still unidentified metabolites were present. In all investigated matrices Isochlortetracycline (ICTC) and its 4-epimer were the principal metabolites of CTC and with the exception of plasma samples well exceeding the amount of CTC. With an *in vitro* experiment the formation of the 4-epimers of TC and CTC and also the formation of ICTC were observed, but N-desmethyl tetracyclines were not detected. This led to the conclusion that the N-desmethyl derivatives can be expected to be formed *in vivo* by microsomal enzymes of the P450 system, while pH value, time and temperature seem to be responsible for the *in vivo* formation of ICTC and the 4-epimers of TC, OTC, CTC and ICTC.

## Inhaltsverzeichnis

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 1995 bis zum Juli 1999 im Fachbereich 9 – Lebensmittelchemie an der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal angefertigt.

Mein Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. Michael Petz für die Überlassung des Themas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die Gelegenheit meine Forschungsergebnisse im In- und Ausland bei verschiedenen Tagungen präsentieren zu dürfen.
- Herrn Prof. Dr. Siewert und seinen Mitarbeiter(innen) vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, für die Durchführung der Medikationsstudien auf dem Versuchsgut des BgVV
- Herrn Dr. Fürst, CLUA Münster, sowie Herrn Prof. Dr. Blaß und seiner Mitarbeiterin Frau Lehmann, Bayer AG, für die technische Unterstützung und für die Messzeiten an einem LC-MS-MS Gerät
- Herzlichst danken möchte ich ferner :  
Herrn Dr. Johannsen, LUFA Kiel, für die Analyse von Futterproben  
Herrn Dr. Glenn Kennedy, DANI Belfast (UK), für die Analyse von Volleiproben
- Allen Kolleginnen und Kollegen des Fachbereichs 9, insbesondere der Lebensmittelchemie und der Biochemie, und besonders Frau Dr. E. Müller-Seitz, für die gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima
- und nicht zuletzt meinen Eltern, die mir diese akademische Ausbildung ermöglicht haben.

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Geschichte der Tetracycline	1
1.2	Struktur und Eigenschaften	3
1.3	Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte	5
1.4	Wirkungsweise der Tetracyclin-Antibiotika und Resistenz-Bildung	11
1.5	Toxikologie	11
1.6	Resorption, Metabolismus, Verteilung und Elimination	12
1.7	Anwendung der Tetracycline in der Veterinärmedizin	15
1.8	Rückstandsbildung von Arzneimitteln im Hühnerei und im Plasma	16
1.9	Mögliche Gefahren durch Arzneimittelrückstände im Hühnerei für den Menschen	20
1.10	Deutsche und europäische rechtliche Regelungen zum Einsatz von pharmakologischen Stoffen bei der Gewinnung von Lebensmitteln	20
<b>2.</b>	<b>Analytik der Tetracycline</b>	<b>23</b>
2.1	Nachweis in biologischen Matrices	23
2.2	Mikrobiologische Verfahren	23
<b>2.3</b>	<b>Chemisch-physikalische Verfahren</b>	<b>24</b>
2.4	Andere qualitative und quantitative Methoden	25
2.5	HPLC und Probenvorbereitung aus biologischen Matrices	26
2.5.1	Off-line Probenaufarbeitung	26
2.5.2	Automatisierte Online Probenaufarbeitung	30
2.5.3	Automatisierte Rückstandsanalytik von Tetracyclinen	31
2.5.4	Chromatographie	35
2.5.5	Detektion	36
<b>3.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>Methodenentwicklung zur ASTED<sup>®</sup>-HPLC-Analytik</b>	<b>40</b>
4.1	Apparativer Aufbau, Funktionsweise einer ASTED <sup>®</sup> -Analyse und chromatographische Bedingungen	40
4.2	Vorbehandlung der Probe	47
4.3	Dialyse	51
4.4	Anreicherung	57
4.5	Chromatographische Trennbedingungen	59
4.6	Chromatographische Bestimmung der Tetracycline, der Anhydrotetracycline, der Isotetracycline und ihrer Epimere	62
4.7	Detektion von Tetracyclinen und Isotetracyclinen mittels UV, Fluoreszenz und Massenspektroskopie	67

---

<b>5.</b>	<b>Methodenvalidierung und Qualitätssicherung</b>	<b>81</b>
5.1	Kenndaten der Chromatographie	81
5.2	Methodenvalidierung mit dotierten Probenmaterial	84
5.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	90
5.4	Qualitätssichernde Maßnahmen	93
5.5	Langzeitstabilität des Systems	97
<b>6.</b>	<b>Medikationsstudien</b>	<b>98</b>
6.1	Untersuchung von Hühnerfutter	98
6.2	Rückstandsdaten im Ei nach Medikation mit CTC, TC und OTC	102
6.2.1	Rückstände in Eigelbproben	103
6.2.1.1	Chlortetracyclin	103
6.2.1.2	Tetracyclin	108
6.2.1.3	Oxytetracyclin	110
6.2.2	Rückstände in Eiklarproben	113
6.2.2.1	Chlortetracyclin	113
6.2.2.2	Tetracyclin	115
6.2.2.3	Oxytetracyclin	117
6.2.3	Vergleich Eigelb – Eiklar	118
6.2.3.1	Chlortetracyclin	118
6.2.3.2	Tetracyclin	121
6.2.3.3	Oxytetracyclin	122
6.2.4	Rückstandsdaten in Volleiproben	123
6.2.5	Tetracyclinrückstände in der Eischale	126
6.3	Rückstandsdaten in Plasmaproben und in Eidotterproben des Eierstocks nach Medikation mit CTC, TC und OTC	129
6.3.1	Rückstandsdaten in Plasmaproben	129
6.3.1.1	Chlortetracyclin	130
6.3.1.2	Tetracyclin	133
6.3.1.3	Oxytetracyclin	135
6.3.2	Untersuchungen der Eidotter im Eierstock	136
6.4	Untersuchungen zur spektroskopischen Absicherung	138
6.4.1	Chlortetracyclin	138
6.4.2	Tetracyclin	142
6.4.3	Oxytetracyclin	146
6.5	Auffinden weiterer Metaboliten in Eigelb- und Eiklarproben mit einer veränderten Probenaufarbeitung	150
6.5.1	Auffinden weiterer Metaboliten in Eigelbproben	150
6.5.2	Auffinden weiterer Metaboliten in Eiklarproben	153
6.5.3	Enzymatische Hydrolyse von Konjugaten	157

---

6.5.4	Isotetracyclin und Isooxytetracyclin als potentielle Rückstände nach Medikation mit TC und OTC	160
<b>7.</b>	<b>In-vitro Untersuchungen zur Stabilität der Tetracycline</b>	<b>162</b>
7.1	Epimerisierung und Isomerisierung bei 37°C als simulierte physiologische Bedingung	162
7.2	Lagerstabilität von Tetracyclinen in lyophilisiertem Vollei	164
<b>8.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>167</b>
8.1	Tetracyclin-Analytik mittels HPLC	167
8.2	Analytischer Nachweis der Metabolismus	170
8.2.1	Nachweis der Epimerisierung und Isomerisierung	170
8.2.2	Nachweis der N-Desmethylierung	172
8.2.3	Ermittlung weiterer Metaboliten	172
8.3	Vergleich der Rückstände in Eigelb-, Eiklar- und Volleiprobe	173
8.4	Tetracyclin-Rückstände in der Eischale	174
8.5	Ausblick auf zukünftige Studien	175
<b>9.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>177</b>
<b>10.</b>	<b>Arbeitsvorschriften und -bedingungen</b>	<b>181</b>
10.1	Chemikalien und Hilfsmittel	181
10.1.1	Allgemeine Chemikalien	181
10.1.2	Lösungen und Puffer	181
10.1.3	Standardsubstanzen und Stammlösungen	182
10.1.4	Laborgeräte	183
10.1.5	Probenaufarbeitungssystem	184
10.1.6	Chromatographische Ausrüstung	184
10.2	Durchführung der Analysen	185
10.2.1	Untersuchung von Proben mit unbekanntem Analytgehalt	185
10.2.2	Flüssigvollei-Standards zur Ermittlung einer Kalibrierfunktion für Hühnervolleiprobe	185
10.2.3	Dotierung zur Aufstellung einer Kalibriergerade	186
10.2.4	Probenvorbereitung	187
10.2.5	Online gekoppelte Dialyse mit dem ASTED-System	188
10.2.5.1	Dialyse von Ei-haltigen Standards und Eiprobe mit Programmfile 90	188
10.2.5.2	Bestimmung des Isochlortetracyclins mittels Fluoreszenz-Detektion	189

---

10.2.5.3	Parameter der automatisierten on-line Probenaufarbeitung	190
10.2.5.4	Analysedurchführung mit dem ASTED-System	191
10.2.5.5	Wartung des ASTED-Systems	192
10.3	Vorschrift für LC-MS/MS Bestimmung zur qualitativen Bestätigung und Identifizierung der drei Tetracycline und ihrer Metaboliten	193
10.4	Untersuchung der Futterproben	195
10.5	Herstellung der Isotetracycline	196
10.5.1	Herstellung des Isooxytetracyclins aus Oxytetracyclin und des Isotetracyclins aus Tetracyclin	196
10.5.2	Analyse und Charakterisierung der Produktgemische Isooxytetracyclin und Oxytetracyclin, sowie des Gemisches Isotetracyclin und Tetracyclin	197
10.6	Medikationsstudien mit gesunden Legehennen	199
10.7	Gewinnung von lyophilisiertem Vollei mit Rückständen	200
10.8	Gewinnung von Plasma aus Hühnerblut	201
10.9	Mischung der Futterproben	201
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>202</b>
<b>12</b>	<b>Anhang</b>	<b>218</b>
12.1	Untersuchungen zum Chlortetracyclin, Isochlortetracyclin, und Apo-Oxytetracyclin-Standard	218
12.2	DAD-Spektrum des Fließmittels	220
12.3	Flächenwerte-Regelkarten von OTC, TC, CTC und ICTC in Volleiprobe	221
12.4	Kalibriergeraden und Response-Werte	223
12.4	Programmierung des ASTED-Systems	234
12.5	Abkürzungsverzeichnis	239
12.6	Begriffsbestimmungen	241

## **1 Einleitung**

Die drei Tetracyclin-Antibiotika Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin werden in der Veterinärmedizin häufig angewendet. Der Einsatz dieser Antibiotika bei lebensmittelliefernden Tieren ist unter Beachtung der europäischen Gesetzgebung erlaubt [1]. Rechtliche Regelungen stellen die Höchstmengenregelungen nach VO (EWG) 2377/90 [1] sowie die Festsetzung von Wartezeiten für Arzneimittel, die bei lebensmittelliefernden Tieren Anwendung finden, dar. Für die Kontrolle dieser Regelungen sind jedoch Nachweisverfahren erforderlich, die einen Wirkstoff oder dessen Hauptmetaboliten sowohl qualitativ als auch quantitativ erfassen. Die Identifizierung einzelner Tetracycline oder ihrer Metaboliten ist durch mikrobiologische Verfahren kaum möglich.

Im ersten Teil der Arbeit wird eine entwickelte neuartige automatisierte HPLC-Methode vorgestellt, die die Untersuchung und Erfassung der Tetracycline sowie möglicher Metaboliten der drei Tetracycline Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in Eiklar-, Eigelb-, Vollei- und Plasmaproben ermöglicht. Im zweiten Teil der Arbeit wird ein aktueller Beitrag zum Kenntnisstand des Metabolismus und der Verteilung der drei Tetracyclin-Antibiotika in Hühnereiern und in Plasmaproben gegeben.

### **1.1 Die Geschichte der Tetracycline**

Der Siegeszug des Penicillins beflügelte mehrere Pharmafirmen und akademische Einrichtungen dazu, Mikroorganismen, die im Boden vorkommen, auf die Bildung neuer Antibiotika zu untersuchen [2]. Bei einem solchen Screening-Programm der Lederle Laboratories entdeckte Duggar 1948 Chlortetracyclin [2, 3].

Chlortetracyclin war damit das erste Antibiotikum aus der Tetracyclinreihe. Im Juli 1948 wurde es aus *Streptomyces aureofaciens* isoliert und als Aureomycin bezeichnet. Später erhielt es den internationalen Namen Chlortetracyclin.

Auch die Tetracycline Oxytetracyclin (1950, Pfizer Company), Tetracyclin (1953) und 6-Desmethylchlortetracyclin (Demeclocyclin) (1957) wurden aus Kulturfiltraten verschiedener *Streptomyces* Arten und deren Mutanten gewonnen. Die Entdeckung der Tetracycline wurde sehr schnell für medizinische Anwendungen genutzt, da die Tetracycline ein breiteres Wirkungsspektrum als die damals erhältlichen Penicilline haben und da sie nicht nur bei gram-positiven sondern auch bei vielen gram-negativen Organismen wirken. Ein wichtiger Vorteil für ihre Akzeptanz war auch die Tatsache, daß sie oral aufgenommen werden können und dabei eine antibiotische Wirksamkeit behalten.

Viele der Tetracyclinbildner (z.B. *Streptomyces aureofaciens*) neigen dazu, zwei oder drei dieser oder anderer ähnlicher Verbindungen nebeneinander zu bilden. Hier bewirken



---

Stammführung, Selektionen und Mutationen, Fermentationstechnik und auch Zusätze, daß das gewünschte Antibiotikum (OTC, TC oder CTC) bevorzugt gebildet wird.

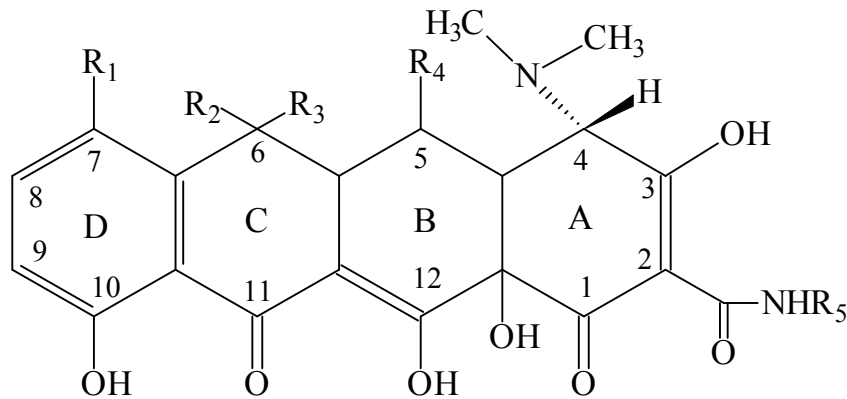
Die anderen heute bekannten Tetracycline werden durch eine nachträgliche chemische Modifizierung der fermentativ gewonnenen Tetracycline synthetisiert und werden als semisynthetische Tetracycline bezeichnet. Hierzu zählen die Tetracycline Rolitetraacyclin Methacyclin, Doxycyclin und Minocyclin.

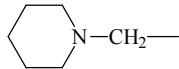
Die Entwicklung der unterschiedlichen Tetracyclinderivate zeigt eine Tendenz zur Gewinnung von Derivaten mit ausgeprägterem lipophilen Charakter, besserer intestinaler Resorption, langsamer renaler Elimination und geringeren Nebenwirkungen [3].

Bald nach der Strukturaufklärung der ersten Tetracycline suchte man nach Möglichkeiten zu ihrer Totalsynthese [3]. Die vielen Substituenten der Tetracycline, die sie gegenüber sauren, alkalischen und reduzierenden Reagenzien sehr reaktionsfähig machen, erschwerten den stereospezifischen Aufbau dieses Molekültyps. Diese Aufgabe wurde von mehreren Arbeitskreisen in Angriff genommen. Die erste Synthese wurde erst 1962 von Woodward für das 6-Desmethyl-6-desoxytetracyclin und 1968 von Muxfeldt für das Tetracyclin beschrieben [4]. Die aufwendigen Totalsynthesen haben aus Rentabilitätsgründen keinen Eingang in die industrielle Herstellung finden können.

## 1.2 Struktur und Eigenschaften

Die folgende Abbildung (Abb. 1) gibt einen Überblick über die in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzten Tetracycline. Für veterinärmedizinische Anwendungen wurden Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin zugelassen [1].



Name	Abkürzung	R1	R2	R3	R4	R5
Tetracyclin	TC	H-	CH <sub>3</sub> -	HO-	H-	H-
Chlortetracyclin	CTC	Cl-	CH <sub>3</sub> -	HO-	H-	H-
Oxytetracyclin	OTC	H-	CH <sub>3</sub> -	HO-	HO-	H-
Demeclocyclin		Cl-	H-	HO-	H-	H-
Rolitetracyclin		H-	CH <sub>3</sub> -	HO-	H-	
Doxycyclin		H-	CH <sub>3</sub> -	H-	HO-	H-
Minocyclin		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N-	H-	H-	H-	H-

**Abb. 1 : Chemische Struktur der Tetracycline**

In den folgenden Punkten werden die Tetracycline charakterisiert :

- **physikalische Eigenschaften der Tetracycline**

Alle Tetracycline sind gelbe, kristalline, geruchlose, bitter schmeckende und lichtempfindliche Verbindungen. Schmelz- und Zersetzungspunkte liegen zwischen 165 und 185°C [4].

- **chemische Eigenschaften der Tetracycline**

Das Tetracyclin stellt ein drei-basisches System dar, mit  $pK_a$ -Werten von 3,3 für das  $\beta$ -Tricarbonylsystem im Ring A, einem  $pK_a$ -Wert von 7,7 für das vinyloge  $\beta$ -Dicarbonylsystem der Ringe B/C und einem  $pK_a$ -Wert 9,7 für die protonierte Dimethylaminofunktion [5, 6]. Darüber hinaus wird über einen  $pK_a$ -Wert von 10,7 für die phenolische OH-Gruppe am C10-Kohlenstoffatom berichtet [7]. Aufgrund der sauren Gruppen und des basischen Dimethylaminorestes verhalten sie sich amphoter. Sie bilden sowohl mit Säuren als auch mit Basen wasserlösliche Salze. Von diesen haben die Hydrochloride die größte Bedeutung.

- **Komplexbildung**

Die Tetracycline neigen zur Komplexbildung mit Anionen und Kationen sowie mit nieder- und hochmolekularen Verbindungen [3, 8, 9]:

Metallkationen :  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  
 $Ca^{2+}$ ,  $Be^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Zr^{4+}$ , seltene Erden

Anionen : Phosphat, Polyphosphat, Citrat, Salicylat

Neutrale Verbindungen : Coffein, Harnstoff, Thioharnstoff, Polyvinylpyrrolidon

Die Komplexbildung mit Metallkationen führt zu einer Fluoreszenzverstärkung und ist somit analytisch nutzbar. Die Tetracycline werden durch Serumbestandteile (Serumalbumin, Lipoproteine, Globuline) reversibel gebunden, wobei die Bindung für die verschiedenen Tetracycline zwischen 27 und 90 % betragen kann [3].

- **UV- und Fluoreszenz-Eigenschaften**

Die Tetracycline Oxytetracyclin und Tetracyclin haben bei 280 und 360 nm ein UV-Absorptionsmaximum. Bei Chlortetracyclin liegen die Maxima bei 280 und 372 nm. Obwohl der Extinktionskoeffizient bei 280 nm größer ist als im langwelligeren Bereich, wird aufgrund der Spezifität in der Rückstandsanalytik der UV-Bereich 350 bis 380 nm zur Detektion bevorzugt [10, 11].

Der Ring A des Tetracyclingrundgerüsts trägt nur zur UV-Absorption im Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm bei und das Ringsystem B-C-D trägt sowohl zur UV-Absorption bei 250 bis 300 nm als auch zur UV-Absorption bei 340-380 nm bei [12].

Die Tetracycline besitzen auch eine natürliche Fluoreszenzeigenschaft, die Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen sind für OTC 373/516 nm für TC 380/520 nm und für CTC 385/525 nm [12].

Mit zwei- und dreiwertigen Ionen [13] kann man die natürliche Fluoreszenz der Tetracycline verstärken und für die Detektion bei 390/510 nm analytisch nutzen.

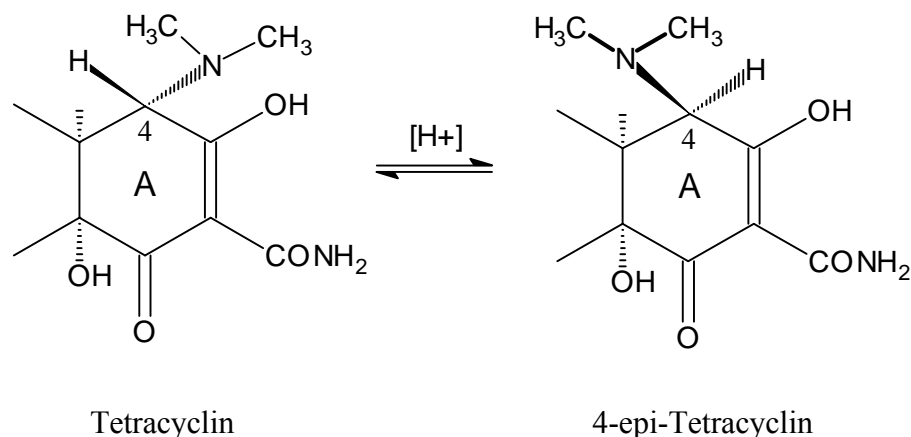
### 1.3 Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte

Als Umlagerungsprodukte der Tetracycline werden die 4-Epimeren, die Keto-Enol-Tautomere und die Isomere unterschieden. In der Tetracyclinliteratur umschreibt bzw. beschränkt sich der Begriff „Isomer“ oder „Iso-“ nur auf die Umlagerungsprodukte, die bei alkalischem pH-Wert unter einer Lactonbildung einen 5-Ring bilden. Die anderen Umlagerungsprodukte (4-Epimere oder Keto-Enol-Tautomere) sind de facto allerdings auch Isomere. Aus Konventionsgründen und um Mißverständnisse mit dem Begriff „Iso-“ oder „Isomer“ zu vermeiden, wurde die in der Tetracyclinliteratur eingeführte Beschränkung des Begriffs „Isomer“ oder „Iso-“ beibehalten. Die Dehydratationsprodukte der Tetracycline werden aus den Tetracyclinen durch eine Wasserabspaltung gebildet und unterscheiden sich daher in ihrer Masse von Tetracyclinen und den Isotetracyclinen.

Im folgenden werden die Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte aufgelistet :

- **Epimerisierung und pH-Stabilität der Tetracycline**

In schwach sauren Lösungen zwischen pH 2 und 6 unterliegen die Tetracycline einer Isomerisierung am asymmetrischen C-4 Kohlenstoffatom. Bei dieser Isomerisierung kehrt sich die Konfiguration am C-4 Atom um, so daß diese Isomerisierung als Epimerisierung Eingang in die Literatur gefunden hat (Abb. 2). Die Epimerisierungsreaktion verläuft nach einer Reaktion erster Ordnung und ist reversibel. Die Geschwindigkeit der Epimerisierung ist pH-Wert abhängig und hat bei pH = 3,2 ein Maximum [10, 14, 15].



**Abb. 2: Epimerisierung**

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Umlagerung wird durch mehrwertige Kationen, Phosphationen und Citrationen sowie Substanzen wie Harnstoff und Lösungsvermittler beeinflusst. Die Lage des Gleichgewichts wird durch den pH-Wert bestimmt [14, 15]. Die Epimerisierungsrate ist in 0,03 M HCl (pH = 1,5) noch unmeßbar klein,

und die Dehydratisierungsgeschwindigkeit ist bei diesem pH so gering, daß Tetracyclinlösungen bei pH 1,5 bis 2 längere Zeit haltbar sind.

pH	Gleichgewichtskonzentration 4-epi-Tetracyclin [%]
2,4	45
3,2	55
4,0	37
5,0	32
6,0	18

**Tab. 1 : Gleichgewichtslage des Tetracyclins und seines 4-Epimers gelöst in 0,1 mol/l Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten. Die Lösungen wurden so lange bei 23°C gelagert bis der Epimerenanteil sich nicht mehr änderte [14].**

Tab. 1 gibt [14] den Einfluß des pH-Wertes auf das Ausmaß der Epimerisierung von Tetracyclin in 0,1 M Phosphatpuffer bei 23°C wieder. McCormick et al. [10] beschreiben für die unterschiedlichen Tetracycline auch unterschiedliche Gleichgewichts-Epimerisierungs-Verhältnisse von 30 bis 68 %. Die Zeit bis zur Einstellung der Gleichgewichtslage ist nach seinen Ergebnissen von der Pufferkonzentration abhängig [10].

Das 4-Epimer besitzt anders als die Ausgangssubstanz keine mikrobiologische Aktivität, sofern es nicht zur Muttersubstanz rückepimerisiert und dann wieder eine geringe mikrobiologische Aktivität besitzt [3, 10]. Die Tetracycline unterscheiden sich von ihren 4-Epimeren auch in ihrer optischen Drehung [3].

In Tab. 2 finden sich Angaben zur Stabilität der mikrobiologisch aktiven Tetracycline und der 4-epi-Tetracycline im alkalischen Medium [10, 16].

	Abkür- zung	Halbwerts- zeit	Bedingungen
Oxytetracyclin	OTC	10,9 h	0,1 N NaOH, 23°C [10]
		2,2 min	0,1 N NaOH, 100°C [16]
4-epi-Oxytetracyclin	e-OTC	21,8 h	0,1 N NaOH, 23°C [10]
		3,3 min	0,1 N NaOH, 100°C [16]
Tetracyclin	TC	101 min	0,1 N NaOH, 60°C [10]
		6,8 min	0,1 N NaOH, 100°C [16]
4-epi-Tetracyclin	e-TC	225 min	0,1 N NaOH, 60°C [10]
		7,2 min	0,1 N NaOH, 100°C [16]
Chlortetracyclin	CTC	53 min	Carbonat-Puffer pH 8,8, 29°C [10]
		<0,3 min	0,1 N NaOH, 100°C [16]
4-epi-Chlortetracyclin	e-CTC	154 min	Carbonat-Puffer pH 8,8, 29°C [10]
		<0,6 min	0,1 N NaOH, 100°C [16]

**Tab. 2: Stabilität von Tetracyclin-Lösungen (10 mg/l) und ihrer Epimere im alkalischen Medium.**

Tab. 2 ist zu entnehmen, daß die 4-Epimere gegenüber der Alkali-Einwirkung stabiler sind als die Muttersubstanzen.

Die Inaktivierung der mikrobiologischen Wirksamkeit von Tetracyclin-Lösungen mit der Konzentration 1 mg/ml bei 37°C und 100°C in einem Phosphat-Puffer wurde von Bohonos et al. [17] beschrieben. Die Tab. 3 faßt diese Ergebnisse zusammen. Neben der Inaktivierung der mikrobiologischen Wirksamkeit durch Epimerisierung können auch andere Reaktionen, wie eine Dehydratation (s.u.) und eine Isomerisierung (s.u.) zum Verlust der mikrobiologischen Aktivität führen. Auch diese Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte können reversibel epimerisieren, da bei ihnen die Dimethylaminogruppe nicht verändert wird.

Aus Tab. 3 ist abzulesen, daß die drei Tetracycline bei 100°C pH 2,5 stabiler sind als bei 100°C pH 7,0. Auffällig ist, daß Oxytetracyclin bei 37°C stabiler ist als Tetracyclin, und daß umgekehrt das Tetracyclin bei 100°C stabiler als Oxytetracyclin ist. Nach Bohonos et al. [17] ist bei 37°C das Chlortetracyclin das instabilste der drei Tetracycline.

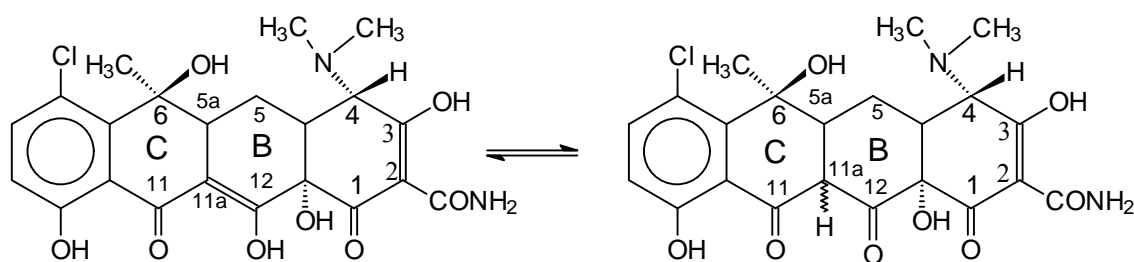
pH-Wert	Temperatur, Zeit	Verbleibende mikrobiologische Aktivität in %		
		CTC	OTC	TC
8	37°C, 10 h	8	75	64
7	37°C, 10 h	35	66	98
2,5	100°C, 15 min	36	37	55
7	100°C, 15 min	2	7	45
9	100°C, 15 min	2	14	37

**Tab. 3: Einfluß von pH-Wert und Temperatur auf die mikrobiologische Aktivität von Tetracyclinen nach Bohonos et al [17]**

- **Keto-Enol-Tautomerie**

Die Tetracycline können mehrere tautomere Formen bilden (Abb.3). Zwischen dem C1-, C2- und dem C3-Atom des Rings A können tautomere Formen gebildet werden. In Verbindung mit der Carbonylfunktion am C2-Atom kann sich ein  $\beta$ -Tricarbonylsystem ausbilden.

Eine weitere tautomere Umlagerung findet am C11-, C11a- und C12- Atom der Ringe B und C statt. Für Chlortetracyclin und Doxycyclin wurde von Naidong et al. [18, 19] bei gekühlten Polymerphasen erstmalig die chromatographische Trennung dieser Tautomere am C11-, C11a- und C12- beschrieben. Das am C11a- Atom befindliche H-Atom kann cis- oder trans-ständig zum H-Atom des C5a-Atoms stehen, woraus sich eine keto-trans und eine keto-cis-Form ableiten läßt. Die verschiedenen tautomeren Formen am Ring A und Ring B-C können auch gleichzeitig vorliegen.



Chlortetracyclin : Enolform

Chlortetracyclin : Ketoform

**Abb. 3 : Keto-Enol-tautomere Formen des Chlortetracyclins [19]**

- **Isomerisierung von Tetracyclinen mit einer Hydroxygruppe am C-6 Atom**

Das Chlortetracyclin wird schon bei pH 7,0 in Isochlortetracyclin (ICTC) umgewandelt [20] (Abb. 4). TC und OTC werden unter den gleichen Bedingungen erst bei pH 9 bis 10 in die entsprechenden Isoverbindungen Isotetracyclin (ITC) und Isooxytetracyclin

(IOTC) umgewandelt. Die alkalische Isomerisierung ist irreversibel. Die Bildung der Isotetracycline (IOTC, ITC, ICTC) geht einher mit einer pH-abhängigen Absorptionsänderung bei 300-380 nm [10, 21]. Nur im alkalischen pH-Bereich besitzen die drei Isotetracycline eine UV-Absorption bei 300-380 nm [21]. Bei alkalischen Lösungen von OTC, TC oder CTC können freie Radikale nachgewiesen werden, die wiederum vom CTC schneller gebildet werden als von den anderen Tetracyclinderivaten [7]. Die 6-Desmethyltetracycline sind gegenüber Basen stabiler [16].

Yibing et al. [12] ermittelten die natürliche Fluoreszenz aller alkalischen Tetracyclin-Umlagerungsprodukte. Es wurden als Anregungswellenlängen und als Emissionswellenlängen für IOTC 334 und 416 nm, für ITC 333 und 416 nm und für ICTC 345 und 419 nm erhalten.

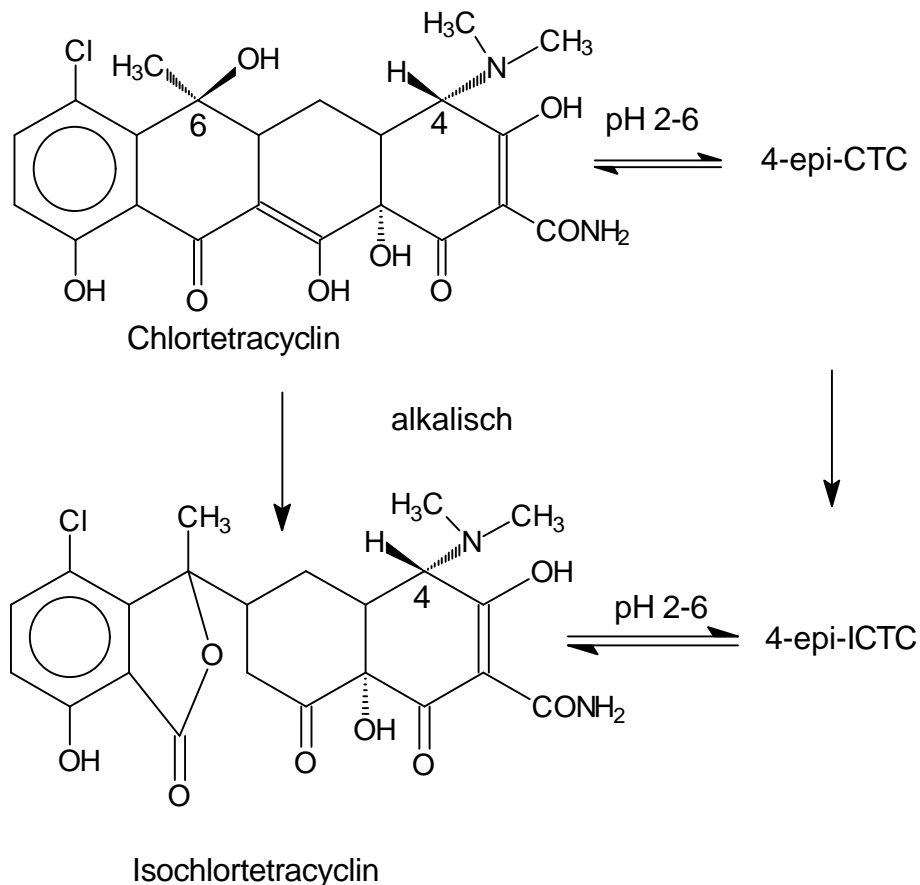
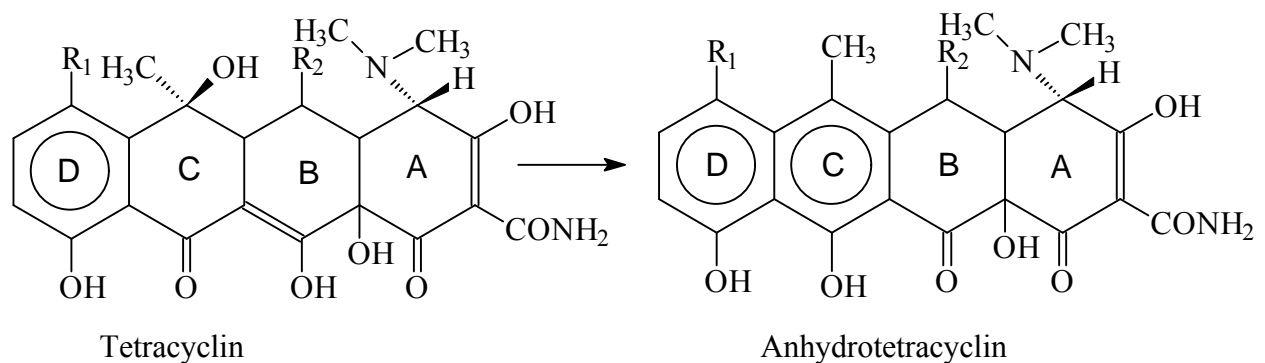


Abb. 4: Bildung von Isochlortetracyclin und Epi-Isochlortetracyclin aus CTC [20, 21]



- **Dehydratation von Tetracyclinen mit einer Hydroxygruppe am C-6 Atom**

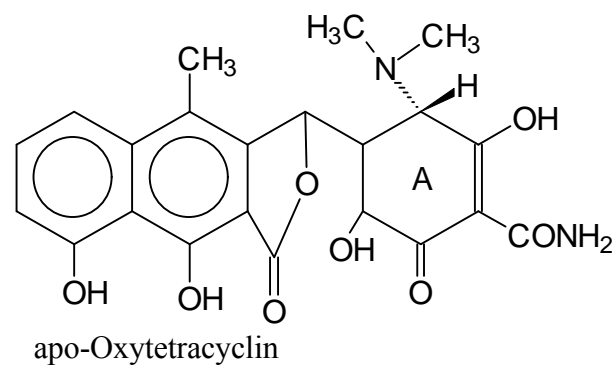
In sauren Lösungen mit pH-Werten von maximal pH 1,5 wird Tetracyclin zu Anhydrotetracyclin dehydratisiert. Die Dehydratation der Tetracycline in saurer Lösung ist irreversibel und wird bei höheren Temperaturen gefördert [10, 22]. Der Ring C des TetracyclinGrundgerüsts wird dadurch aromatisch. Chlortetracyclin wird ebenfalls unter gleichen Bedingungen zu Anhydrochlortetracyclin dehydratisiert (Abb. 5), während Oxytetracyclin zu einem Gemisch von Epimeren, den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Apoxytetracyclinen (Abb.6) umgewandelt wird.



**Abb. 5 : Dehydratation von Tetracyclin ( $R_1 = H$ ) und Chlortetracyclin ( $R_1 = Cl$ ) unter dem Einfluß starker Säuren [3, 11]**

Die Anhydrotetracycline können ebenfalls zu 4-Epi-Anhydrotetracyclinen epimerisieren. Die Anhydroverbindungen und ihre 4-Epimere besitzen eine gegenüber den Ausgangsverbindungen reduzierte mikrobiologische Aktivität.

Das Anhydro-Oxytetracyclin ist in wässriger Lösung instabil und wird zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -apo-Oxytetracyclin abgebaut [3].



**Abb. 6 : Chemische Struktur von apo-Oxytetracyclin [3]**

Die Anhydrotetracycline können fluorimetrisch als Anhydrotetracyclin-Aluminium-Komplex bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm und einer Emissionswellenlänge von 550 nm selektiv detektiert werden [22].

Die neueren Tetracycline Doxycyclin, Methacyclin und Minocyclin sind säurestabil, da sie zur Gruppe der 6-Desoxytetracycline zählen.

## 1.4 Wirkungsweise der Tetracycline und Resistenzbildung

Der Wirkungsmechanismus ist bei allen Tetracyclinen gleich. Die Wirkungsunterschiede innerhalb der hier behandelten Tetracycline sind sehr gering. Das Wirkungsoptimum von TC, CTC und OTC liegt im pH-Bereich von 5,5 bis 6,5 [23]. In der Elongationsphase der Proteinbiosynthese verhindern die Tetracycline bei Prokaryonten die Bindung der Aminoacyl-t-RNA an die spezifische Akzeptorstelle der 30-S-Ribosomen. Die Proteinbiosynthese wird dadurch verhindert. Die Tetracycline binden hierbei spezifisch an die 30-S-Untereinheit [23, 24].

Diese Wirkung des Tetracyclins besteht nach Schrinner und Limbert [25] darin, daß niedrige Tetracyclin-Konzentrationen im Zellinnern einen Mechanismus induzieren, der das eingedrungene Tetracyclin nicht mehr herausdiffundieren läßt. Es kommt in Folge zur Kumulation des Tetracyclins innerhalb der Bakterienzelle, bis die Konzentration so hoch ist, daß die Proteinbiosynthese zum Erliegen kommt [25].

Bakterien erlangen eine **Resistenz**, indem die Akkumulierung des Antibiotikums in der Zelle herabgesetzt wird [25, 26]. Das Resistenz-Gen ist plasmid-codiert und induzierbar. Der Resistenzmechanismus beruht auf einem aktiven, energieabhängigen Transportsystem, welches das Antibiotikum aus den Zellen pumpt [27].

## 1.5 Toxikologie

Das Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) von WHO/FAO hat einen ADI-Wert von 0-3 µg/kg Körpergewicht für die klassischen Tetracycline jeweils einzeln oder in Kombination festgelegt [28].

Toxische Wirkungen nach therapeutischer Anwendung von Tetracyclinen beim Menschen wurden bislang auf überlagerte Tetracycline zurückgeführt, die als saure Citrate gelagert wurden und epi-Anhydrotetracyclin enthielten. Die toxische Wirkung des epi-Anhydrotetracyclins wird als reversibles Fanconi-Typ Syndrom in der Literatur beschrieben [29]. Bei unsachgemäßer Überdosierung von Tetracyclinen oder bei Niereninsuffizienz und gleichzeitiger Tetracyclin-Applikation wurde über schwere Nieren- und Leberschäden mit teilweise tödlichem Ausgang berichtet [30, 31, 32].

## 1.6 Resorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination

Arzneimittel werden nach Verabreichung in Abhängigkeit von einer Vielzahl von Faktoren resorbiert, im Organismus verteilt, metabolisiert oder sonst chemisch umgewandelt und schließlich ausgeschieden. Für den Konsumenten von Lebensmitteln tierischer Herkunft ist derjenige Wirkstoffanteil von Bedeutung, der im eßbaren Gewebe von behandelten Tiere verbleibt. Neben dem eigentlichen Wirkstoff, welcher als Muttersubstanz bezeichnet wird, können eine Anzahl von Metaboliten existieren. Die Rückstandskonzentrationen der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten unterliegen je nach Spezies, Geschlecht, physiologischem Zustand (Trächtigkeit), Alter, Ernährung, Gesundheitszustand usw. starken Schwankungen [33]. Die Wirkung der Tetracycline wird im folgenden näher beschrieben :

- **Resorption, Verteilung und Elimination der Tetracycline**

In Abhängigkeit vom Füllungszustand des Magens und der Zusammensetzung der Nahrung unterliegt die Resorptionsquote aller Tetracyclinderivate erheblichen individuellen Schwankungen [34]. So erhöht die gleichzeitige Gabe von Citronensäure die Serumkonzentrationen und die Konzentrationen von Chlortetracyclin bei der Elimination [35]. Nach unterschiedlicher Resorption verteilen sich die Tetracycline im gesamten Organismus. Kelly und Kanegis [36] fanden nach intravenöser Gabe von Tetracyclin-Hydrochlorid und nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts im Hund die höchsten Konzentrationen in Niere, Leber und Gallenblase.

Die Elimination aller Tetracycline findet zumindest teilweise über die Galle statt, vor allem aber bei Chlortetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin. Über den enterohepatischen Kreislauf wird besonders bei diesen drei Tetracyclinen die Ausscheidung verzögert. Dagegen werden Tetracyclin und Oxytetracyclin vorwiegend renal ausgeschieden. Nierenfunktionsstörungen führen bei ihnen zu beachtenswerten Verlängerungen der Plasmahalbwertszeit [34].

In Knochen und Zähnen lagern sich Tetracycline bei Heranwachsenden in Form ihrer Calcium-Komplexe ab [37, 38]. Während der Schwangerschaft sollte daher eine werdene Mutter keine Tetracycline zu sich nehmen [38].

Die Verteilung der Tetracycline im Organismus ist nach Böcker [39-40] und Böcker und Estler [41] geschlechtsspezifisch, wobei bei weiblichen Tieren höhere Konzentrationen in Leber und Nieren erreicht werden als bei männlichen. Auch die Elimination erfolgt nach Böcker geschlechtsspezifisch, wobei die Elimination bei weiblichen Tieren deutlich langsamer erfolgt als bei männlichen Tieren.

Auch Hewell [42] stellte bei Tetracyclin (5 Tage Applikation über das Trinkwasser) geschlechtsspezifische Unterschiede bei Masthühnern fest. So wurden bei weiblichen Tieren deutlich höhere Konzentrationen im Blut, Muskel, Leber und Niere als beim

männlichen Tier gefunden, wobei der geschlechtsspezifische Unterschied beim Blut und der Leber besonders deutlich war.

- **Metabolismus von Tetracyclinen**

Eine der wichtigsten Aufgaben der Leber besteht darin, toxische Substanzen und Stoffe exogener Herkunft, beispielsweise Arzneimittel, chemisch soweit umzuwandeln, daß sie als wasserlösliche Produkte ausgeschieden werden können, bevor ihre Anreicherung im Organismus kritische Werte erreicht hat. Dieser Vorgang wird mit dem Begriff Biotransformation umschrieben. An diesem Vorgang sind die Cytochrom P-450 Enzyme beteiligt, die im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert und dort an die lipidhaltigen Membranen gebunden sind. Diese microsomalen Enzyme besitzen eine geringe Spezifität und sind daher geeignet, Substanzen mit den unterschiedlichsten Strukturen weniger lipidlöslich zu machen. Die Enzymaktivität kann durch Hormone und Fremdstoffe verändert werden und wird durch den Entwicklungszustand des Organismus (Alter) und das Geschlecht beeinflusst. Die Bildung der microsomalen Enzyme selbst kann auch durch bestimmte Stoffe induziert werden. Die Produkte der enzymatischen Reaktionen des Cytochrom P-450 Systems haben oft eine andere Wirkung als die Edukte. Hierbei kann aus einer wirksamen Verbindung eine unwirksame entstehen und umgekehrt. Gleichzeitig kann aber auch das Produkt toxischer sein als das Edukt. Der Biotransformation kann daher keine allgemeine Schutzfunktion im Sinne eines Entgiftungsmechanismus zugeschrieben werden.

Es werden hierbei in der Literatur zwei Arten von Reaktionen, die Funktionalisierungsreaktionen (Phase I-Reaktionen) und die Konjugationsreaktionen (Phase II-Reaktionen), unterschieden. Bei den Funktionalisierungsreaktionen werden durch Reaktionen an der Ausgangsverbindung funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt. Bei den Konjugationsreaktionen werden an die funktionellen Gruppen Reste gekoppelt, die zu einer verbesserten Wasserlöslichkeit führen. Hierbei finden Konjugationen mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Carbonsäuren, Aminosäuren und dem Glutathion statt. Von den 10 Grundtypen der Cytochrom P-450 katalysierten Reaktionen sind die Epoxidierung von aromatischen Verbindungen und die aromatische Hydroxylierung sehr häufig beschrieben worden [43, 44, 45, 46].

Ausgangspunkt für die Suche nach Metaboliten war eine Differenz in den Analyseergebnissen, die mit Radioaktivitätsmessungen (bei radioaktiv markierten Tetracyclinen) und mikrobiologischen Methoden bei Faeces und Urin erhalten worden war. Die Radioaktivitätsmessungen zeigten eine höhere Konzentration als die mikrobiologischen Methoden. Die Differenz wurde auf eine mikrobiologische Inaktivierung der Tetracycline im Organismus zurückgeführt [39, 47, 48, 49, 50], da die mikrobiologische Nachweismethode nur die mikrobiologisch aktive Form

nachweisen konnte. Über einen anderen und indirekten Weg zeigten Penttilä und Neuvonen [51, 52], daß bei Einsatz der auf das arzneimittelmetabolisierende Enzymsystem (P450) induzierend wirkenden Pharmaka wie Barbiturate oder Diphenylhydantoin die Halbwertszeit des Doxycyclins kürzer war [52]. Hieraus postulierten sie eine metabolische Veränderung für Doxycyclin. Sie diskutierten, wie vorher schon Schach von Wittenau et al. [47] Konjugationsreaktionen. Zusätzlich schlugen sie eine Hydroxylierung vor, die zu den häufigsten Reaktionen des P450-Systems zählt.

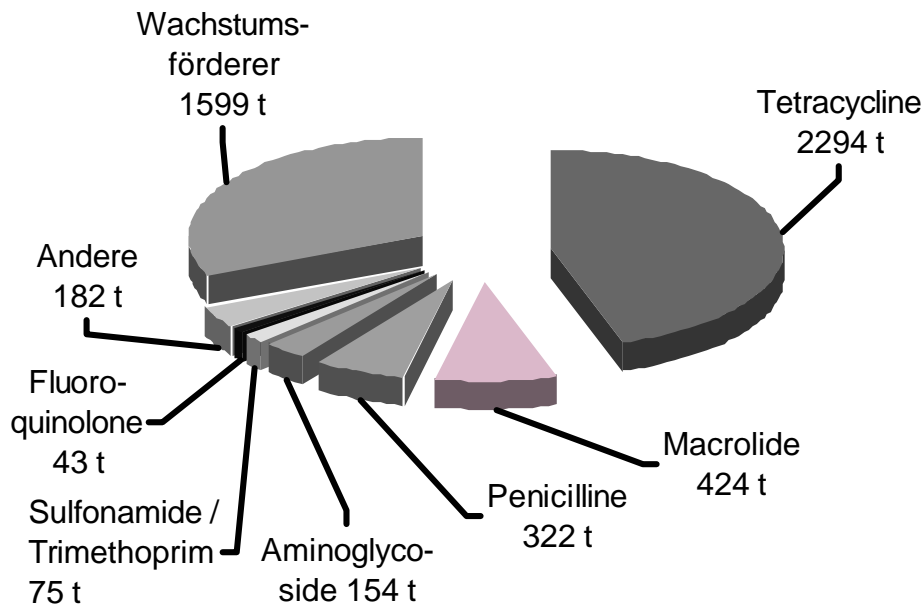
Im Gegensatz dazu sind jedoch alle Versuche, Metabolite analytisch nachzuweisen (- mit Ausnahme des Minocyclins und Doxycyclins -), erfolglos geblieben.

Im Falle des Minocyclins wurde die aromatische Hydroxylierung an Position 9 und die oxidative 4-N-Desmethylierung beschrieben [45, 46]. Für das Doxycyclin wurde bei Menschen und Mäusen die Bildung der 4-N-Desmethyl-derivate nachgewiesen [39-41]. Für Tetracyclin und Oxytetracyclin finden sich in den FAO-Reports [53-55] keine Hinweise für einen Metabolismus vor. Eisner und Wulf [56] fanden nach Medikation mit Chlortetracyclin bei Hunden im Hundeurin CTC und e-CTC. Sie dotierten Hundeurin mit Chlortetracyclin und erwärmten die Lösung bei 37°C für verschiedene Zeiträume. Nach 8 Stunden betrug die Epimerisierungsrate 14 % und nach 24 Stunden 26 %. Gleichzeitig änderte sich über den Zeitraum von 24 Stunden der pH-Wert des Hundeurins von pH 5,5 auf 6,8. Isochlortetracyclin wurde von ihnen bei einigen männlichen Hunden nur in geringer Konzentration im Hundefaeces nachgewiesen.

Aktuelle Arbeiten zum Metabolismus von Chlortetracyclin stammen von Kühne [57] und Kennedy [21, 58]. Kühne beschreibt die Epimerisierung von CTC, während Kennedy die Bildung von ICTC und e-ICTC bei Legehennen beschreibt.

## 1.7 Anwendung der Tetracycline in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin haben die Tetracycline mit großem Abstand zu anderen Arzneimitteln den größten Marktanteil [59] Abb. 7.



**Abb. 7 : Verbrauch von Antibiotika in der Tiermedizin im Jahre 1997. Nach den Angaben der Tierarzneimittelindustrie (FEDESA) in [59]**

Legehennen werden überwiegend so gehalten, daß die Produktion von Hühnereiern möglichst rentabel und kostengünstig ist. Der Einsatz von Tetracyclinen als Arzneimittel ist hierbei wahrscheinlich, da Tetracycline zu den preiswerten Arzneimitteln zählen. Tetracyclin und Oxytetracyclin werden dabei entweder über das Futter oder über das Trinkwasser verabreicht [60, 61]. Chlortetracyclin wird wegen seiner geringeren Löslichkeit nur über das Futter verabreicht. Tetracycline zählen zu den Antibiotika, die oral zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. Der Einsatz als Futterzusatzstoff ist in der EU verboten.

Als Breitbandantibiotika werden Tetracycline zur Bekämpfung vieler wichtiger Krankheitserreger eingesetzt. Sie wirken auf grampositive und gramnegative Kokken, die meisten anderen gramnegativen Bakterien, diverse grampositive Bakterien, Anaerobier, Sporenbazillen, Aktinomyzeten, Spirochäten, Leptospiren, Nocardia asteroides, Rickettsien und einige große Viren [62]. Einige wichtige Geflügelkrankheiten seien hier nur erwähnt [63]: Pullorumseuche (Erreger : Salmonella gallinarum-pullorum), Salmonellosen, Geflügelcholera (Pasteurella multocida), Coryza contagiosa (Haemophilus gallinarum und paragallinarum), Mykoplasmosen, Listeriose, Coliseptikämie, sowie Staphylokokken- und Streptokokken-Infektionen.

Die therapeutische Wirksamkeit bezieht sich auf einen speziellen Keim, gegen den therapiert werden soll. Entsprechend der „Good Veterinary Practice“ erstellt der Tierarzt vor der Behandlung ein Antibiotogramm und prüft auf Wirksamkeit des einzusetzenden Wirkstoffes sowie dessen Dosis. In speziellen Fachbüchern [60, 61] werden einheitlich für alle drei Tetracycline 70 bis 280 mg/kg Körpermasse pro Tag empfohlen. Für eine 1,5 kg schwere Henne und einen Tagesverzehr von 125 g Hühnerfutter ergibt sich eine Dosierung von 840 bis 3360 mg/kg Wirkstoff pro kg Futter. Die empfohlene Behandlungsdauer liegt bei 7 Tagen bei Behandlung über das Futter. Konzentrationen, die unterhalb dieser Angaben liegen, gelten als subtherapeutisch, sofern nicht gegen besonders empfindliche Keime behandelt wird. Bei Junghennen und Legehennen werden auch höhere Dosierungen empfohlen, da die im Futter enthaltenen hohen Ca-Konzentrationen die Resorption oder die mikrobiologische Aktivität der Tetracycline herabsetzen [61].

## 1.8 Rückstandsbildung von Arzneimitteln im Hühnerei und im Plasma

Über die Rückstandsbildung von Arzneistoffen im Hühnerei liegen bereits zahlreiche Untersuchungsergebnisse vor. Sie weisen unabhängig vom eingesetzten Wirkstoff Gemeinsamkeiten auf, die mit folgenden physiologischen Vorgängen bei der Eibildung erklärt werden können [64, 65, 66, 67, 68].:

- **Eidotterbildung und Wirkstoffeinlagerung bei Eidottern**

Alle Eizellen, die später zu Legeeiern werden, sind schon im Küken angelegt. Sie liegen im Eierstock als Follikel unterschiedlicher Größe vor, deren Wachstum bei einer Legehenne in drei Phasen erfolgt :

- Phase 1 : Weißfollikel-Phase. Sie dauert Monate oder Jahre.
- Phase 2 : Zwischenstadium. Sie dauert 60 Tage.
- Phase 3 : Follikel der letzten schnellen Wachstumsphase

In der letzten Wachstumsphase nimmt die Dottermenge innerhalb von 10 Tagen von 1 g bis zu 20 g zu. Die Proteine des Dotters werden in der Leber der Henne gebildet und gelangen über das Blut in den Eierstock. Ca. alle 24 Stunden verläßt ein Eigelb den Eierstock, und im Eierstock befinden sich gleichzeitig 10 heranreifende dotterhaltige Follikel. Bei mehrtägiger Behandlung erfolgt eine ständige Einlagerung von Rückständen in alle im Eierstock befindlichen dotterhaltigen Follikel. Einmal in die Follikel der letzten Wachstumsphase eingelagerte Arzneimittel werden nicht mehr rückresorbiert. Die Rückstände im Eigelb spiegeln die Plasma-Wirkstoffkonzentrationen der letzten 10 Tage wieder. Je nach Länge und Zeitdauer der Medikation können daher die Rückstände im Eigelb zu-, abnehmen oder konstant bleiben.

Aber auch während der Wachstumsphase 2 kann, wie Arnold und Somogyi mit Chloramphenicol zeigten, bereits eine Rückstandsbildung erfolgen [69].

Mit Absetzen der Arzneimittelbehandlung wird die Wirkstoffzufuhr unterbrochen, doch können in geringem Umfang Rückstände aus extra-ovariellen Speichergeweben (Leber, Fettgewebe) noch in Spuren in das Dotter gelangen. Die Rückstandskonzentrationen im Eigelb erreichen, graphisch aufgetragen, nach 8 bis 10 Tagen ein Plateau-Wert, d.h. die Rückstandskonzentrationen erreichen einen nahezu konstanten Werte-Bereich [64].

- **Eiklarbildung und Wirkstoffeinlagerung**

Das Eiklar wird innerhalb von 1 bis 2 Tagen von den Drüsenzellen des Eileiters gebildet. Dieser spezielle Bereich des Eileiters wird Magnum genannt. Die in den Drüsenzellen des Eileiters vorhandenen wasserlöslichen Proteine reichen maximal zur Umhüllung des Dotters mit Eiklar für zwei Eier.

Vom Lösen des Dotters aus dem Eierstock beim Follikelsprung bis zum Legen des fertigen Eies vergehen im Durchschnitt 20 bis 24 Stunden [68]. Die Umhüllung eines Eidotters mit Eiklar dauert 2 bis 3 Stunden. Die Bildung der Eischale benötigt 18 bis 20 Stunden. Einlagerungen im Eiklar sind daher frühestens im zweiten gelegten Ei nach Behandlungsbeginn zu erwarten [68].

Unter Berücksichtigung der Eibildung ergibt sich die Tatsache, daß eine Rückstandsbildung immer zuerst im Eiklar und dann erst im Eigelb beobachtet werden kann [65]. Eine Einzeldosis eines Arzneimittels kann dazu führen, daß der Wirkstoff aufgrund seiner chemischen Eigenschaft und aufgrund der verwendeten analytischen Methode entweder im Eigelb oder im Eiklar oder im Eigelb und im Eiklar nachgewiesen werden kann [65].

- **Verteilung der Rückstände im Plasma und im Ei von Legehennen**

Die Rückstandsbildung im Plasma korreliert mit der Rückstandsbildung im Eiklar. Arzneimittel, die schnell vom Körper eliminiert werden, sind auch innerhalb von 2 bis 3 Tagen nicht mehr im Eiklar nachweisbar [65]. In Eigelbproben lassen sich dagegen vom gleichen Wirkstoff noch 10 Tage nach Absetzen Rückstände nachweisen. Im Falle des Chloramphenicols wurde ein Ausscheidungszeitraum von 70 Tagen nach Medikation ermittelt [69].

Die Pharmakokinetik des Chlortetracyclins im Blut der Henne wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben [70, 71]. Die Arbeiten beschreiben, daß durch die gleichzeitige Verfütterung von Citronensäure bei Hühnern höhere Plasmawerte erreicht werden können.

Harms und Waldroup [72] beschreiben, daß die Oxytetracyclinkonzentration im Plasma der Hennen mit dem Legezyklus der Hennen korreliert. Die größte Abnahme



der Oxytetracyclinkonzentration im Plasma findet hierbei 6 bis 4 Stunden vor der Eiablage statt. Dieser Zeitabschnitt fällt mit der Bildung der Eischale zusammen. Lindgren et al. [73] und Bray und Ridlen [74] beschreiben die Einlagerung von Tetracyclinen in die Eischale.

Die Literatur zum Rückstands- und Ausscheidungsverhalten von Tetracyclinen (OTC, TC und CTC) bei Legehennen ist sehr umfangreich. Unterschiedliche analytische Verfahren, unterschiedliche Applikationsformen (über das Trinkwasser oder über das Futter), unterschiedliche Medikationsdauer und unterschiedliche Medikationskonzentrationen wurden gewählt und erschweren so die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. In Tab. 4 sind die Publikationen zusammengestellt, die über verschiedene Medikationsstudien mit den drei Tetracyclinen berichten. Die Studien von Kennedy et al. [58] und von De Ruyck et al. [75] wurden mit einer HPLC-Methode durchgeführt und berichten über Analysenergebnisse von Volleiprüben. Die anderen älteren Studien untersuchten Volleiprüben und zum Teil auch Eiklar- und Eigelbproben mit mikrobiologischen Methoden.

Eine sehr ausführliche Übersicht zur Ausscheidungskinetik bei Legehennen wird im FAO Food and Nutrition Paper [53 bis 55] - jeweils für Tetracyclin und Chlortetracyclin - beschrieben.

Über das Vorkommen von 4-Epimeren finden sich mit Ausnahme der Arbeit von Bergner-Lang und Mikisch [76] und Kennedy et al. [58] keine Hinweise in der Literatur. Über eine *in vivo* Bildung von N-Desmethyl-derivaten von OTC, TC oder ICTC wurde bislang ebenfalls noch nicht berichtet.

Übereinstimmend berichten Frye et al. [79], Pfaendler et al. [84], und Roudaut et al. [91], daß während und nach Fütterung von CTC eine äußerst geringe Konzentration an CTC oder kein CTC im Eiklar nachweisbar war. Das CTC unterscheidet sich in diesem Ergebnis von den anderen zwei Tetracyclinen OTC und TC deutlich. Eine weitere Besonderheit ist, daß das CTC in Volleiern überwiegend als ICTC vorliegt [21].

<b>Autor Jahr</b>	<b>Dosierung OTC</b>	<b>Dosierung TC</b>	<b>Dosierung CTC</b>	<b>Literatur</b>
Durbin 1953	-	-	50, 100, 200 2000, 10000 20000 ppm	[77]
Raica 1956	-	-	50, 100, 200 500, 1000, 2000 ppm	[78]
Frye 1958	-	-	125, 250, 500 750, 1000 ppm	[79]
Brüggemann 1963	-	-	50 ppm	[80]
Illés 1969	30, 300 ppm	-	-	[81]
Katz 1973	25 bis 400 ppm	-	50 bis 200 ppm	[82, 83]
Pfaendler 1973	-	-	300 ppm	[84]
Meredith 1965	1000 ppm	-	1000	[85]
Yoshida 1973	20 , 500, 1000 2000 ppm	-	30, 300, 8000 ppm Futter	[86, 87]
Anhalt 1976	0,5 g/l TW 1000 ppm 50 mg/kg Inj.	-	- -	[88]
Frieser 1986	0,5 g/l TW	0,5 g/l TW 125 mg/Tag	125 mg /Tag	[89]
Roudaut 1987 und 1989	0,1 bis 0,5 g/l TW	300, 600 ppm Futter	600 ppm	[90, 91]
Yoshimura 1991	0,5 g/l TW	-	-	[92]
Omija 1994	0,4 bis 0,8 g/l TW	-	-	[93]
Kennedy 1998	- -	- -	300, 450 ppm	[58]
De Ruyck 1999	840 ppm	-	-	[75]

k.A. = keine Angaben, TW = Trinkwasser, Inj. = Injektion, ppm = mg Wirkstoff/kg Futter

**Tab. 4: Übersicht über verschiedene Medikationsstudien mit den drei Tetracyclinen OTC, TC und CTC bei Legehennen**

## 1.9 Mögliche Gefahren durch Arzneimittelrückstände im Hühnerei für den Menschen

Eine Beurteilung der Gefahren kann unter toxikologischen, mikrobiologischen und immunopathologischen Aspekten vorgenommen werden [33].

Eine Gefährdung des Verbrauchers in toxikologischer Hinsicht muß durch Befolgung der Wartezeiten bei der Anwendung von Tierarzneimitteln, sowie durch die Einhaltung der Rückstandshöchstmengen vermieden werden [28].

Immunopathologische Wirkungen, d.h. allergische Nebenwirkungen, die nicht dosisabhängig sind, sind bei Tetracyclinen äußerst selten [94]. Über ein mögliches allergenes Gefahrenpotential, welches von Lebensmitteln mit Tetracyclin-Rückständen ausgeht, wurde bislang noch nicht berichtet.

Bereits vor 20 Jahren wurde die Resistenzausbreitung von Mikroorganismen diskutiert [95]. Insbesondere zur Resistenzbildung gegen Tetracycline liegt heute eine umfangreiche Literatur vor [26]. Durch den Verzehr von rückstandshaltigen Eiern kann eine Resistenzbildung beim Menschen ausgeschlossen werden, wenn die EU-MRL-Werte eingehalten werden. Bei Tierversuchen zeigte sich, daß die Resistenzentwicklung bei gleicher Dosis pro kg Körpergewicht tierartenbedingt unterschiedlich ist [64]. Durch den Einsatz von Tetracyclinen kann es bei Legehennen zu einer resistenten Darmflora kommen, welche auf direktem Weg, d.h. nicht über Lebensmittel, die Gefahr einer Resistenzausbreitung erhöhen kann.

Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft [64] und Fleischle [95] sehen die Ursache der Resistenzausbreitung vor allem in einer unsachgemäßen, d.h. ohne ärztliche Überwachung und vom medizinischen Standpunkt aus nicht gerechtfertigten Routine-Anwendung von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin, und weniger in Rückständen in den Lebensmitteln. Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft betont auch, daß unter Aufsicht eines Tierarztes durch den Einsatz von Arzneimitteln die Gefährdung des Menschen durch lebensmittelhygienisch bedenkliche Eier aus unbehandelten kranken Hennenbeständen ausgeschaltet wird [64].

## 1.10 Deutsche und Europäische rechtliche Regelungen zum Einsatz von pharmakologischen Stoffen bei der Gewinnung von Lebensmitteln

In Lebensmitteln tierischer Herkunft können während und für einen variablen Zeitraum nach der Medikation Rückstände nachgewiesen werden. Der § 4 des Fleischhygienegesetzes vom 8.7.1993 definiert Rückstände als „*Rückstände von Stoffen mit pharmakologischer Wirkung und deren Umwandlungsprodukte sowie von anderen Stoffen, die in Lebensmittel übergehen und gesundheitlich bedenklich sein können.*“ [96].

Mit Hilfe der sich ständig weiterentwickelnden modernen Analytik können immer niedrigere Konzentrationen erfaßt werden, so daß eine vollständige Rückstandsfreiheit nicht verlangt werden kann. Es stellt sich also die Frage, durch welche rechtlich verbindlichen und kontrollierbaren Bestimmungen eine Gesundheitsgefährdung ausgeschlossen werden kann.

Einen wesentlichen Beitrag zur Verhinderung von Gesundheitsgefährdungen durch pharmakologisch wirksame Substanzen leistet die rechtlich verbindliche Festsetzung von Wartezeiten und Rückstandshöchstmengen.

„Wartezeit“ wird im § 4 Abs. 12 des Arzneimittelgesetzes (AMG) als die Zeit definiert, innerhalb der bei bestimmungsgemäßer Anwendung von Arzneimitteln bei Tieren mit Rückständen nach Art und Menge nicht unbedenklicher Stoffe in tierischen Lebensmitteln gerechnet werden muß, einschließlich einer angemessenen Sicherheitsspanne [97].

Die EMEA hat hierzu im Dokument EMEA/CVMP/036/95 einen Vorschlag zur Harmonisierung von Wartezeiten innerhalb der EU herausgegeben [98]. Wartezeiten werden hier bestimmt durch den Zeitpunkt, nach dem die Rückstände innerhalb eines statistischen Vertrauensintervalls unterhalb des MRL-Wertes liegen. Die Bestimmung der Wartezeiten beruht auf einem statistischen Konzept, welches in diesem Dokument ausführlich erläutert wird. Über dieses Konzept soll zukünftig verhindert werden, daß für das gleiche Tierarzneimittel unterschiedliche Wartezeiten in den einzelnen Staaten der EU festgelegt werden.

Die Höchstmengen für Tetracycline sind in Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 für Eier und andere Lebensmittel aufgeführt [1]. Für Eier sind die drei Tetracycline OTC, TC und CTC und ihre 4-Epimere jeweils in einer Konzentration von 200 µg/kg zugelassen. Doxycyclin ist zur Medikation von Geflügel zugelassen, allerdings nicht bei Tieren, von denen Eier für den menschlichen Verzehr gewonnen werden.

Gemäß § 15 Abs. 1 LMBG [99] bedeuten Überschreitungen der MRL-Werte die Nicht-Verkehrsfähigkeit des Lebensmittels und haben in Verbindung mit § 51 Abs. 1a LMBG strafrechtliche Konsequenzen für diejenigen, die das Lebensmittel in Verkehr gebracht haben. Die Grundlage der systematischen Überwachung im Binnenmarkt und somit auch der nationalen Rückstandskontrollpläne stellt die EU-Richtlinie 96/23/EWG dar [100], sie umfaßt auch die Matrices Milch, Eier und Honig neben Fleisch von Schlachttieren. Die Regelung der Richtlinie [100], die Eier betreffen, wurde vom Gesetzgeber in § 1 a der Hühnererei-VO (vom 5.7.1994) [101] in nationales Recht mit dem Wortlaut umgesetzt : *„Hühnereier sind von der zuständigen Behörde auf Rückstände verbotener oder nicht zugelassener Stoffe oder sonstige Rückstände oder Gehalte von Stoffen, die festgesetzte Höchstmengen oder Werte überschreiten, die nach wissenschaftlichen Erkenntnissen gesundheitlich unbedenklich sind, zu untersuchen.“*

---

Der Hersteller von Eiprodukten wird vom Gesetzgeber ebenfalls verpflichtet, betriebseigene Kontrollen auf Rückstände durchzuführen und Nachweise darüber zu führen. Dieser Sachverhalt wird in § 9 der Eiprodukte-VO vom 17.12.1993 geregelt [102]. Eine Nichtbeachtung des § 9 Eiprodukte-VO wird als Ordnungswidrigkeit im Sinne des § 54 Abs. 1 Nr. 2a LMBG geahndet.

## 2 Analytik der Tetracycline

Zur quantitativen Bestimmung der Tetracycline (OTC, TC, CTC) werden je nach den Anforderungen an die Spezifität und Leistungsfähigkeit des Analysenverfahrens sehr unterschiedliche Methoden vorgeschlagen. Thematische Schwerpunkte der Tetracyclinanalytik sind häufig der Nachweis in biologischen Flüssigkeiten sowie in Arzneimitteln die selektive Bestimmung von Tetracyclinen neben möglichen Syntheseverunreinigungen und Umwandlungsprodukten.

Aufgrund der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Verfahren, wird die folgende Übersicht auf die Tetracyclinanalytik beschränkt, die für die Quantifizierung von Tetracyclinrückständen in den Matrices Vollei, Eigelb, Eiklar und Plasma beschrieben worden ist, und mit denen die in der Literatur publizierten Rückstandskonzentrationen nach Medikationsversuchen bei Legehennen mit Tetracyclinen erhalten wurden. Ein umfangreicher Übersichtsartikel zur Tetracyclinanalytik in biologischen Matrices wurde von Barker und Walker publiziert [103].

### 2.1 Nachweis in biologischen Matrices

Zu den Standardmethoden der Gehaltsbestimmung von Tetracyclinen in biologischen Matrices zählen mikrobiologische Verfahren. Zunächst sind die Screening-Methoden zu nennen, die einen breiten Einsatz in der Analytik von Milch finden, und mit deren Hilfe eine schnelle Voruntersuchung auf hemmstoffpositive Proben möglich ist [103]. Anschließend erfolgt der Einsatz spezifischer Bestimmungsverfahren zur Quantifizierung und Identifizierung der verschiedenen Hemmstoffe. Der in der Lebensmitteluntersuchung sinnvolle Einsatz einer Screeningmethode war für die vorliegende Arbeit überflüssig, da die Anwesenheit von Hemmstoffen in dem Probenmaterial genau bekannt war. Mit den in der Literatur beschriebenen Hemmstofftests wie z.B. dem STOP-Test u.a. [103] können nur mikrobiologisch aktive Substanzen bestimmt werden.

### 2.2 Mikrobiologische Verfahren

Für die Untersuchung mit mikrobiologischen Analyseverfahren auf Tetracyclinrückstände in Eiprüben wurde das von Kramer et al. [104] entwickelte, sowie von Katz und Fassbender [105] und Nogawa et al. [106] modifizierte mikrobiologische Verfahren bei vielen Studien [82, 83, 90, 91, 92] verwendet. Die Eigelb- und Eiklarproben werden mit einem Kalium-Phosphat-Puffer verdünnt, auf pH 4,5 eingestellt und homogenisiert. Die Proben werden zentrifugiert und der Überstand wird zur Analyse eingesetzt. Die Petrischalen enthalten einen kommerziell erhältlichen Agar pH 5,9, in dem sich Sporen von *Bacillus cereus* var. *mycoides*

ATCC 11778 befinden. Auf jeder Petrischale werden insgesamt 17 Bestimmungen durchgeführt, indem 17 Zylinder auf die Petrischale gestellt werden. Auf die Zylinder werden 200 µl Lösung aufgebracht, wobei 8 Zylinder für eine Probe genutzt werden, weitere 8 Zylinder für 4 Standards in einer Doppelbestimmung und ein Zylinder für eine Kontrollprobe (tetracyclinfreie Lösung) genutzt wird. Die Tab. 5 gibt die für die Matrices Eigelb und Eiklar ermittelten Nachweisgrenzen wieder und zeigt, daß die mikrobiologische Methode besonders empfindlich CTC-Rückstände bestimmen kann. Für die Analytik von OTC in Volleiprüben geben Katz und Fassbender [105] eine Nachweisgrenze von 80 µg/kg und eine Bestimmungsgrenze von 100 µg/kg an.

Für die anderen Tetracycline in Volleiprüben waren der Literatur keine Werte zur Nachweis- oder Bestimmungsgrenze zu entnehmen.

Analyt	Nachweisgrenze µg/kg		Lit.
	Eigelb	Eiklar	
OTC	200	70	[90]
TC	150	70	[91]
CTC	60	10	[91]
DOX	150	40	[92]

*Tab. 5 : Nachweisgrenzen mikrobiologischer Verfahren.*

In der Tetracyclinanalytik mit einem mikrobiologischen Verfahren werden aufgrund der recht hohen Nachweisgrenze Probenaufarbeitungsschritte, die einen Konzentrierungsschritt an einen Festphasenmaterial (Polymermaterial) beinhaltet, der eigentlichen mikrobiologischen Methode vorgeschaltet. Durch diesen manuellen Arbeitsschritt werden niedrige Nachweisgrenzen von 5 µg/kg erreicht, allerdings fallen die typischen Vorteile des mikrobiologischen Verfahrens weg [89, 107]. Nachteilig bei mikrobiologischen Verfahren bleibt die Tatsache, daß man den antibiotisch wirksamen Stoff nicht identifizieren kann und daß bei Tetracyclinen die 4-Epimere nicht erfaßt werden.

### 2.3 Chemisch-physikalische Verfahren

Alternativ zu den mikrobiologischen Verfahren werden in der Literatur fluorimetrische Methoden beschrieben, die die Bildung von fluoreszierenden Derivaten unter alkalischen oder sauren Bedingungen oder die Fluoreszenz der drei Tetracycline mit bestimmten Kationen ausnutzen und eine gegenüber anderen Hemmstoffen selektivere Quantifizierung eines Tetracyclins ermöglichen [108].

Das erste Verfahren für CTC wurde bereits 1949 von Levine et al. [109] beschrieben. Diese Autoren nutzten bereits die Bildung von Isochlortetracyclin, um selektiv CTC zu bestimmen.

Andere fluorimetrischen Methoden nutzen die Bildung von fluoreszierenden Anhydroverbindungen oder Isomeren der drei Tetracycline OTC, TC und CTC [110 - 115]. Die drei Tetracycline selbst weisen nur eine schwache Eigenfluoreszenz auf [12], die mit Kationen allerdings verstärkt werden kann [13]. Die Tetracycline bilden mit zwei- oder dreiwertigen Kationen Komplexe, hierbei erhöht sich die Quantenausbeute der Fluoreszenz beträchtlich [108]. Eine weitere Steigerung der Fluoreszenz kann durch die Extraktion der Tetracycline in organische Lösungsmittel erreicht werden [116]. Bei der Methode nach Poiger und Schlatter [116] werden alle drei klassischen Tetracycline bestimmt, indem die Tetracycline als Ionenpaare mit Calcium und Trichloressigsäure in Ethylacetat überführt werden [116]. Die Fluoreszenz der verschiedenen Tetracycline (OTC, TC, CTC) wird anschließend nach Zugabe von Magnesiumionen, dem Mononatriumsalz der 5,5-Diethylbarbitursäure und konzentriertem Ammoniak pH 9,5 bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm gemessen. Zwischen den verschiedenen Tetracyclinen (OTC, TC, CTC) kann bei dieser Methode nicht unterschieden werden. Die Methode wurde bei mehreren Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Tetracyclinen im Blut von Legehennen durchgeführt [70-72]. Die Nachweisgrenze beträgt 50 µg/l Plasma. Der Vorteil der fluorimetrischen Methode liegt in ihrer Spezifität und ihrer kurzen Versuchsdauer von ca. 4-5 Stunden.

## 2.4 Andere qualitative und quantitative Methoden

Neben den fluorimetrischen und mikrobiologischen Methoden wurden eine Vielzahl anderer Methoden eingesetzt, die hier nur kurz erwähnt werden. Auf HPLC-Methoden wird im Kapitel 2.5 eingegangen.

Zur pharmazeutischen Reinheitsbestimmung wurden die ersten chromatographischen Arbeiten veröffentlicht. Hierzu wurden seit den 50er Jahren viele Arbeiten über Papier- und Dünnschichtchromatographie veröffentlicht. Ebenfalls zur pharmazeutischen Reinheitsbestimmung von Tetracyclinpräparaten wurde auch eine gaschromatographische Methode von Tsuyi und Robertson publiziert [117], bei der die Tetracycline als Trimethylsilylderivate bestimmt werden. Die Analytik der drei Tetracycline mittels Gaschromatographie hat allerdings in der Rückstandsanalytik keine Anwendung gefunden.

Ebenfalls zur pharmazeutischen Reinheitsbestimmung von Tetracyclinen sind seit Anfang der 90er Jahre eine Vielzahl kapillarelektrophoretischer Methoden [118 - 123] und mizellarelektrokinetischer Chromatographie [124] veröffentlicht worden.

Chen und Gu [125] veröffentlichten 1995 eine kapillarelektrophoretische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinrückständen in Milch, Serum und Urin mit einer Nachweisgrenze von 1,3 bis 5,3 ng/ml. Die Methode erfordert allerdings die von Farrington et al. [126] entwickelte und die von Carson [127] modifizierte off-line Probenaufarbeitung.



## 2.5 HPLC und Probenvorbereitung aus biologischen Matrices

Im Vordergrund dieser Übersicht stehen publizierte HPLC-Methoden für die biologischen Matrices Plasma, Vollei, Eigelb, Eiklar und Futtermittel.

### 2.5.1 Off-line Probenaufarbeitung

Seit Ende der 70er Jahre werden Publikationen über die Analytik von Tetracyclinrückständen mittels HPLC veröffentlicht. Die meisten Veröffentlichungen, die sich mit der Analytik in biologischen Matrices beschäftigen, beschreiben Methoden zum Nachweis der drei Tetracycline (OTC, TC, CTC) in tierischen Lebensmitteln wie Fleisch und Innereien sowie Milch, Eiern und Honig. Weiterhin wurde humanes und tierisches Plasma, Blut, Urin und Futtermittel auf Tetracycline (OTC, TC, CTC) untersucht.

Der Bestimmung von Tetracyclinrückständen aus biologischen Proben mittels HPLC geht eine Probenaufarbeitung voraus, diese wird im folgenden beschrieben :

- **Extraktion aus Eiprobe**

Für die Extraktion aus Eiprobe gibt es zur Probenaufarbeitung verschiedene Verfahren :

- **Probenaufarbeitung mit einer flüssig-flüssig Verteilung**

Eine flüssig-flüssig Extraktion von Tetracyclinen aus Hühnereiern wurde von Botsoglou et al. [128] beschrieben. Dieses Verfahren entspricht weitestgehend dem Verfahren von Sharma und Bevil [129], welches für Plasma, Urin und Gewebeprobe entwickelt wurde. Zu dem homogenisiertem Vollei werden nacheinander eine Calciumchloridlösung, eine Natriumbarbitallösung, eine Natriumphanylbutazonlösung und eine Dichlormethanolösung gegeben. Die Mischung wird geschüttelt und dann zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen, wovon die unterste organische Phase die Tetracycline enthält. Hierbei bildet sich ein Tetracyclin-Calcium-Komplex, der mit Phenylbutazon als Ionenpaarreagenz in Dichlormethan löslich ist. Die isolierte organische Phase wird filtriert und das Lösungsmittel Dichlormethan wird anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Zum viskosen Rückstand werden 6 ml Dichlormethan und 0,5 ml einer 1 N Phosphorsäure zugegeben. Die Mischung wird geschüttelt und zentrifugiert. Die obere wässrig-saure Phase enthält die Tetracycline und ein Aliquot von 50 µl wird zur HPLC-Bestimmung eingesetzt. Die Wiederfindung liegt bei allen drei Tetracyclinen bei 100 %. Die

Nachweisgrenzen betragen 16 µg/kg für TC, 50 µg/kg für OTC und 80 µg/kg für CTC.

Eine weitere flüssig-flüssig Extraktionsmethode für Tetracyclinrückstände in Vollei wurde von De Ruyck [75] beschrieben. Homogenisiertes Vollei wird mit 1 N HCl-Lösung gemischt und deproteiniert. Die Mischung wird mit Acetonitril versetzt, geschüttelt und stehengelassen. Es bildet sich ein Bodensatz, der abfiltriert wird, und nochmal mit Acetonitril extrahiert wird. Das Filtrat wird nun mit Dichlormethan und Petrolether in einem Schütteltrichter versetzt, intensiv geschüttelt und stehengelassen. Es bilden sich zwei Phasen. Die untere Phase enthält die Tetracycline und wird mit einem Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird in 0,01 mol/l HCl gelöst, filtriert und ist bereit für die HPLC-Analytik. Die Wiederfindungen für die vier Tetracycline OTC, TC, CTC und DC liegen zwischen 84 und 54 % in Vollei. Die Nachweisgrenze für OTC ist 2,2 µg/kg und die Bestimmungsgrenze 13 µg/kg.

- **Probenaufarbeitung mit einer Festphasenextraktion**

Chan und Salisbury [130] modifizierten eine Tetracyclin-Methode von Oka et al. [131]. Bei ihrer Methode werden die Eiprobe mit McIlvaine Puffer verdünnt und mit Natriumwolframat und Schwefelsäure deproteiniert. Der Niederschlag wird dreimal mit McIlvaine-Puffer extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden anschließend an einer C18 Festphasenextraktionssäule aufgereinigt. Vor der Elution mit einer 0,01 mol/l Oxalsäure in Methanol wird die Festphasenextraktionssäule mit Wasser gewaschen. Ein Aliquot des Eluats wird dann zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Eine weitere Aufarbeitungsmethode zur Extraktion von Tetracyclinen aus Hühnereiern stammte aus der Arbeitsgruppe von Blanchflower et al. [132]. Die Volleiprobe wurden mit einer Lösung verdünnt, die 0,1 mol/l Glycin und 1 mol/l HCl enthielt. Die Analyten wurden dann aus der verdünnten Probe-lösung an einer Bond-Elut 3 ml (Cyclohexyl-Kartuschen) aufkonzentriert und aufgereinigt.

Die zur Zeit in Deutschland gebräuchlichste off-line Methode ist die Methode nach Farrington [126] (1992), die von Klein et al. [133-134] modifiziert wurde und in Ringversuchen geprüft wurde. Das BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) hat die Methode ebenfalls veröffentlicht [135]. Bei dieser Methode wird das Probenmaterial mit einer Pufferlösung verdünnt und dann zentrifugiert. Die Tetracycline (OTC,

TC, CTC) werden aus dem tetracyclinhaltigen Überstand des Zentrifugates an einer mit Kupferionen beladenen Affinitätssäule extrahiert und dabei von Matrixbestandteilen befreit. Die Elution erfolgt, indem der Kupfer-Tetracyclin-komplex mit einem EDTA-Succinatpuffer zerstört wird. Aus dem nun erhaltenen Gemisch aus Tetracyclinen, Kupferionen, EDTA und noch vorhandener Probenmatrix wird das Tetracyclin an einer C18-Festphasenkartusche extrahiert und dadurch von den Begleitsubstanzen, die nicht an dem Sorbens retiniert werden, befreit. Mit einer methanolischen Oxalsäure-Lösung werden die Tetracycline von der Festphasenkartusche eluiert und anschließend wird ein Aliquot für die HPLC-Bestimmung mit UV-Detektion verwendet. Bei Verwendung eines Diodenarray-Detektors wird vor der HPLC Bestimmung der Extrakt eingeengt. Eine sehr verwandte Methode wurde vom BgVV für die Analytik von Tetracyclinrückständen in Eiern beschrieben [135]. Für die Matrix Vollei wird eine absolute Wiederfindung von 40 bis 50 % erreicht. Die aufwendige Probenaufarbeitung erfordert eine geübte Laborkraft und ermöglicht die Analyse von 6 bis 8 Proben täglich. Der weitgehende Verzicht auf organische Lösungsmittel ist ein wichtiger Pluspunkt des Verfahrens.

Cooper et al. [136] entwickelten auf der Basis der Methode von Farrington ein automatisiertes on-line Verfahren, welches bei der Analyse von Tetracyclinen in Vollei durch eine off-line Probenaufarbeitung ergänzt wurde. Die off-line Probenaufreinigung beruht auf einer flüssig-flüssig Verteilung, während die on-line Probenaufarbeitung eine Festphasenextraktion umfaßt. Ausgehend von homogenisiertem Vollei wird das Vollei mit einem 1 mol/l Citratpuffer pH 4 und Ethylacetat verdünnt, 15 Minuten geschüttelt und dann für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und der Rückstand wird zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Lösungen werden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und danach filtriert. Das Filtrat wird eingedampft und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Die Lösung wird erneut filtriert und die automatisierte on-line Probenaufarbeitung mit einer Metall-Chelat-Affinitätssäule beginnt. Durch die zeitversetzte off-line und on-line Probenaufarbeitung können täglich 28 Analysen durchgeführt werden. Die Wiederfindungen liegen für die drei Tetracycline OTC, TC und CTC zwischen 104 % und 59 % bei Volleiprobe.

- **Extraktion aus Plasmaproben**

Sharma und Bevil [129] nutzen eine Flüssig-Flüssig-Verteilung zur Extraktion und Bestimmung von Tetracyclinen in Plasma. Dieses Verfahren wurde später von Botsoglou et al. [128] für Eiprobe modifiziert. Für Schweineplasma erhalten Sharma

und Bevilacqua eine Wiederfindung von 100 % und eine Nachweisgrenze von 500 bis 700 µg/kg für die drei Tetracycline in Plasma. Bei vergleichbaren Wiederfindungen und Nachweisgrenzen erweiterten Kondo et al. [137] die Bestimmung auf mehrere Tetracycline in Rinderplasma.

Tyczkowska und Aronson [138] entwickelten ein Probenaufreinigungsverfahren, bei dem die Plasmaprobe mit dem HPLC-Fließmittel verdünnt wird. Die Tetracycline werden anschließend durch eine Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kD von größeren Matrixbestandteilen befreit, indem das Gemisch in Zentrifugenröhrchen gefüllt wird, die eine Membran enthalten. Die kleineren Matrixbestandteile, die sich im Filtrat befinden, werden durch die chromatographische Trennung von den Analyten getrennt.

Eine vereinfachte Aufarbeitung von Plasmaproben beschreibt Hermansson [139]. Bei dieser Methode wird zur Plasmaprobe Acetonitril, Perchlorsäure und Trifluoressigsäure zugesetzt und dann zentrifugiert. Der Überstand wird nach Filtration zur HPLC-Analyse eingesetzt. Die Wiederfindung von TC in Plasma betragen 70 %, d.h. 50 µg Wirkstoff pro kg Plasma können mit dieser Methode nachgewiesen werden.

Iwaki et al. [13] modifizierten die Methode von Hermansson, indem sie auf den Einsatz von Perchlorsäure verzichteten und stattdessen eine Ca-EDTA-Lösung dem Plasma zusetzten. Die Wiederfindungen dieser Methode lagen bei 100 % für OTC, TC und CTC. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 10 und 35 µg/kg Plasma bei den drei Tetracyclinen. Die Detektion wurde mittels fluoreszierender Calcium-Tetracyclin-Komplexe bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emission bei 512 nm durchgeführt.

- **Extraktion aus Futterproben**

Zur Tetracyclinanalytik aus Futterproben mittels HPLC sind mehrere Publikationen erschienen. Die erste Methode, die eine simultane Bestimmung von OTC, TC und CTC erlaubt, stammt von Martinez und Shimoda [140, 141]. Bei dieser Methode wird das Futter mit einer Pufferlösung pH 2,0 extrahiert und anschließend filtriert. Um zu überprüfen, ob damit die Probenaufarbeitung ausreicht, wird ein Testchromatogramm erhalten. Falls bei dem Testchromatogramm noch zu viele Matrixstörungen zu beobachten sind, wird die Reinigung des Filtrates über eine Sephadex LH-20 Säule empfohlen. Je nach Futterart und Tetracyclin erhielten Martinez und Shimoda verschiedene Wiederfindungen, die zwischen 22 % und 100 % betragen können. Die Nachweisgrenze betrug 40 µg/kg jeweils pro Tetracyclin.

Eine andere Extraktionslösung nutzten Holland et al. [142] zur Extraktion von CTC aus Futter im Konzentrationsbereich von 10 bis 100 ppm. Sie nutzten eine Mischung aus 4 mol/l HCl, Aceton, Wasser im Volumenverhältnis 1 + 8 + 6, v + v + v. Hierbei wird das Futter 45 Minuten lang extrahiert, anschließend filtriert. Das Filtrat wird dann zur Analyse eingesetzt. Falls eine zusätzliche Reinigung erforderlich sein sollte, empfehlen sie die Aufreinigung an einer C18 Extraktionsfestphase. Für CTC in Futterproben erhielten sie eine Wiederfindung von 77 % .

Kennedy et al. [58] verwendeten als Extraktionslösung ein Lösungsgemisch aus Methanol und Salzsäure im Volumenverhältnis von 98 + 2. Nach einer einstündigen Extraktion auf einer Schüttelmaschine wird die überstehende Lösung nur noch mit Methanol und dem HPLC-Fließmittel verdünnt. Die Wiederfindung betrug 64 bis 70 %.

## 2.5.2 Automatisierte On-line Probenaufarbeitung

Die Automatisierung einer HPLC-Methode beinhaltet Vorteile und Nachteile. Die folgende Tab. 6 gibt eine kurze Übersicht.

Pro	Contra
hoher Probendurchsatz	Systemimplementierung
hohe Reproduzierbarkeit	Defektanfälligkeit
aliquotfreies Arbeiten	Störungssuche
GLP-Konformität	kleine Probenzahlen
Verringerung des Verbrauchs an organischen Lösungsmitteln	Instabilität Probe / Analyt
24-Stundenbetrieb	Geräteinvestition

**Tab. 6 : Vor- und Nachteile der Automatisierung**

Die automatisierte Probenvorbereitung wird gegenwärtig immer populärer und kann in der Kombination mit der LC-MS-MS an Bedeutung gewinnen. Die Entwicklung der LC-MS-MS geht hier mit einem günstig erscheinenden Zeitfaktor und einer selektiven Detektion ohne Derivatisierung einher. Als Techniken der automatisierten Probenvorbereitung, die schwerpunktmäßig eine Vereinfachung der Festphasenextraktion (SPE) beinhalten, sind Probenprozessoren, Roboter und Säulenschalt-Techniken (column switching) am gebräuchlichsten [143]. Viele automatisierte Methoden beinhalten eine Säulenschaltung und eine manuelle off-line Probenaufarbeitung. Andere automatisierte Methoden umfassen die on-line Kopplung von Probenaufarbeitung, Analyt-Anreicherung (trace enrichment) sowie eine multidimensionale LC. Bei einer on-line Probenaufarbeitung und dem „trace enrichment“

wird die Probe auf eine kleine Säule injiziert und durch Waschen dieser Säule der Hauptteil der Matrixbestandteile in den Abfall eluiert, während die Analyten vom Sorbens reteniert werden. Im nächsten Schritt wird die Festphasenkartusche mit einer Waschlösung matrixfrei gewaschen. Danach werden die retenierten Analyten mit einem Lösungsmittel von der Festphasenkartusche eluiert [144, 145].

In der Literatur finden sich heute für verschiedene Analyten in unterschiedlichen Matrices viele automatisierte HPLC-Bestimmungsmethoden. Der Vorteil dieser Methoden besteht darin, daß man gegenüber herkömmlichen Verfahren nur noch einen vereinfachten und zeitlich kürzeren off-line Probenaufreinigungsschritt durchführen muß. Durch diese Vorgehensweise kann man gegenüber klassischen off-line Verfahren hohe Analysenzahlen pro Tag erreichen [143].

### **2.5.3 Automatisierte Rückstandsanalytik von Tetracyclinen**

Zur automatisierten Analytik von Tetracyclinen (OTC, TC, CTC) werden in der Literatur nur drei Methoden beschrieben. Eine Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen in Milch erfolgt mit einer automatischen Festphasenextraktion als Probenaufarbeitung und einer anschließenden Aufgabe auf die analytische Säule. Diese Methode entspricht im Prinzip einer automatisierten Oka-Methode [131] und wird bei Milchproben angewandt. Die apparative und kommerziell erhältliche Ausführung dieser voll-automatisierten Methode für Milchproben wurde hierbei von der Firma Spark Holland mit dem PROSPEKT System (Programmable On-line Solid Phase Extraction Technique) verwirklicht [146].

Eine weitere semi-automatisierte Methode wird von Cooper et al. [136] und von Stubbings et al. [147] beschrieben und nutzt das Prinzip einer Metall-Chelat-Affinitäts-Chromatographie nach Farrington et al. [126]. Mit einem off-line Probenaufarbeitungsschritt wird das Probenmaterial mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wird anschließend zur Trockene eingedampft und in Methanol aufgenommen, dann mittels des automatisierten Systems weiter von Matrixbestandteilen befreit und schließlich in die HPLC injiziert. Mit dieser semi-automatisierten Methode werden unterschiedliche Matrices wie Ei, Fisch und Wildbret analysiert.

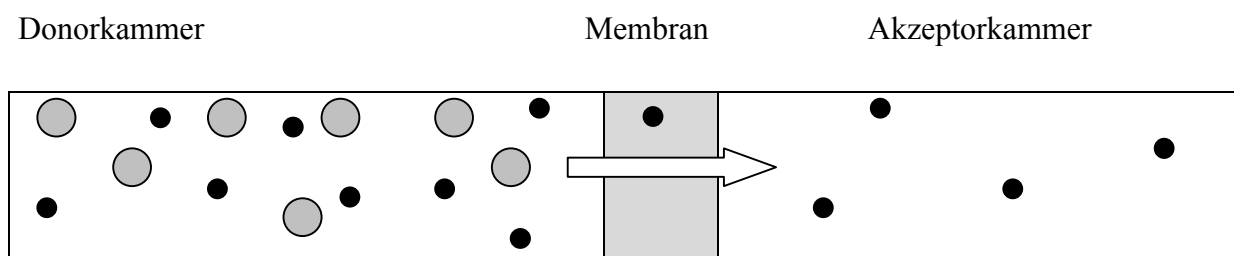
Eine andere in der Literatur beschriebene Methode erfolgt mit dem ASTED-System. ASTED steht hier für „Automated Sample Trace Enrichment of Dialysates“. Mit diesem System wurde auch die vollautomatische Analyse von Volleproben beschrieben [148 – 153]. Die Tab. 7 faßt die Arbeiten auf dem Gebiet der Rückstandsanalytik mit dem on-line Dialyse-System zusammen.

Rückstandsanalytik mit dem ASTED-System		
Wirkstoff	Autor / Jahr	Literatur
Sulfonamide Chloramphenicol	Aerts, Beek und Brinkman (1988)	[148]
Amprolium	van Leeuwen und van Gend (1988)	[150]
Nitrofurane	Aerts und Beek (1990) Oeser und Petz (1996)	[149] [152, 153]
Oxytetracyclin	Agasøster (1992) Agasøster und Rasmussen (1991)	[151] [158, 159]
Aflatoxin M1	Tuinstra et al. (1989)	[154]
Oxolinsäure, Flumequine	Andresen und Rasmussen (1990) Agasøster (1991) Eng et al. (1998)	[155] [156] [157]
Amoxicillin Cefadroxil	Snippe et al. (1994)	[160]
Sarafloxacin	Maxwell et al. (1999)	[161]

**Tab. 7 : Rückstandsanalytik mit dem ASTED-System**

Nach der off-line Probenvorbereitung, die sich je nach Matrix oft auf einen manuellen Verdünnungsschritt beschränken kann, beginnt die automatisierte Probenaufarbeitung mit einer on-line durchgeführten Dialyse.

Grundprinzip aller on-line Dialyse-Verfahren ist die Abtrennung von niedermolekularen Analyten von makromolekularen Matrixbestandteilen durch eine Dialyse. Die treibende Kraft eines jeden Dialysevorgangs ist der Konzentrationsunterschied zwischen Donor- und Akzeptorlösung [162], siehe Abb. 8.



**Abb. 8: Modell der Dialyse : Diffusion der Analyten ● durch eine Membran. Höhermolekulare Matrixbestandteile ● verbleiben in der Donorkammer. Die treibende Kraft ist der Konzentrationsgradient zwischen Donor- und Akzeptorkammer (markiert durch den Pfeil) [162].**

Durch den Vorgang der Dialyse wird ein analythaltiges Dialysatvolumen erhalten, welches das Probevolumen um das 8- bis 10-fache übersteigt. Die Abtrennung höhermolekularer Inhaltsstoffe aus der Matrix erfolgt mit einer Membran Cut-off 15.000 Dalton. Bei einer recht kurzen Dialysezeit (< 10 Minuten) gelangen nur Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 2000 Dalton ins Dialysat. Im Dialysat befinden sich kleinere Matrix-Moleküle mit einem Molekulargewichtsbereich bis zu ca. 2000 Dalton [163].

Das Dialysat wird wegen der dialysebedingten Verdünnung anschließend an einer kleinen Säule aufkonzentriert. Dabei findet gleichzeitig noch ein Nachreinigungsschritt statt, indem bestimmte Matrixbestandteile sich aufgrund ihrer Polarität einer Anreicherung entziehen. Die angereicherten Analyten werden im nächsten Schritt auf die analytische Säule eluiert und dort chromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt je nach Analyt per UV- oder Fluoreszenz-Detektion. Das kommerziell erhältliche Gesamtsystem der Firma Gilson, modifiziert von Oeser [153], ist in Abb. 9 dargestellt.

Die Analyse einer Probe läßt sich in fünf Schritte gliedern :

1. Probenvorbehandlung (erfolgt off-line) : Probe wird verdünnt, Analyt und Matrix werden stabilisiert

Die Schritte 2 bis 5 laufen automatisiert on-line ab :

2. Dialyse der Probe : Extraktion der Analyten aus der Matrix

3. Anreicherung : Das analythaltige Dialysat wird an einer kleinen Festphaseneinheit aufkonzentriert.

4. Transfer auf die analytische Säule und chromatographische Trennung der Analyten

5. Detektion der Analyten



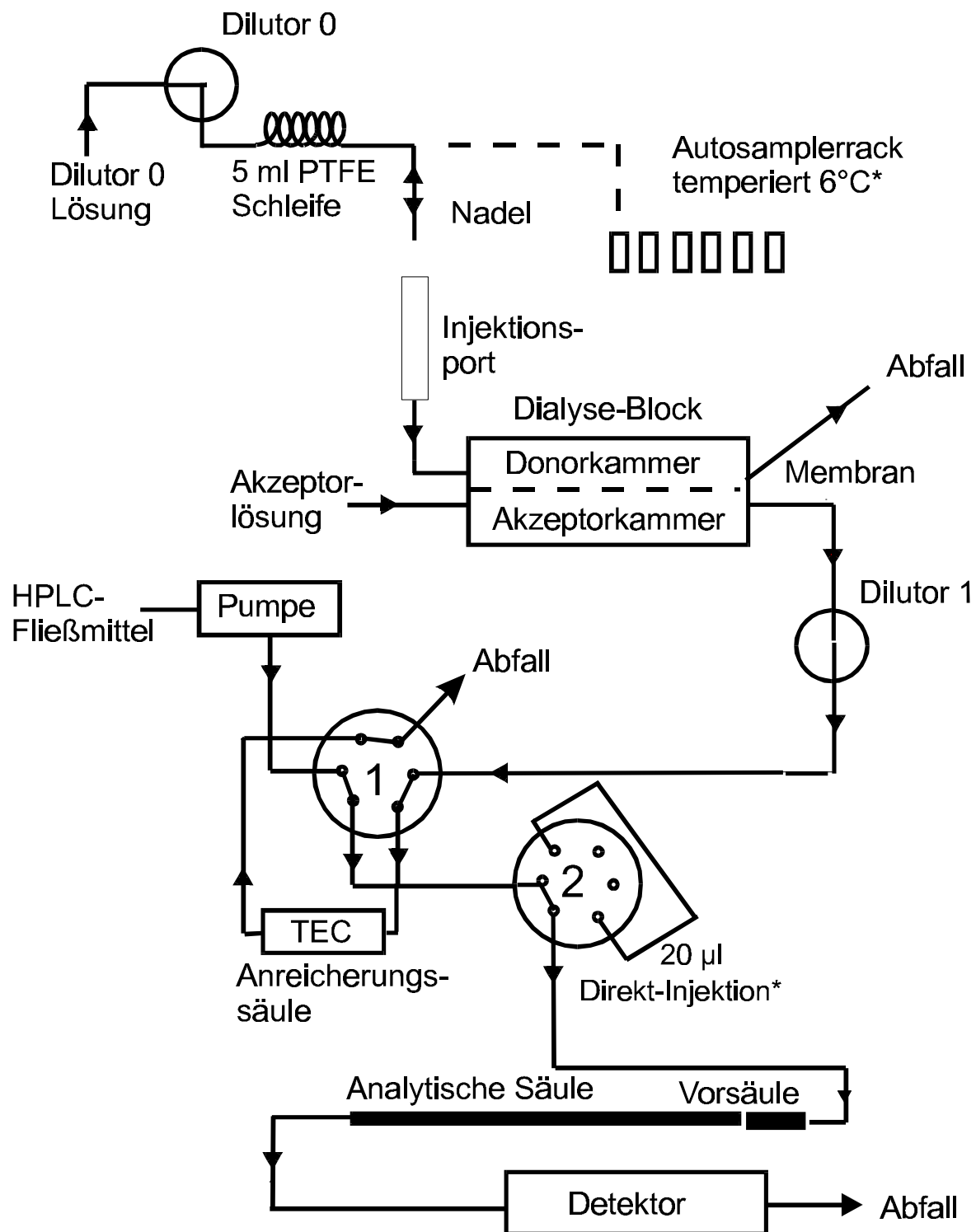


Abb. 9 : Das ASTED®-System mit zwei Modifikationen nach Oeser\*. Die Modifikationen bestehen in der Option das Probenrack zu kühlen und manuelle Injektionen durchzuführen [153].

Das Verfahren wird im folgenden mit bestimmten Begriffen erklärt, die im Anhang 12.7 erläutert werden. Die Geräteteile und Lösungen wurden mit den Begriffen belegt, um Verwechslungen zu vermeiden. Die Begriffe sind so gewählt, daß sie sich in Verbindung mit Abb. 9 und Abb. 10 (S.41) selbst erläutern können.

### 2.5.4 Chromatographie

Als stationäre Phasen werden üblicherweise Umkehrphasen (RP-8, RP-18, ODS) verwendet. Ein möglicher Nachteil ist, daß bei kieselgelgebundenen RP-Phasen Peak tailing auftreten kann, dessen Ursache in der Wechselwirkung basischer Gruppen des Analyten mit freien Silanolgruppen des Trägermaterials liegt [103, 164, 165]. Diese Wechselwirkung wird je nach Säulenqualität zum Teil auch bei „endcapped“ Umkehrphasen beobachtet. Dieser Effekt tritt nicht mehr auf, wenn der Eluent einen pH von  $\cong 2$  hat. Bei diesem pH-Wert sind die basischen Dimethylaminogruppen der Tetracycline protoniert. Derart saure Eluenten wirken sich jedoch negativ auf die Lebensdauer der Umkehrphasen aus.

Aufgrund des sauren pH-Wertes des Eluenten und der Abwesenheit von Silanolgruppen wird die Verwendung von Polymerphasen beschrieben. So beschreiben Naidong et al. [18, 19] bei gekühlten Trennbedingungen die Trennung der Keto-Enol-Tautomere der Tetracycline an einer Polymerphase. Als Retentionsmechanismus wird die Bildung von  $\pi$ -Komplexen des Polystyrol-Divinyl-Copolymers mit den Tetracyclinen angenommen [19].

Eine weitere Störung der Chromatographie kann durch die Komplexierung der Tetracycline mit Metallkationen, die bei der Verwendung von Edelstahlsäulen freigesetzt werden können, auftreten. Bei niedrigen pH-Werten des Eluenten sind durch Metallkationen keine Störungen zu erwarten, da die Tetracycline selbst als Kation vorliegen. Bei pH-Werten über 3 sind metallkomplexierende Zusätze wie EDTA unerlässlich [3]. Eine Metallkomplexierung und ein saurer pH-Wert des Fließmittels wird durch die Verwendung von Oxalsäure, Citronensäure oder Phosphorsäure erreicht [165].

### 2.5.5 Detektion

Tetracycline (OTC, TC, CTC) lassen sich mit verschiedenen Verfahren detektieren. Die wichtigsten Verfahren sind im folgenden aufgelistet :

- **UV- und Fluoreszenz-Detektion**

Die Detektion der Tetracycline erfolgt bei den meisten HPLC-Verfahren mittels UV-Detektor. Es wird bei Wellenlängen von 254, 280 und 350-370 nm detektiert, wobei im niederen UV-Bereich die Wahrscheinlichkeit von Matrixeinflüssen erhöht ist. Auch Diodenarray-Detektoren werden verwendet [11, 166] .

Bei den analytischen Methoden wird die natürliche Fluoreszenz der drei Tetracycline nicht genutzt, statt dessen wird die Intensitätsverstärkung der Fluoreszenz mittels verschiedener Metallkationen ausgenutzt. Hierzu wurden Methoden mit Calcium, Magnesium, Aluminium oder Zirkonium publiziert [13, 167, 168]. Die Detektion der Tetracycline mittels Fluoreszenzdetektoren erfordert daher eine Nachsäulenderivatisierungseinheit, da die Chromatographie in Gegenwart von Metallkationen und bei einem für die Metallkomplexbildung nötigen pH-Bereich nicht immer möglich ist. HPLC-Methoden zur Bestimmung der Tetracycline, die die selektive Bildung von Anhydroverbindungen im sauren pH-Bereich ausnützen, sind bislang nicht beschrieben worden.

Es gibt spezielle Methoden, die die spezifische Bildung von ICTC aus CTC unter alkalischen Bedingungen ausnützen. Das ICTC fluoresziert nur im alkalischen pH-Bereich [21, 109]. UV-Spektren von ICTC bei saurem pH-Bereich finden sich bei Kennedy et al. [21] und Ahmed und Jee [169]. Blanchflower et al. [170] beschrieben eine HPLC-Methode mit Vorsäulenderivatisierung zur Überführung des CTC in das ICTC. Nach der off-line Probenaufarbeitung wird der Extrakt mit dem alkalischen Fließmittel pH 12 versetzt und für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch die Verwendung einer Polymersäule kann die Lösung bei pH 12 chromatographiert und anschließend detektiert werden. Die Anwesenheit von OTC oder TC stört die Bestimmung nicht.

Einen anderen Weg nutzten Bryan et al. [21] zur Untersuchung von CTC in Milch. Diese Autoren haben hierzu eine Nachsäulenderivatisierung entwickelt, bei der erst nach der Chromatographie durch Zupumpen eines alkalischen Glycin-Puffers CTC in ICTC bei 60°C überführt wird und bei pH 12 fluorimetrisch bei 355/>389 nm detektiert wird.

- **Massenspektroskopie**

Die erste Arbeit zur Massenspektroskopie von Tetracyclinen wurde bereits 1965 von Hoffman veröffentlicht [171]. Diese Arbeit gibt bereits eine Übersicht über die Fragmente nach Elektronenstoßionisation bei 70 eV. Mit den Fortschritten zur LC-MS Kopplung wurden auch Arbeiten zur Massenspektroskopie von Tetracyclinen nach LC-Trennung veröffentlicht. Ein Übersichtsartikel, der diese Entwicklung beschreibt, wurde von Niessen und Tinke [172] veröffentlicht, sowie von Oka et al. [173] ein weiterer Übersichtsartikel speziell zur Massenspektrometrie von Tetracyclinen. Verschiedene Ionisationstechniken wurden für die LC-MS-Kopplung beschrieben. Bei allen Kopplungsverfahren steht im Vordergrund, den HPLC-Eluent von den Analyten zu trennen, um so eine massenspektroskopische Bestimmung der Tetracycline zu ermöglichen. Die LC-MS-Kopplungs- und Ionisierungstechnik des Particle-Beam mit negativer chemischer Ionization (Particle Beam NICI) wird von Kijak et al. [174] und Carson et al. [175], die Technik des Atmospheric Pressure mit chemischer Ionisation (APCI) von Blanchflower et al. [176] sowie die Electrospray Ionisations-Technik (ESI) von Oka et al. [177] und Weimann et al. [178] für die Tetracyclinanalytik beschrieben. Zur quantitativen Bestimmung wird von Oka die ESI empfohlen [173]. Die Particle Beam Technik (NICI) bietet den Vorteil, eine größere Fragmentierung und reichere Spektren zu erzeugen als es unter ESI und APCI-MS Bedingungen bei Tetracyclinen möglich ist [175].

Bei Einsatz der Tandemmassenspektroskopie (MS/MS), speziell im Modus „multiple reaction monitoring (MRM)“ kann aufgrund der Selektivität des Meßprinzips oft die Probenaufarbeitung verkürzt werden [179]. Im MRM-Modus werden vom MS1 nur ausgewählte Massen in eine Reaktionskammer durchgelassen. Dort werden Folgeionen (Tochterionen) gebildet, die in das MS2 gelangen können. Das MS2 läßt im MRM-Modus nur die Massen der Folgeionen zum Detektor (d.h. zum Photomultiplier) durch. Da von einem on-line Dialyse-System keine hochreine Extraktion erwartet werden kann, stellt die Tandemmassenspektroskopie eine aussichtsreiche Detektionsart dar.

### 3 Zielsetzung

Die ursprüngliche Zielsetzung dieser Arbeit war es, Untersuchungen zur Gewinnung von Referenzmaterial mit gewachsenen Rückständen der drei Tetracycline (OTC, TC und CTC) durchzuführen. Das analytische Verfahren sollte folgende Anforderungen erfüllen :

- ein hohes Probeaufkommen bewältigen können (daher wurde ein automatisiertes Verfahren gewählt)
- am halben, ein- und zweifachen EU-MRL-Wert (Vollei) validiert werden können
- die 4-Epimere neben den Muttersubstanzen bestimmen können

Die Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit der Methode sollte durch eine Validierung, die in Übereinstimmung mit den in der EG-Entscheidung der Kommission (93/256/EG) festgelegten Kriterien [180] erfolgen sollte, charakterisiert werden.

Durch die Analyse von lyophilisierten dotierten Volleiprobe sollte ferner die Frage geklärt werden, ob das entwickelte Verfahren für die Durchführung einer Lagerstudie - und damit für die Durchführung von Untersuchungen zur Gewinnung von Referenzmaterial - geeignet wäre. Des weiteren sollten mit Hilfe der entwickelten Methode Studien zur Charakterisierung des Ausscheidungsverhaltens und der Rückstandsverteilung von Tetracyclinen während und nach oraler Aufnahme von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin bei Legehennen durchgeführt werden.

Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit, Untersuchungen zur Gewinnung von Referenzmaterial durchzuführen, wurde aufgegeben, nachdem mit Hilfe des entwickelten analytischen Verfahrens eine unterschiedliche Verteilung und ein unterschiedlicher Metabolismus der Tetracycline in Eigelb- und Eiklarproben, die aus den Medikationsstudien stammten, festgestellt werden konnte.

Ein Grund für die Änderung der Zielsetzung bestand darin, die Frage zu klären, welche Metaboliten existieren und inwieweit die Epimere der drei Tetracycline auf eine *in vivo* Bildung zurückzuführen sind oder als eine analytische Artefaktbildung aufzufassen sind. Die Anforderungen an das analytische Verfahren wurden ergänzt, um die Anforderung ICTC und e-ICTC neben den drei Tetracyclinen bestimmen zu können. Hierbei sollte auch geprüft werden, ob das Verfahren selbst eine analytische Artefakt-Bildung von ICTC aus CTC oder der 4-Epimeren von OTC, TC, CTC und ICTC herbeiführt.

Nachdem die Analysenergebnisse von Volleiprobe einer Medikationsstudie mit CTC das in jüngster Zeit beschriebene Auftreten von Isochlortetracyclin (ICTC) und Epi-Isochlortetracyclin (e-ICTC) als Hauptmetaboliten des Chlortetracyclins bei Legehennen [21] bestätigt hatten, wurde die Existenz weiterer Metaboliten, insbesondere der N-Desmethyl-derivate von OTC, TC und ICTC in Vollei-, Plasma- und Eigelbproben festgestellt und quantitativ untersucht. Zur Identifizierung der verschiedenen Rückstände sollten Untersuchungen mit einem LC-MS/MS und einem Diodenarray-Detektor durchgeführt werden. Dabei sollte auch die Anwesenheit der Muttersubstanzen und aller Metaboliten abgesichert werden. Hierzu

sollten das verwendete Hühnerfutter, dotierte Matrixproben, sowie Eiklar-, Eigelb- und Plasmaproben mit gewachsenen Rückständen untersucht werden. Durch einen in vitro Versuch sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit der festgestellte Metabolismus chemisch oder enzymatisch zu erklären sei.

## 4. Methodenentwicklung zur ASTED<sup>®</sup>-HPLC-Analytik von Tetracyclinen

### 4.1 Apparativer Aufbau, Funktionsweise einer ASTED<sup>®</sup>-Analyse und chromatographische Bedingungen

In diesem Kapitel wird das zur Tetracyclinanalytik verwendete Verfahren vorgestellt und die Unterschiede gegenüber bisherigen Verfahren beschrieben. Die Gründe für die Modifikationen gegenüber den bisherigen Verfahren werden in den Kapiteln 4.2 bis 4.7 erläutert:

- **Apparativer Aufbau**

In Abb. 10 ist das on-line Dialyse-System dargestellt, das nach erfolgreicher Entwicklung bei der Untersuchung der biologischen Proben aus den Medikationsversuchen und einem Lagerungsversuch eingesetzt wurde. Das Grundsystem beruht auf dem kommerziell erhältlichen ASTED<sup>®</sup>-System der Firma Abimed Analystechnik. Details des Systems und der Methode, z.B. Herstellerangaben und metrische Angaben, finden sich in der Standardarbeitsanweisung, im Kap. 10 (Arbeitsvorschriften). Im Anhang Kap.12.7 findet sich eine Übersichtstabelle, die die hier verwendeten Begriffe bezüglich ihrer Funktion definiert.

Die vier Schritte der automatisierten Probenaufarbeitung, wie sie beim kommerziell erhältlichen System verwirklicht worden ist, wurden im Grundprinzip beibehalten.

- **Analyse von Proben**

Im ersten Schritt werden die Probenmatrices mit einem Citratpuffer verdünnt. Nach der off-line Probenvorbehandlung werden die verdünnten Proben in Vials abgefüllt und abwechselnd mit Vials, die eine Spüllösung (0,3 mol/l Phosphatpuffer pH 5,85 mit 13 g/l Triton X-100) enthalten, in das gekühlte Autosamplerrack gestellt. Das erste Vial im Autosamplerrack (Abb. 10) ist immer eine Spüllösung.

Zur Injektion einer verdünnten Volleprobe in die Donorkammer saugt der Dilutor 0 über eine Förderleitung (5 ml PTFE Schleife) durch eine Injektionsnadel aus den Autosamplervials des Probenracks das Probevolumen an. Damit das Probevolumen nicht durch die in der Förderleitung und in der Donorkammer befindlichen Dilutor-0-Lösung (0,06 mol/l pH 6,0 mit 1 g/l Triton X-100) verdünnt wird, werden die beiden Lösungen durch ein 50 µl Luftvolumen voneinander getrennt. Hierzu saugt der Dilutor 50 µl Luft an und anschließend zum Luftsegment 1500 µl der verdünnten Probelösung aus dem Probenvial und darauf nochmal 50 µl Luft. Der Dilutor injiziert dann über den Injektionsport zuerst 50 µl Luft, gefolgt von 1200 µl der verdünnten Probelösung

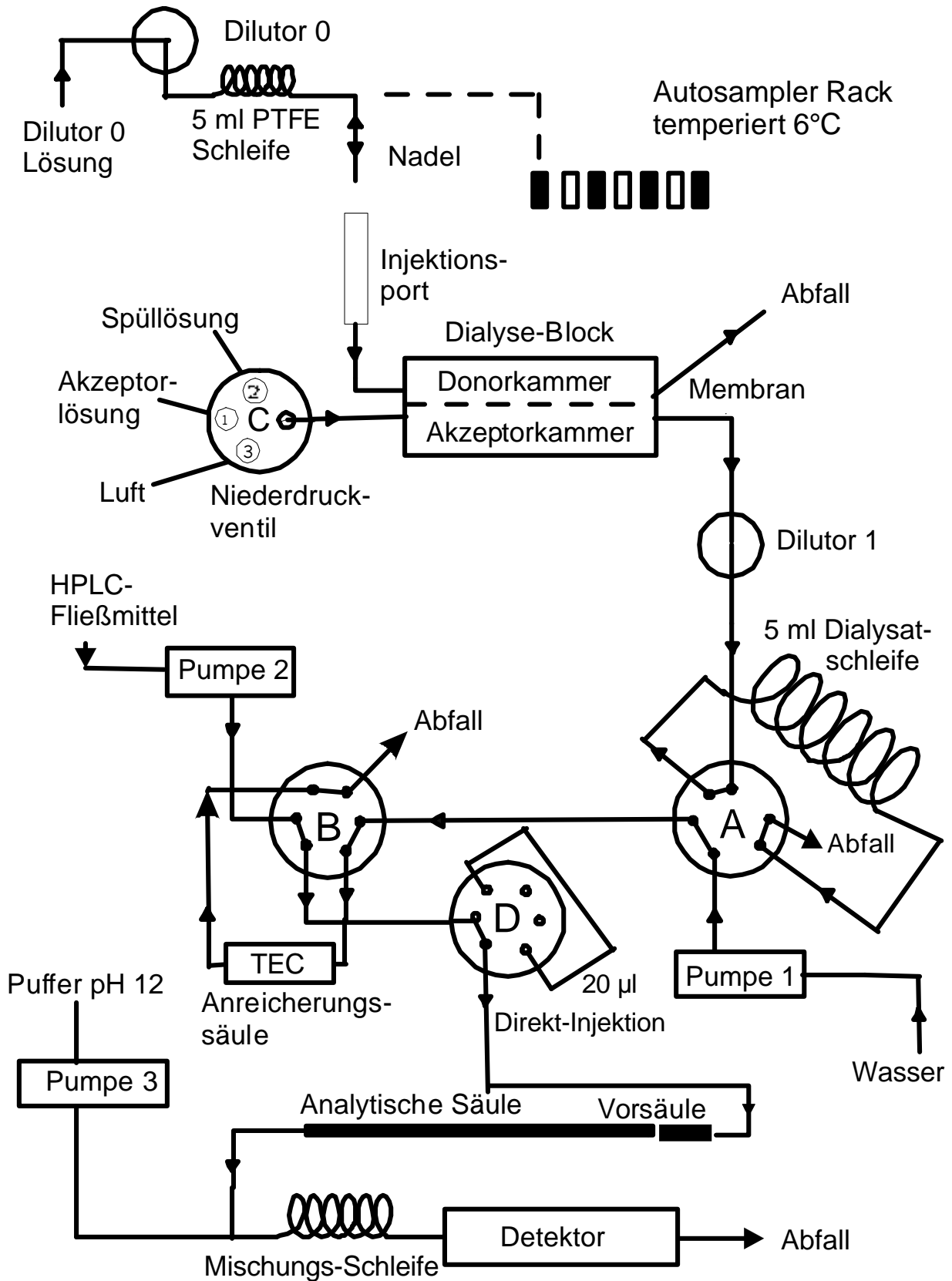


Abb. 10: Schaltbild des automatisierten on-line Dialyseverfahrens zur Bestimmung von Tetracyclinen und ihrer Metaboliten in Eiklar-, Eigelb-, Vollei- und Plasmaproben



in die Donorkammer des Dialyseblocks. Bei diesem Dialyseblock handelt es sich um zwei in Reihe geschaltete Dialyseblöcke mit einem zur Dialyse verfügbaren Donorkammervolumen von 740 µl. In Abb. 10 ist zur Vereinfachung nur eine Dialysezelle dargestellt. In den folgenden Unterpunkten werden die einzelnen Schritte zum Punkt „Analyse von Proben“ aufgelistet:

- **Dialyse, Anreicherung und Analyttransfer**

Während die Probelösung für 15,5 Minuten in der Donorkammer statisch verbleibt, saugt der Dilutor 1 in drei Pulsen mit je 1350 µl und einem vierten Puls mit 1450 µl Akzeptorkammerlösung durch die Akzeptorkammer an. Der Austauschvorgang der analythaltigen Akzeptorkammerlösung durch die analytfreie Akzeptorkammerlösung wird als Puls bezeichnet. Die analythaltige Akzeptorkammerlösung wird im folgenden als Dialysat bezeichnet. Während des Dialysevorganges diffundieren die Analyten in die Akzeptorkammerlösung, wobei das Dialysat gewonnen wird. Der Konzentrationsgradient der Analytkonzentration zwischen Donor- und Akzeptorkammer wird durch vier aufeinanderfolgende Pulse aufrecht erhalten. Das erhaltene Dialysat wird in die 5 ml Dialysatschleife des 6-Wege Rheodyneventils A überführt und dort gesammelt. Gleichzeitig zum Dialysevorgang wird die Anreicherungssäule mit Wasser (HPLC-Qualität) von Acetonitril befreit und so für die Anreicherung konditioniert. Nachdem der letzte Akzeptorkammer-Puls in die 5 ml Dialysatschleife überführt worden ist, schaltet das Schaltventil A und das analythaltige Dialysat wird mittels HPLC Pumpe 1 in einem Schritt auf die Anreicherungssäule überführt. Dort werden die Analyten adsorbiert, während die übrige Lösung in den Abfall gepumpt wird. Nachdem das gesamte Dialysat durch die Anreicherungssäule gepumpt worden ist, werden noch 4 ml Wasser von der HPLC Pumpe 1 auf die Anreicherungssäule gegeben. Durch diesen Waschschrift werden, wie bei der Festphasenextraktion üblich, polare Matrix-Bestandteile und Salze der Akzeptorkammerlösung herausgewaschen. Im nächsten Schritt schaltet das Schaltventil B und die Analyten werden im Backflush-Modus auf die analytische Trennsäule überführt. Gleichzeitig zu diesem Schaltvorgang wird die automatische Datenaufnahme gestartet. Die Anreicherungssäule bleibt 30 Minuten lang mit der analytischen Trennsäule in Reihe geschaltet. Gleichzeitig fördert HPLC-Pumpe 1 Wasser zur Reinigung durch die 5 ml Dialysatschleife. Nach 30 Minuten schalten beide Ventile, so daß die 5 ml Dialysatschleife (Ventil A) wieder Dialysat aufnehmen kann und die Anreicherungssäule (Ventil B) wieder mit Wasser für das nächste Dialysatvolumen konditioniert wird. Das System kann dann mit der Analyse der nächsten Probe beginnen.

- **Reinigung der Dialysezelle nach jeder Analyse**

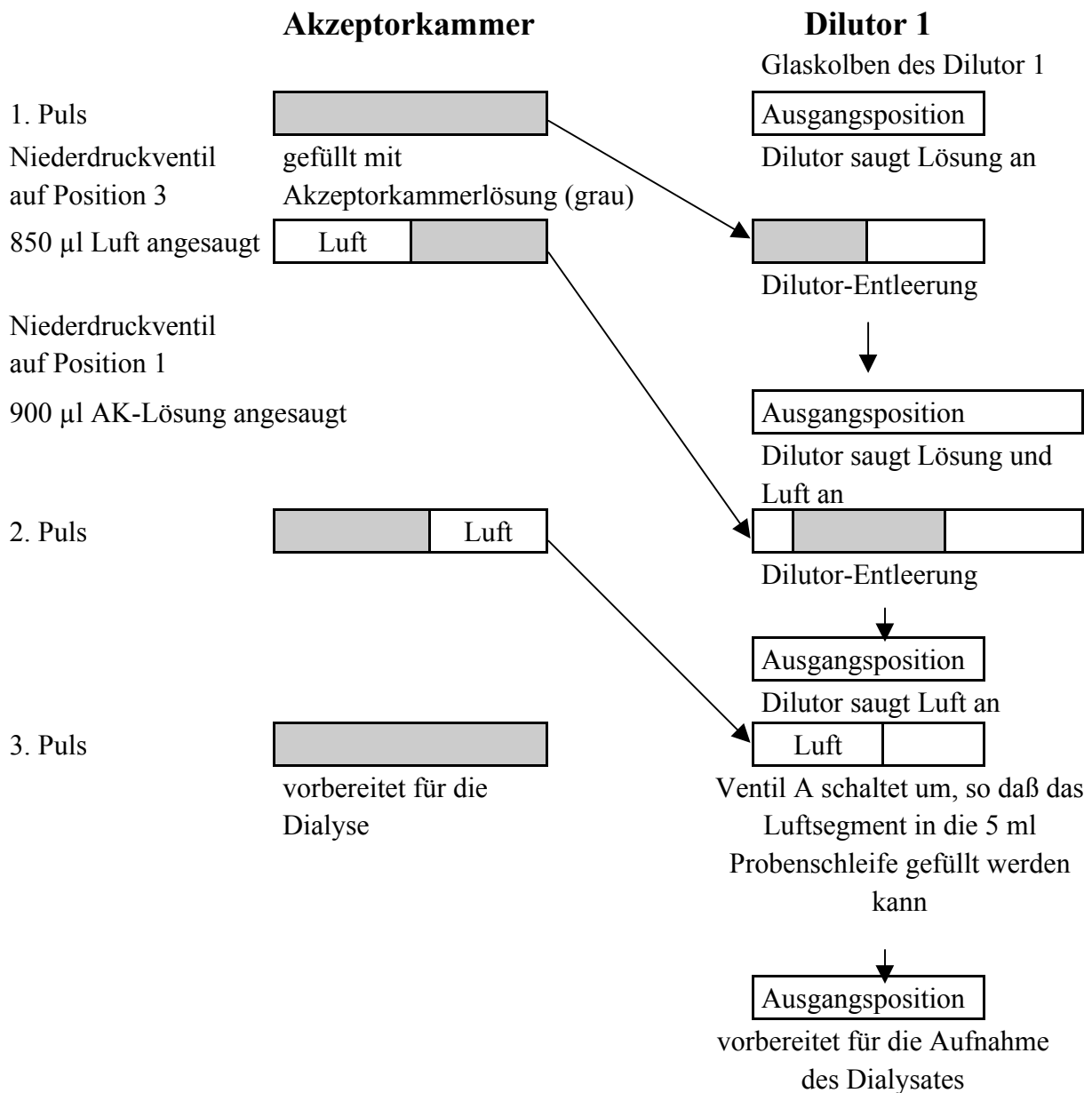
Mit dem Beginn des Anreicherungsvorgangs (Extraktion der Analyten aus der Dialysatlösung) beginnt zugleich die Reinigung der Dialysezelle. Der Dilutor 0 spült die Probelösung, die sich in der Donorkammer befindet, in den Abfall. Danach werden sowohl Donor- als auch Akzeptorkammer simultan mit der Spüllösung gereinigt. Der Dilutor 0 entnimmt dem Spülvial 3,6 ml Spüllösung. Der Dilutor 1 saugt durch die Akzeptorkammer, nachdem das Niederdruckventil C in Position 2 geschaltet ist, ebenfalls 3,6 ml Spüllösung an. Danach wird die Spüllösung aus den Dialysekammern entfernt. Für diesen Zweck fördert der Dilutor-0 genau 25 ml Dilutor-0-Lösung durch die Donorkammer, während der Dilutor 1 genau 15 ml Akzeptorkammerlösung durch die Akzeptorkammer fördert, nachdem das Niederdruckventil C wieder auf Position 1 geschaltet ist.

- **Off-line Reinigung der Dialysekammer**

Die Verbindungsschläuche sowie die Donor- und Akzeptorkammer des Dialyseblockes wurden, wie im Bedienungs-Handbuch des ASTED-Systems beschrieben, wöchentlich mit einer 0,1 mol/l Natriumhydroxidlösung gereinigt. Dieser Reinigungsschritt war nötig, um ein mögliches Bakterien- und Algenwachstum zu verhindern.

- **Luftsegment für die Dialysatschleife**

Bereits van Leeuwen und van Gend verwendeten Luftsegmente in der Akzeptorkammer sowie vermutlich auch für die Dialysatschleife, was aus ihrer publizierten Arbeit allerdings nicht eindeutig hervorgeht. Im folgenden wird erläutert, wie eine Diffusion von Analyten des Dialysates in das in der Dialysatschleife befindliche Wasser während der 15 minütigen Dialyse verhindert wird. Die Diffusion wird verhindert, indem ein Luftsegment zwischen dem Wasser der 5 ml Probenschleife und dem Dialysat eingeführt wird. Hierzu wird über das Niederdruckventil C, in Position 3 geschaltet, 850 µl Luft angesaugt, durch die Akzeptorkammer geführt und über den Glaskolben des Dilutor 1 in die 5 ml Probenschleife des 6-Wege Schaltventils A überführt. Abb. 11 zeigt den hierfür entwickelten komplexen 3-Puls Vorgang.



**Abb. 11: Transfer des Luftsegments von der Akzeptorkammer über den Dilutor 1 in die 5 ml Probenschleife. Akzeptorkammerlösung = „graue Fläche“**

**- Chromatographie**

Für die Trennung der Tetracycline, ihrer Umwandlungs- und Dehydratationsprodukte und der N-Desmethylderivate auf der reversed-phase Trennsäule (Superspher<sup>®</sup> RP-8, 4µm, 250 x 3 mm I.D.) wurde zwischen drei Fließmitteln gewechselt. Für die Trennung der antibiotisch wirksamen Muttersubstanz TC und CTC von ihren Epimeren wurde ein Gemisch aus 0,01 mol/l Oxalsäure und Acetonitril (50 + 50, v+v) gewählt. Für die Trennung

der *in vivo* gebildeten N-Desmethylderivate und zur besseren Trennung von OTC von seinem Epimer wurde die Oxalsäurekonzentration auf 0,005 mol/l gesenkt (FLM II, Anhang 12.7). Zur Verkürzung der Chromatographiedauer der unpolareneren Anhydrotetracycline wurde die Oxalsäurekonzentration bei gleichem Acetonitrilanteil auf 0,015 mol/l erhöht. Die Säulentemperatur betrug bei allen Bestimmungen Raumtemperatur.

- **Detektion**

Das Verfahren stützt sich auf eine UV-Detektion bei 360 nm und auf eine Fluoreszenz-Detektion bei 350/420 nm. Zur Bestimmung aller Ausgangssubstanzen (OTC, TC und CTC) und ihrer Epimere wird das Säuleneluat, welches einen pH-Wert von 2,2 aufweist, direkt in den UV-Detektor geführt. Zur Bestimmung der Isotetracycline neben den Tetracyclinen wird die Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Hierzu wird im Anschluß an die Chromatographie der pH-Wert des Säuleneluates von 2,2 auf 12,0 verschoben, indem über ein T-Stück mit einer weiteren HPLC-Pumpe ein 0,4 mol/l Natrium-Glycin-Puffer pH 12,0 zugepumpt wird. Für eine gleichmäßige Einstellung des pH-Wertes wird das Gemisch durch eine Teflonkapillare (2 m, 0,3 mm i.D.) zum Fluoreszenz-Detektor gepumpt.

Die Detektion von CTC und seiner Isoderivate ließ sich auch bei 310 nm und pH 2,2 durchführen, sofern OTC und TC abwesend waren. Denn OTC und TC absorbieren ebenfalls bei 310 nm und behindern durch Coelution die Auswertung von e-ICTC und ICTC. Als weitere Detektionsart (Kap. 6) wurde ein LC-MS-MS System eingesetzt. Die Arbeitsvorschrift, die die Parameter zur LC-MS-MS Detektion enthält, ist in Kap. 10.3 (Arbeitsvorschriften) wiedergegeben.

- **Steuerung und Automation**

Die Probenaufarbeitung (Dialyse, Anreicherung, Analyttransfer) wurde vollautomatisch unter Kontrolle des Probengebers (Autosampler) durchgeführt. Durch die zeitlich optimale Verschachtelung von Probenaufarbeitung und Chromatographie wurde während der Chromatographie einer Probe schon mit der Aufarbeitung der folgenden Probe begonnen.

Die Dauer einer Analyse von automatisierter on-line Probenaufarbeitung bis Abschluß des Chromatogramms betrug 90 Minuten. Beim automatisierten 24 Stundenbetrieb war es möglich, 16 Proben zu analysieren. Die manuelle Laborarbeit beschränkte sich auf die Probenvorbehandlung und auf das Ansetzen der zur Analytik benötigten Lösungen. Die Programmierung ist in Anhang 12.6 beschrieben.

Das Verfahren zur Analytik von Tetracyclinrückständen unterschied sich von dem Verfahren von Aerts, Beek und Brinkman für Nitrofurane [148] und von dem von Oeser verbesserten Verfahren [153], sowie auch von dem von Agasøster für OTC 1992 [151] erweiterten ASTED<sup>®</sup>-Verfahren. Der apparative Aufbau ihrer Methoden gleicht instrumentell-apparativ dem kommerziell erhältlichen System, das in Abb. 9, Kap. 2.5.3, dargestellt ist. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Analyse von Tetracyclinrückständen zeigt in seiner Funktionsweise Gemeinsamkeiten mit dem on-line Dialyse-System von Technicon Instruments, welches zur Analyse von Amprolium in Eigelbproben nach van Leeuwen und van Gend [150] beschrieben wurde. Van Leeuwen und van Gend zentrifugierten allerdings ihre Eigelbproben, bevor sie mit dem System dialysiert wurden. Der Zentrifugationsschritt war bei dem im folgenden noch zu erläuternden Verfahren nicht erforderlich. Van Leeuwen und van Gend nutzten auch einen anderen Dialysemodus (Tab. 8, Kap. 4.3).

Bei dem für diese Forschungsarbeit entwickelten Verfahren wurde im Unterschied zu anderen Verfahren über einen längeren Zeitraum geprüft, inwieweit es den Ansprüchen nach Präzision und Robustheit im Langzeitbetrieb gerecht wurde. Es unterschied sich von den bisherigen Verfahren um folgende Punkte :

- ◆ eine saure Probenverdünnung von Eiprobe und eine höhere Verdünnung als das bisherige ASTED<sup>®</sup>-Verfahren und der Erweiterung der ASTED<sup>®</sup>-Analytik auch auf alkaliinstabiles CTC
- ◆ automatisierte Analyse von Eigelbproben ohne vorhergehende Zentrifugation
- ◆ Einsatz und Integration einer speziellen Spüllösung für Donor- und Akzeptorkammer in der automatisierten Probenaufarbeitung zur Selbst-Reinigung des Dialyseblockes
- ◆ chromatographische Bedingungen, die die Trennung der Epimere und weiterer Metaboliten von ihren Muttersubstanzen ermöglichten oder verbesserten
- ◆ Erweiterung der Detektionsarten, die die simultane quantitative Bestimmung der verschiedenen Tetracycline und ihrer Metaboliten ermöglichten

Die Modifikationen wurden durch eine instrumentelle Erweiterung des herkömmlichen ASTED<sup>®</sup>-Systems und durch die Programmierung neuer Arbeitsabläufe ermöglicht. Fast alle vorgenommenen Modifikationen des ASTED<sup>®</sup>-Systems wurden speziell für die Tetracyclin-Analytik in den unterschiedlichen Matrices Plasma, Vollei, Eigelb und Eiklar entwickelt.

Die entwickelte analytische Tetracyclin-Methode trug selbst nicht zu einer Artefakt-Bildung von Epimeren oder ICTC bei. Inwieweit andere Methoden zur Artefakt-Bildung beitragen und ob sich die Methode darin von anderen Methoden unterschied, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft. Allerdings beruhen viele Ergebnisse des Kapitels 6 auf dieser Eigenschaft der analytischen Methode, selbst nicht zur Artefakt-Bildung von Epimeren und ICTC beizutragen. Mit der Methode war es außerdem möglich, die Epimere und das ICTC als *in vivo* gebildete Rückstände analytisch zu bestimmen. Dies wurde bislang nur von Kennedy et al. [58] für das ICTC und von Bergner-Lang und Mikisch [76] für die Epimere beschrieben. Eine Neuerung des Verfahrens gegenüber bisherigen analytischen Verfahren besteht in der Analyse der N-Desmethylderivate von OTC, TC und ICTC, die bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurden.

Im folgenden werden einige Details des on-line Dialyse Verfahrens und ihr Unterschied zu bisherigen Verfahren beschrieben.

## 4.2 Vorbehandlung der Probe

Die Probenaufarbeitung gliederte sich in zwei Schritte : einen Probenvorbehandlungsschritt, der off-line durchgeführt wurde, und in eine on-line durchgeführte Probenaufarbeitung.

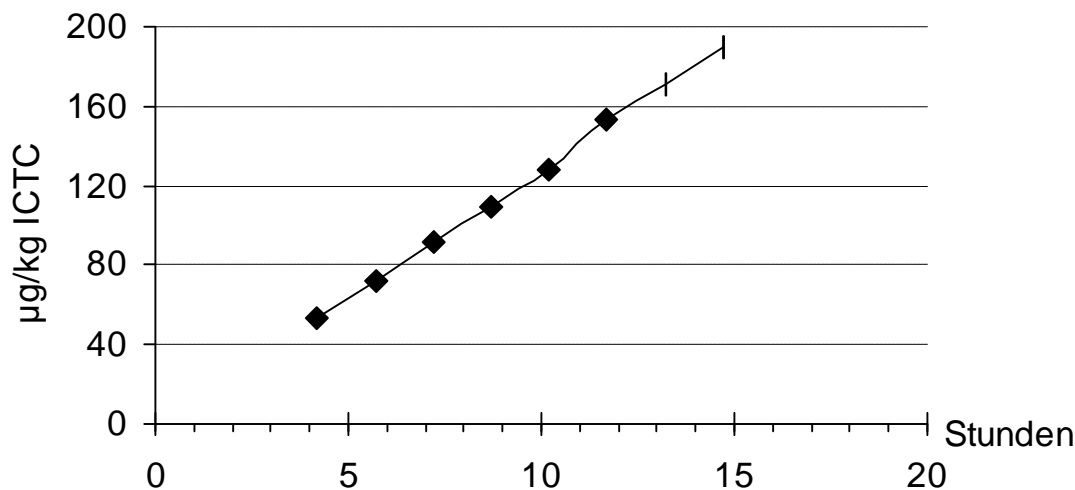
Die Probenvorbehandlung diente dazu, die Proben in eine für den Autosampler genügend niedrigen Viskosität zu überführen. Das Probenmaterial wurde in diesem Schritt nur verdünnt. Die Zusammensetzung der Verdünnungslösung sollte gewährleisten, daß die Matrix und die Analyten für einen 20 Stunden umfassenden Zeitraum keiner chemischen Veränderung unterlagen, die das Analysenergebnis in unreproduzierbarer Weise verändern können. Diese 20 Stunden entsprachen der Zeit, in der die Proben - bereits verdünnt in Vials abgefüllt - im Autosamplerrack auf ihre Analyse warteten. Für die vollautomatisierte on-line Probenaufarbeitung war die Stabilität der Probelösung von besonderer Bedeutung. Bei Verwendung ungeeigneter Verdünnungslösungen konnten die Verbindungsschläuche des Dialyseblockes durch präzipitierende Bestandteile der Probe verstopfen, wodurch Störungen der automatisierten Probenaufarbeitung auftraten oder fehlerhafte Analysenergebnisse entstanden.

Ausgangspunkt für die ersten Analysen mit Volleiproben war eine Probenverdünnung, wie sie sowohl von Aerts et al. [148, 149] als auch von Agasøster [151] beschrieben wurde. Es wurden 10 g homogenisiertes Vollei mit 10 ml einer 0,9 %-igen Natriumchloridlösung und 3 ml einer 10 %-igen Natriumazidlösung versetzt und homogenisiert. Die homogene und transluzierende Mischung hatte einen pH-Wert 8 und wurde zur Analyse eingesetzt. Hierbei kam es allerdings zeitabhängig zu einer Entmischung der Probelösung. Oeser [153] beschreibt

dieses Problem und dessen Lösung wie folgt : „Hühnereiprotein hoher Dichte lagerte sich am Boden der Fläschchen ab, über dem eine dünnflüssige Lösung stand. Daher wurde das Programm zur Probeentnahme dahingehend umgeschrieben, daß durch mehrmaliges Aufnehmen und Wiederablassen von 4 ml Probenlösung aus dem bzw. in das Fläschchen eine gute Durchmischung eintrat. Hierdurch konnte im Anschluß eine homogene aliquote Probenmenge in die Donorkammer des Dialyseblockes eingebracht werden.“

Auch bei Agasøster [151] traten ähnliche Probleme auf. Er beschreibt, daß es zu Verstopfungen der Nadel kam und empfiehlt als Lösung dieses Problems einen Salzzusatz zu den Lösungen, die von den Dilutoren gefördert werden.

Analysen, die nach Verdünnung der Proben mit der natriumazidhaltigen alkalischen Probenverdünnungslösung und mit dem von Oeser programmierten Mischvorgang durchgeführt wurden, ergaben Analysenergebnisse, die eine stetige Abnahme der Wiederfindung über einen Zeitraum von 20 Stunden anzeigten. Besonders kritisch kann hierbei die Stabilität von CTC angesehen werden, welches bei pH-Werten über 7,0 bei Raumtemperatur in das ICTC umgewandelt wird. Durch die von Aerts et al. [149] vorgeschlagene alkalische Verdünnungslösung erhält man eine Vollei-Probelösung mit pH 8,0. Bei diesem pH-Wert wurde, wie in der Abb. 12 dargestellt, eine rasche Bildung von ICTC aus CTC beobachtet.



**Abb. 12:** Zeitabhängige Isomerisierung von CTC zu ICTC in Volleiproben, dotiert mit 400 µg/kg CTC, verdünnt mit einer natriumazidhaltigen Probenverdünnungslösung bei pH 8 nach Aerts et al. [149] bei 6°C  
Detektion : Fluoreszenz 350/420 nm pH 12,0

Zur Lösung dieser Problematik (Abb. 12) wurden folgende Maßnahmen durchgeführt :

- **Optimierung der Probenverdünnungslösung**

Die oben beschriebenen Untersuchungen zeigen deutlich, daß die von Aerts et al. [149] für die Nitrofuranalytik entwickelte Probenverdünnungslösung bei der Analytik von CTC-haltigen Volleiprobe zu falschen Analysenergebnissen führt. Die leicht alkalische Probenverdünnungslösung sollte durch eine saure Probenverdünnungslösung ersetzt werden, die nicht zu einer Isomerisierung des CTC zu ICTC beiträgt. Auch die Bildung eines Bodensatzes in den Vials des Autosamplerracks sollte nicht mehr auftreten. Im folgenden wurden mehrere für die off-line Analytik von Tetracyclinen beschriebene saure Pufferlösungen auf eine Verwendung als Probenverdünnungslösung geprüft. Hierzu zählen Oxalsäure, 0,1 mol/l McIlvaine-Puffer (Phosphatpuffer) pH 4,0 und Bernsteinsäurepuffer (5,9 g/l) pH 4,0. Zusätze an EDTA zu diesen Pufferlösungen verstärkten die denaturierende Wirkung auf die Hühnereiproteine. Alle in der Literatur beschriebenen Pufferlösungen führten zu einer inhomogenen Probelösung und waren daher für die Aufgabe, die Probelösung zu stabilisieren, ungeeignet.

Auch eine Verdünnung von Vollei mit Wasser führte zur unerwünschten Denaturierung von Hühnereiprotein. Agasøster beschrieb in seiner Methode für das OTC [151], daß sich ein erhöhter Zusatz an Natriumchlorid in der Dilutor-0-Lösung und in der Akzeptorkammerlösung positiv auf die Stabilität des Gesamtsystems auswirkte. Dieser positive Effekt wurde in eigenen Untersuchungen bestätigt und ein Zusatz an 3,25 % Natriumchlorid zu sauren Pufferlösungen verhinderte ein Absetzen von Hühnereiprotein im Probenvial. Allerdings trat die Trübung, d.h. die denaturierende Wirkung, die beim Verdünnen von Vollei mit Wasser oder anderen sauren Lösungen entsteht, weiterhin auf. Diese Trübung führte dazu, daß sich über der Dialysemembran in der Donorkammer ein weißer Proteinfilm bildete, der den Analyttransport von der Donorkammer durch die Membran in die Akzeptorkammer behinderte und den Reinigungsaufwand des ASTED-Systems erheblich erhöhte. Bei längeren Analysenserien über 2 Tage setzte sich der Proteinfilm an Oberflächen in der Dialysezelle fest und führte so zu Verstopfungen.

Eine praktikable Lösung wurde mit einem Citratpuffer 0,3 mol/l pH 5,75 erreicht. Die mit diesem Puffer verdünnte Eimatrix hat bei einem Mischungsverhältnis von 1 g Ei und 2 g Puffer einen pH-Wert 6. Entscheidend für die Stabilität der mit Citratpuffer verdünnten Probelösungen war der pH-Wert 5,75 der Probenverdünnungslösung und der pH-Wert der verdünnten Probelösung, der zwischen 5,9 und 6,1 liegen sollte. In Verdünnungsversuchen mit leicht unterschiedlichen pH-Werten von 5,0 bis 6,5 zeigte



sich, daß der enge pH-Bereich von 5,9 bis 6,1 in der verdünnten Probe eingehalten werden sollte, da sonst bei pH-Werten außerhalb dieses Bereiches Trübungen und Präzipitationen in der Probelösung auftraten. Auf den Zusatz an Natriumchlorid zur Stabilisierung von Ei-Matrix, wie es Agasøster empfohlen hatte, wurde verzichtet, da durch den Citratpuffer allein die Ei-Matrix in ausreichendem Maß stabilisiert war. Auch auf die von Oeser beschriebene Probenhomogenisation durch mehrmaliges Aufnehmen und Wiederablassen von 4 ml Probenlösung konnte verzichtet werden.

In der Routine-Analytik von Eiprobe erwies sich die Einhaltung dieses engen pH-Bereiches von 5,9 bis 6,1 in der verdünnten Probe mit Hilfe der Probenverdünnungslösung als sehr praktikabel und zuverlässig. Neben Citratpuffer eignete sich auch ein Phosphatpuffer gleicher Molarität zur Probenverdünnung. Die zur Validierung durchgeführten Analysen erfolgten immer mit einem Citratpuffer als Probenverdünnungslösung.

- **Zentrifugation als vorgeschalteter Probenaufarbeitungsschritt zur Verkürzung der Analysenzeit**

Es wurde geprüft, ob man durch Zentrifugation der Eiprobe auf die Reinigung der Dialysekammern verzichten konnte. Denn durch eine vorgeschaltete Zentrifugation würde weniger Matrix in die Donorkammer gelangen und der Reinigungsbedarf zur Reinigung der Dialysezelle wäre reduziert. Nachweisstärke und Praktikabilität bei der Dialyse lassen eine Probenverdünnung um mehr als den Faktor 4 nicht zu. Wurde eine solch verdünnte Eiprobe zentrifugiert, waren Analytverluste mit dem Bodensatz in der Größenordnung von 7 bis 15 % festzustellen. Auf eine Zentrifugation wurde deswegen verzichtet.

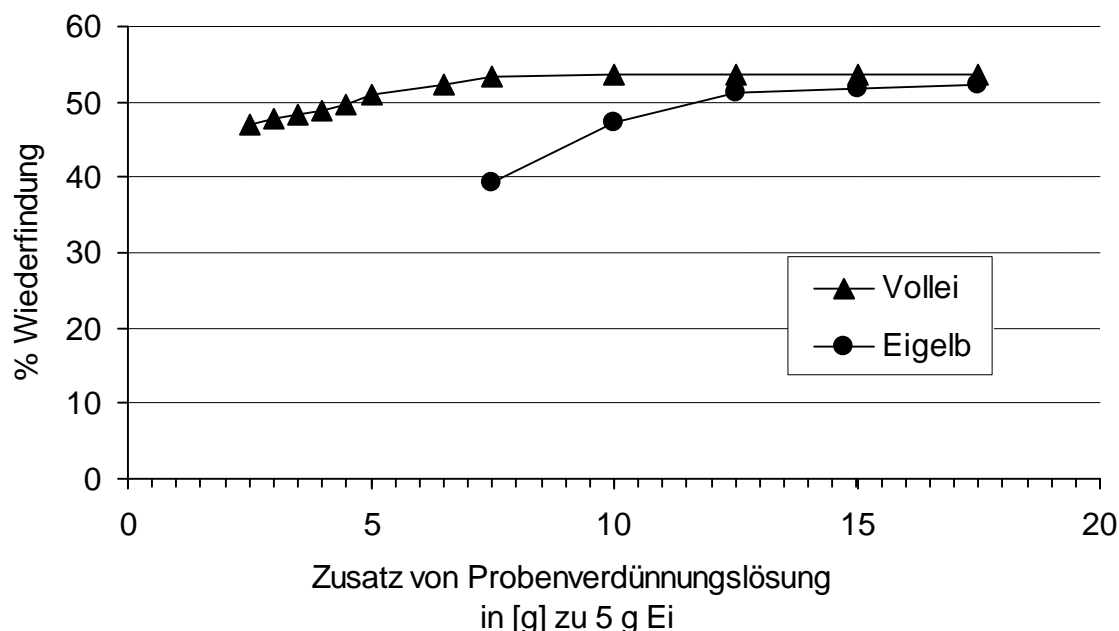
- **Ermittlung eines Mischungsverhältnisses von Probenverdünnungslösung und Probenmatrix zur Minimierung des Matrix-Einflusses**

Eine Grundvoraussetzung für den Analytübergang von der Donorkammer zur Akzeptorkammer ist, daß nur frei bewegliche Analyte diffundieren können. Ein Matrixeinfluß auf die Diffusion, z.B. auf die Beweglichkeit der Analyten oder durch Proteinbindung, sollte daher überprüft werden.

Die Überprüfung, ob tatsächlich ein Matrixeinfluß bestand, erfolgte mit der Dialyse matrixfreier Standards. Hierbei wurde die Wiederfindung von matrixhaltigen Proben mit der Wiederfindung verglichen, die bei der Dialyse von wässrigen matrixfreien Standards erhalten wurde. Die Ergebnisse der Versuche zur Wiederfindung sind in Kapitel 5 (Validierung) zusammengefaßt.

Die folgende Abb. 13 zeigt, daß bei einem Zusatz von 10 bzw. 15 ml Probenverdünnungslösung zu 5 g Vollei bzw. Eigelb die maximale Wiederfindung erreicht

wurde. Mit diesen Verdünnungen wurde deshalb gearbeitet. Dabei waren vergleichbare Wiederfindungen zu erzielen wie mit matrixfreien Lösungen. Die Untersuchungen zeigten auch, daß bei höheren Verdünnungen eine Beeinflussung der Wiederfindung durch Matrixbestandteile ausgeschlossen werden konnte.



**Abb. 13: Einfluß der Verdünnung von Eiprobe (dotiert mit 600 µg/kg OTC) auf die Wiederfindung**

### 4.3 Dialyse

Ausgangspunkt für die Wahl des Dialysemodus und des Dialysatvolumens waren die Methoden von Agasøster [151] und von Aerts et al. [149]. Letztere Methode wurde von Oeser [153] in Wuppertal bereits für die Nitrofuranalytik eingesetzt. Die Tab. 8 gibt die Dialyseparameter der entwickelten Methode und die Parameter der beiden in der Literatur beschriebenen Verfahren wieder.

Aus Abb. 8 (Kap. 2.5.3) folgt, daß der Analytübergang von der Donorkammer zur Akzeptorkammer maximal sein wird, wenn es gelingt, die treibende Kraft der Dialyse, einen hohen Konzentrationsgradienten, möglichst lange aufrecht zu erhalten. Dies kann man erreichen, indem der Inhalt der Akzeptorkammer (das Dialysat) mehrmals ausgetauscht wird. Eine maximale Wiederfindung erreicht man durch einmaliges Füllen der Donorkammer und durch mehrmaligen Austausch der Akzeptorkammerlösung, in die die Analyten hinein diffundieren. Agasøster verwendete bei seiner Methode für OTC dieses Prinzip. Dieser Dialysemodus wurde auch bei der neu entwickelten Methode beibehalten. Tab. 8 stellt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Methoden dar.

<b>Parameter</b>	<b>Neu entwickelte Methode</b>	<b>OTC-Verfahren nach Agasøster [151]</b>	<b>Nitrofuran-Verfahren nach Oeser [153]</b>	<b>Amprolium-Verfahren nach van Leeuwen und van Gend [150]</b>
Donorkammerzellvolumen	740 µl	100 µl	740 µl	k.A.
Akzeptorkammerzellvolumen	1350 µl	175 µl	1350 µl	k.A.
Anzahl der Donorkammerpulse	1	1	5 Pulse à 750 µl 1 Puls à 250 µl	1
Probevolumen	740 µl	100 µl	4000 µl	5000 µl
Matrix pro Analyse Matrix : Vollei	247 µg	43,5 µg	1739,1 µg	max. 2500 µg*
Matrixkonzentration in der Probelösung	33 g/100 g	43,5 g/100 g	43,5 g/100 g	max. 50 g/100 g*
Anzahl der Akzeptorkammerpulse	3 Pulse à 1350 µl 1 Puls à 1450	23 à 175 µl	1 kontinuierlich	1 kontinuierlich
Dialysatvolumen	5,5 ml	4,025 ml	8,6 ml	4,2 ml
Angereichertes Dialysatvolumen	5,0 ml	4,025 ml	8,6 ml	2,0 ml
Verhältnis Dialysatvolumen zu Matrix	22,3	92,5	4,945	ca. 2-3*
Wiederfindung	53 %	60 %	33-36 %	18 %

\*Probenmatrix wurde abzentrifugiert; k.A. = keine Angabe in [150]

**Tab. 8: Vergleich der Dialysemodi verschiedener on-line-Dialyse-HPLC-Verfahren**

An folgenden Punkten wurde das Dialyseverfahren optimiert :

- **Dialysatvolumen**

Ein Vergleich der entwickelten Methode mit dem OTC-Verfahren von Agasøster zeigt, daß die jetzt verwendete Dialysezelle um den Faktor 7,4 größer ist als die des OTC-Verfahrens. Die deutlich größere Dialysezelle war notwendig, um bei der UV-Detektion und der gewählten Probenverdünnung eine hinreichende Empfindlichkeit zu erhalten. Das Verfahren nach Agasøster beruhte im Vergleich dazu auf der Dialyse von konzentrierteren Probelösungen und auf einer sehr empfindlichen Detektion. OTC und TC wurden dabei mittels Fluoreszenz-Detektion nach photochemischer Reaktion und pH-Wert-Änderung erfaßt. Zur Bestimmung von OTC verwendete Agasøster ferner TC als internen Standard. Durch eine geringere Matrixkonzentration in der Probelösung, konnte dagegen auf die Wahl eines internen Standards verzichtet werden (siehe Abb. 13), da der Matrixeinfluß auf die Wiederfindung mit abnehmender Matrixkonzentration abnimmt. Als Matrixkonzentrationen wurden 33 g Eiklar oder Vollei oder Plasma in 100 g Probelösung und 25 g Eigelb in 100 g Probelösung gewählt.

- **Dialysemodus**

Ein weiterer Vergleich der vier Dialysemethoden (Tab. 8, unterste Zeile) zeigt, daß zur Erreichung einer bestimmten Wiederfindung nicht nur die Anzahl der Akzeptorkammerpulse, sondern auch das gesamte Dialysatvolumen pro Analyse von Bedeutung ist. Das Verhältnis Dialysatvolumen zur absoluten Matrixmenge (und damit der Analytmenge) in der Probelösung sollte möglichst groß sein. Bei der neu entwickelten Methode lag das Verhältnis bei 247 µg Matrix zu einem Dialysatvolumen von 5,5 ml. Als Quotient ergibt sich die Zahl 22,3. Hierbei ist anzumerken, daß erst mit einem unendlich großen Volumen an Akzeptorkammerlösung alle Analyten aus der Donorkammer in die Akzeptorkammer diffundieren, so daß man mit einem Dialyseverfahren niemals eine absolute Wiederfindung von 100 % erreichen kann. Andererseits ergeben sich auch zeitliche Grenzen, die im folgenden erläutert werden:

- Die kritische Flußrate lag bei 1 ml/min. Da die Akzeptorkammerlösung angesaugt wird, führten schnellere Flußraten des Dilutors 1 zu einem hohen Unterdruck in der Akzeptorkammer und damit zu einem Reißen der Dialysemembran. Nach Verringerung der Flußraten trat dieses Problem nicht mehr auf.

- Eine weitere zeitliche Grenze der Dialysedauer ergab sich durch mitdialysierte Matrixbestandteile. Mit zunehmender Dauer der Dialyse erhöhte sich auch der dialysierte Matrixanteil, der an der unspezifischen Anreicherungssäule angereichert werden konnte und danach über die analytische Säule zum Detektor gelangte. Hierbei konnte es zu Interferenzen von Matrixpeaks und Analytpeaks in den Chromatogrammen kommen. Bei einem konstant gehaltenen Dialysatvolumen von 9,7 ml wurde ermittelt, daß eine Dialysezeit von 36 Minuten bereits zu einer Abnahme der Peakflächenwerte in den Chromatogrammen führte. Bei 56 Minuten Dialysezeit wurden nur noch sehr kleine Peakflächenwerte bestimmt. Im Chromatogramm war allerdings zum Zeitpunkt der Retentionszeiten der Analyten die Grundlinie noch nicht erreicht. Dadurch ist unklar, ob weniger Analyten an der Anreicherungssäule angereichert wurden, oder ob durch die längere Dialysezeit vermehrt Matrixinterferenzen auftraten, die die UV-Detektion der drei Tetracycline behinderten bzw. überlagerten.

Es mußte ein Dialysemodus gefunden werden, der eine relativ hohe Wiederfindung mit einer kurzen Dialysezeit ermöglichte. Nach mehreren Versuchen wurden für den Routinebetrieb die Dialyse-Parameter bei einer relativ hohen Wiederfindung von 53-55 % festgelegt. Die Dialysezeit betrug 15,5 min und das Dialysatvolumen 5,5 ml, welches in 4 Pulsen diskontinuierlich transportiert wurde. Die Akzeptorkammerflußrate betrug 0,72 ml/min. Der Parameter Temperatur war durch die Raumtemperatur festgelegt. Von den 5,5 ml Dialysatvolumen wurden durch einen Schaltvorgang am 6-Wege-Rheodyneventil A nur 5 ml an der Anreicherungssäule angereichert. In den Chromatogrammen von undotierten und dotierten Proben war keine Beeinträchtigung durch Matrixinterferenzen zur Retentionszeit der drei Tetracycline zu erkennen.

- **Akzeptorkammerlösung**

Die in der Literatur für die Eianalytik beschriebenen Akzeptorlösungen waren entweder tridestilliertes Wasser (Oeser [153]) oder ein 0,9 % natriumchloridhaltiger 0,02 mol/l Phosphatpuffer pH 5, der gleichzeitig 0,005 mol/l Heptansulfonsäure als Ionenpaarreagenz [151] enthielt. Hierbei kam es zu Ablagerungen von Matrixbestandteilen, die nicht nur die Akzeptorkammer, sondern auch die Anreicherungssäule verstopften. Die Chromatogramme zeigten verstärkt Matrixinterferenzen. Das von Agasøster eingeführte Ionenpaarreagenz sollte nach seinen Angaben die Retention der drei Tetracycline an der Anreicherungssäule verbessern. Es führte aber zu kürzeren Retentionszeiten bei der verwendeten analytischen Säule

(RP-8), so daß die chromatographische Trennung der drei Tetracycline von ihren Umwandlungsprodukten nicht möglich war.

Die chemische Zusammensetzung einer geeigneten Akzeptorkammerlösung orientierte sich an dem pH-Wert und der Zusammensetzung der Probenverdünnungslösung (PVL), da die PVL die Volleimatrix stabilisieren konnte. Eine Entscheidungshilfe waren hierbei der pH-Wert der Probenverdünnungslösung pH 5,75 und der pH-Wert der Probelösung  $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$ . Als Akzeptorkammerlösung wurde ein 0,06 mol/l Citratpuffer pH 5,85 gewählt. Durch den pH-Wert 5,85 wurde erreicht, daß in der Akzeptorkammer und an der Dialysemembran kaum Hühnereiproteine denaturierten und Ablagerungen bildeten. Die Lösung wurde deshalb als Akzeptorkammerlösung gewählt.

Im folgenden wurde geprüft, ob durch den herrschenden Konzentrationsunterschied zwischen Probe- und Akzeptorkammerlösung (in der Probelösung Citratpuffer mit der Molarität 0,3 mol/l und in der Akzeptorkammerlösung 0,06 mol/l) es zu einem „Gegenstrom-Effekt“ kommt, bei dem Wasser von der Akzeptorkammerlösung durch die Dialysemembran in die Probelösung hineindiffundiert. Dadurch würde die Diffusion der Analyten in die Akzeptorkammer behindert werden. Prinzipiell besteht aber auch die Möglichkeit, daß Citrationen von der Probelösung in die Akzeptorkammer strömen und dabei den Übergang der Analyten in die Akzeptorkammer fördern oder behindern. In einem Kontrollversuch wurde deshalb die Akzeptorkammerlösung durch die Probenverdünnungslösung ausgetauscht und eine Dialyse mit matrixfreier dotierter Probenverdünnungslösung durchgeführt. Die Analyseergebnisse für die beiden Molaritäten des Citratpuffers von 0,06 mol/l und 0,3 mol/l in der Akzeptorkammer waren identisch. Ein Einfluß der unterschiedlichen Molaritäten der Citratpuffer in Donor- und Akzeptorkammer wurde nicht festgestellt. Es wurde Akzeptorkammerlösung mit der geringeren Citratkonzentration für die Analyse von matrixhaltigen Proben verwendet, um den Waschvorgang der Anreicherungssäule vor dem Analyttransfer auf die analytische Säule zu vereinfachen.

- **Reinigung der Dialysezelle**

Die Verwendung einer größeren Dialysezelle als die von Agasøster (Tab. 8) führte bei dem neuen Verfahren zu längeren Füll- und Entleerungszeiten, da man, wie bereits erläutert, zur Vermeidung eines Reißens der Dialysemembran nur bestimmte Flußraten (Volumen/Zeit) nutzen konnte.

Eine relativ aufwendige und zeitintensive Reinigung der Dialysezelle wurde insbesondere zur Vermeidung einer aufgetretenen Analytverschleppung nötig. Zunächst wurden Donor- und Akzeptorkammer 70 Minuten mit Dilutor-0-Lösung

bzw. Akzeptorkammerlösung gereinigt. Diese lange Reinigungszeit konnte schließlich durch den Einsatz von Spüllösungen verkürzt werden. Statt 25 ml wurden nur 15 ml Akzeptorkammerlösung und zusätzlich 3,6 ml Spüllösung verwendet. Es ergab sich eine Zeitersparnis von 9 Minuten, da das Reinigungsvolumen der Akzeptorkammer insgesamt um 6,4 ml reduziert wurde.

Die **chemische Zusammensetzung der Spüllösung** wurde mit Hilfe von einfachen Reagenzglasexperimenten ermittelt. Hierzu wurde mit Wasser denaturiertes, sowie mit Wasser rekonstituierte gefriergetrocknete Ei-Proben in Reagenzgläser und in Greiner-röhrchen gefüllt und wieder entleert. An der Reagenzglaswand blieb stets ein dünner Protein- und Fettfilm zurück. Bei den Versuchen zeigte ein Zusatz von 13 g/l Triton X-100 zu einem 0,3 mol/l Phosphatpuffer pH 5,85 die effektivste Schnell-Reinigungskraft.

Nach Integration der Spüllösung für Donor- und Akzeptorkammer wurde geprüft, ob auf die Reinigung der Akzeptorkammer mit dieser Spüllösung verzichtet werden kann, da die Hauptverschmutzung nur in der Donorkammer zu erwarten war. Die Reinigung der Donorkammer wurde mit 3,6 ml Spüllösung durchgeführt, die Akzeptorkammer wurde gleichzeitig statt mit der Spüllösung mit 3,6 ml Akzeptorkammerlösung gereinigt. Bereits nach 26 Volleiprobe war die Akzeptorkammer so verstopft, daß der Dilutor 1 keine Akzeptorkammerlösung mehr ansaugte. In der Dialysezelle befand sich eine weiße feste Proteinmasse, die - mit der Spüllösung versetzt - wieder zu einem Großteil in Lösung ging.

Für die Analyse von gefriergetrockneten Volleiprobe und von Eigelbprobe ergab sich ein so hoher Reinigungsbedarf, daß auch weiterhin eine relativ lange Reinigungszeit von 1 Stunde pro Analyse nötig war.

- **Untersuchungen zum Luftsegment für die Dialysatschleife**

Um die Notwendigkeit für den Einsatz eines Luftsegmentes in der Dialysatschleife zu untersuchen, wurde geprüft, ob durch das Luftsegment die Wiederfindung oder die Präzision der entwickelten Methode verbessert wurde. Hierzu wurde einfach das Programm einmal mit einem Luftvolumen von 850 µl und ein zweites Mal mit einem Luftvolumen von 0 µl durchgeführt. Als Probe wurde jeweils eine dotierte Volleiprobe mit 200 µg/kg jeweils mit OTC, TC und CTC - detektiert bei 360 nm pH 2,2 - jeweils 8 mal analysiert. Bei vergleichbaren Wiederfindungen streuten die Analyseergebnisse bei Verzicht auf das Luftsegment stärker.

Bei diesem Ergebnis konnte es sich um eine Momentaufnahme des Systems gehandelt haben. Untersuchungsergebnisse über einen längeren Zeitraum hinweg (z.B. Monate),

bei dem auf das Luftsegment verzichtet wurde, liegen nicht vor. Da das System mit Luftsegment gut funktionierte, lag hier kein Grund zur Optimierung vor.

Zur Analytik mittels LC-MS-MS (Kap. 10.3 und Kap. 6.4) und zum Auffinden weiterer Metaboliten (Kap. 6.5) in gewachsenen Proben wurde die Probenaufarbeitung verändert. Die Donorkammer wurde dreimal gefüllt und es wurden insgesamt 7,5 ml Dialysat gewonnen, wovon 7,0 ml an der Anreicherungssäule angereichert wurden. Durch das erhöhte Volumen in Donor- und Akzeptorkammer erhöhte sich die Analysenzeit von 15,5 Minuten auf insgesamt 24 Minuten. Durch Vergleich der Chromatogramme von Blankproben und rückstandshaltigen Proben, die aus den Medikationsstudien stammten, konnten Matrixinterferenzen zur Retentionszeit der drei Tetracycline ausgeschlossen werden. Da das Probevolumen erhöht wurde, verringerte sich nur die Nachweisgrenze, während die Wiederfindung bei dieser veränderten Probenaufarbeitung nicht erhöht wurde.

#### 4.4 Anreicherung

Ziel der on-line Festphasenextraktion war es, quantitativ alle Tetracycline aus dem Dialysat zu extrahieren und den Transfer auf die analytische Säule zu ermöglichen. Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Auswahl eines geeigneten Materials zur Anreicherung von Tetracyclinen. Aufgrund der vorhergehenden Aufreinigung durch die Dialyse gelangen neben den Analyten und niedermolekularen Matrixbestandteile keine makromolekulare Matrixbestandteile auf die Anreicherungssäule. Auf den Einsatz von Restricted-Access Materialien, die den Zugang der makromolekularen Probenbestandteile zum Sorbens unterbinden, wurde daher verzichtet. Bei der Auswahl eines geeigneten Materials standen Polymermaterialien (Divinylbenzol-vernetztes Polystyrol) im Vordergrund, da diese Materialien bereits seit den 70er Jahren zur Bestimmung von Tetracyclinrückständen beschrieben und erfolgreich eingesetzt wurden [181, 182].

Auch Agasøster verwendete bei seinem OTC-Verfahren [151] ein Polymermaterial, welches allerdings zu Beginn der Untersuchungen nicht mehr verfügbar war.

Das als Anreicherungsmaterial verwendete Polymermaterial sollte nach dieser geräte-technischen Modifikation folgende Kriterien erfüllen :

- eine ausreichende Anreicherungskapazität besitzen
- mehrfach-verwendbar, d.h. für mehrere aufeinanderfolgende Analysen verwendbar sein, da ein Wechsel der Anreicherungskartuschen während einer Analysenserie nicht vorgesehen war



- keine Analytverschleppung durch die Anreicherungssäule, d.h. alle angereicherten Analyten sollten innerhalb einer kurzen Transferzeit von der Anreicherungssäule auf die analytische Trennsäule eluiert werden können
- Das Elutionsmittel zum Analyttransfer auf die analytische Trennsäule sollte gleichzeitig auch als Fließmittel für die isokratische Chromatographie der drei Tetracycline von ihren Epimeren dienen können.

Zunächst wurde das Anreicherungsmaterial geprüft. Es wurde Polymermaterial auf der Basis eines Divinylbenzol-vernetzten Polystyrol der Firma Polymer Laboratories (PLRP-S, 50-70 µm Korngröße, 100 Å Porengröße) geprüft, da der Hersteller die Hochdruckstabilität des Materials garantierte. Das Material wurde geprüft, indem eine mit jeweils 600 µg/kg OTC, TC und CTC dotierte Volleprobe mit unterschiedlichen Waschvolumina untersucht wurde. Bei dieser Dotierung werden absolut 240 ng an der Anreicherungssäule angereichert. Im Standardverfahren wird nach der Anreicherung des Dialysates an der Anreicherungssäule dieselbige mit 4 ml Wasser gewaschen. Dieses Waschvolumen wurde in Schritten auf ein Volumen von 15 ml tridest. Wasser erhöht. Bei den Waschvolumina wurden identische Analyseergebnisse erhalten. Eine Elution der angereicherten Analyten durch ein zu hohes Waschvolumen von bis zu 15 ml wurde nicht festgestellt. Höhere Waschvolumina erschienen wenig sinnvoll.

Es wurden auch Untersuchungen zum Durchbruchvolumen mit matrixfreien Standardlösungen mit 4 ml und 15 ml tridest. Wasser durchgeführt. Die Ergebnisse, die mit der Dialyse von 0,01 mol/l oxalsäurehaltigen Standards (600 mg/kg jeweils pro CTC, TC und OTC) und den dotierten Volleproben erhalten wurden, waren bei einem Waschvolumen von 4 ml und 15 ml identisch. Durch diesen Vergleich konnte man abschätzen, daß bei den gewählten unspezifischen Anreicherungsbedingungen keine Analytmenge durch die Anreicherung von Matrixbegleitstoffen verloren ging. Denn es bestand die Möglichkeit, daß mitdialysierte kleinere Matrixbestandteile (< 15 kD) ebenfalls angereichert würden und diese so die Anreicherungskapazität der Anreicherungssäule herabsetzen könnten.

Nachdem ermittelt wurde, daß die drei Tetracycline an dem PLRP-S Material angereichert werden konnten, stellte sich die Frage, welche Elutionskraft das HPLC-Fließmittel haben muß, damit der **Transfer** der angereicherten Analyten auf die analytische Säule stattfinden konnte.

Hierzu wurde der Anteil an Acetonitril und Oxalsäure im HPLC-Fließmittel variiert. Bei einem Acetonitril-Volumen-Anteil, der über 35 % lag, und bei einer gleichzeitigen Oxalsäure-Konzentration von 0,01 mol/l wurden bei der Dialyse von dotierten Volleproben mit je 400 µg/kg konstante Analyseergebnisse erhalten. Bei geringeren Acetonitril-Anteilen im Fließmittel wurden bei schlechter Peakform geringere Flächenwerte für die drei Tetracycline CTC, TC und OTC ermittelt. Erst bei einem Acetonitril-Anteil unter 35 %

Volumen im Fließmittel und unter 4 mM Oxalsäure wurden bei sehr schlechter Peakform abweichend niedrigere Flächenwerte erhalten als beim Fließmittel I (Acetonitril + 0,01 mol/l Oxalsäure, 50 + 50, v + v). Bei diesen Fließmittelbedingungen wurden aber auch bei der Direktinjektion von Standards, d.h. ohne on-line Probenaufarbeitung, geringere Flächenwerte bei ungünstiger Peakform erhalten, womit die geringeren Flächenwerte auch auf eine unzureichende Chromatographie der drei Tetracycline und nicht auf Verluste beim Analyttransfer von der Anreicherungssäule auf die analytische Trennsäule zurückzuführen waren. Bei den Untersuchungen zum Austausch von Oxalsäure durch Ameisensäure als Fließmittel für die LC-MS/MS wurde festgestellt, daß das HPLC-Fließmittel einen sauren pH-Wert im Bereich pH 2 bis 3 haben mußte, damit eine Chromatographie der Tetracycline an der RP-8 Phase stattfinden konnte. Die Fließmittelzusammensetzungen und ihre chromatographischen Eigenschaften wurden im Kapitel Chromatographie erläutert.

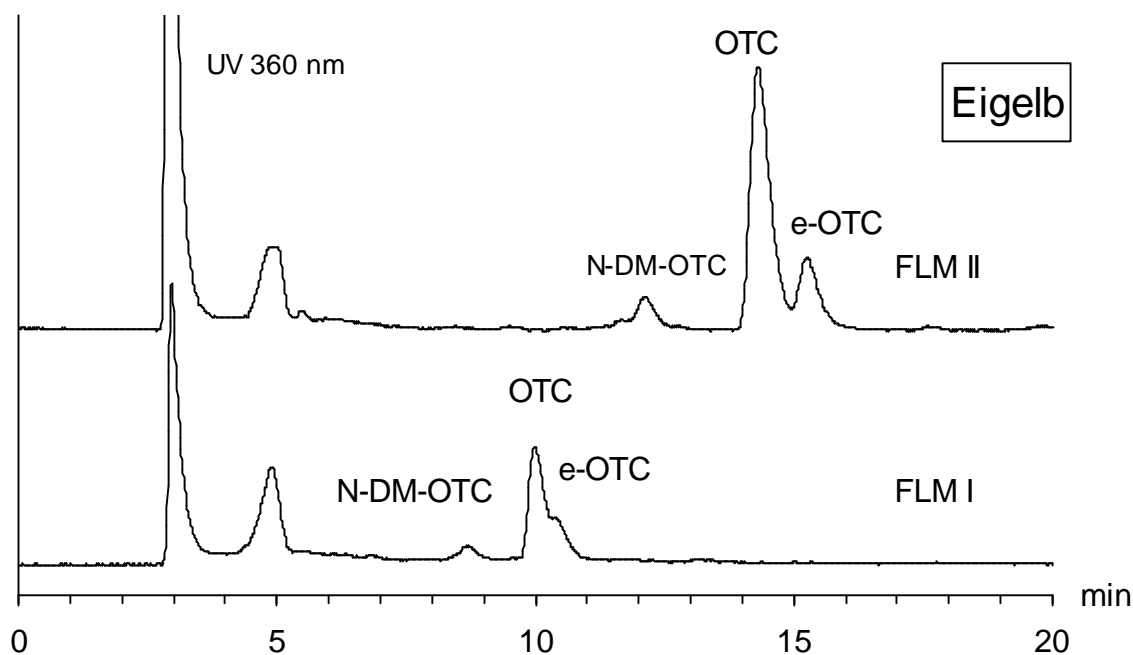
Für die Programmierung der Schaltvorgänge war die Optimierung von Schaltzeiten, die sich aus zu ermittelnden Transferzeiten, Waschzeiten und Elutionsprofilen berechnen, nicht erforderlich. Eine möglichst kurze Transferzeit für den Analyttransfer von der Anreicherungssäule zur analytischen Trennsäule mußte nicht angestrebt werden. Es wurde eine Transferzeit von 30 Minuten gewählt. Nach dem Transfer wurde innerhalb von 51 Minuten die Anreicherungssäule mit tridest. Wasser konditioniert, indem mit Wasser das Elutionsmittel von der Anreicherungssäule entfernt wurde. Der Anreicherungsprozess selbst beschränkte sich auf die Anreicherung von 5 ml analythaltigem Dialysat und einem Waschvolumen von 4 ml tridestilliertem Wasser vor dem Analyttransfer und dauerte 9 Minuten. Durch den Waschvorgang mit 4 ml tridestilliertem Wasser gelangte ein relativ sauberes Dialysat auf die analytische Säule.

Zur Charakterisierung des Verfahrens wurde untersucht, ob innerhalb von 60 Sekunden der Analyttransfer beim PLRP-S Material abgeschlossen war. Hierzu wurde das Eluat der Anreicherungssäule manuell in kleinen Vials aufgefangen, bevor es auf die analytische Säule transferiert wurde. Von diesem Eluat wurde anschließend ein bestimmter Anteil über das manuelle Rheodyne-Ventil auf die analytische Säule gegeben, chromatographiert und dessen Analyt-Konzentration bestimmt. Anhand des Analyseergebnisses wurde errechnet, daß bei einer 50 %-igen Dialyseausbeute innerhalb von 60 Sekunden alle Analyten von der Anreicherungssäule eluiert worden sind.

#### 4.5 Chromatographische Trennbedingungen

Ausgangspunkt für die chromatographische Bestimmung der drei Tetracycline war die von Schmidt [183] angegebene HPLC-Säule, eine Merck Superspher<sup>®</sup> RP-8, 4µm, 25 x 3 mm i.D.,

sowie das von ihm angegebene Fließmittel 0,01 mol/l Oxalsäure, Acetonitril, Methanol, (50 + 50 + 10, v + v + v). Der Einsatz von Methanol in diesem Fließmittel wird in [135] mit einer verbesserten chromatographischen Erfassung von Doxycyclin erklärt, welches mit Methanol im Fließmittel, kurz nach CTC eluiert wird. Auf den Zusatz des Methanols zum Fließmittel wurde verzichtet, weil Doxycyclin nicht Gegenstand dieser Untersuchungen war. Es wurde auch beobachtet, daß durch den Methanolzusatz eine Trennung von e-OTC und OTC nicht möglich war. Zur Untersuchung der Verteilung der Metaboliten, insbesondere in Eigelbproben, war eine Trennung von OTC und e-OTC anzustreben.



**Abb. 14: Chromatogramme einer Eigelbprobe mit gewachsenen Rückständen an OTC**  
**Oberes Chromatogramm : Fließmittel II, Unteres Chromatogramm : Fließmittel I**

Durch die Absenkung der Oxalsäurekonzentration von 0,01 mol/l auf 0,005 mol/l verbesserte sich die Trennung von OTC und seinem Epimer erheblich (Abb. 14). Allerdings war unter diesen Bedingungen zu beachten, daß es zu einer Coelution zwischen N-DM-TC und e-OTC kam (Tab. 9). Die Trennung von OTC und e-OTC gelang nicht gleichermaßen, wenn die Oxalsäurekonzentration bei 0,01 mol/l belassen wurde und der Acetonitrilanteil von 50 % auf 35 % gesenkt wurde.

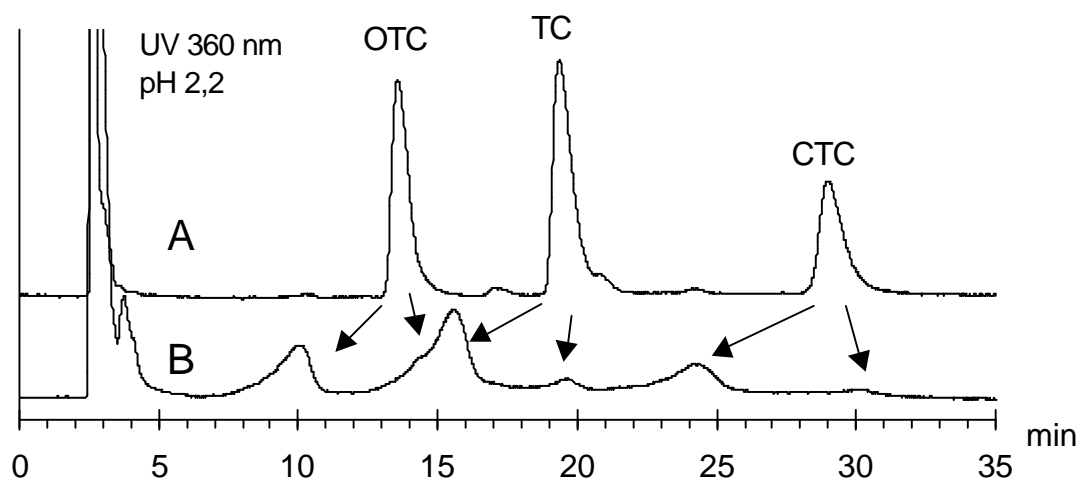
Durch Erhöhung der Oxalsäurekonzentration konnte die Chromatographiedauer der Anhydrotetracycline verkürzt werden. Da das Auftreten der Anhydrotetracycline, sowie von  $\alpha$ - und  $\beta$ -apo-Oxytetracyclin, welches sich aus dem Anhydro-Oxytetracyclin bildet (Kap. 1.3), in Ei- und Plasmaproben nicht beobachtet wurde, erwies sich diese Fließmittelvariante als unnötig.

Es wurde geprüft, ob eine direkte Elution der angereicherten Tetracycline auf die analytische Säule ohne Verlust an chromatographischer Trennleistung möglich war, oder ob durch Waschen der Anreicherungssäule mit tridestilliertem Wasser die chromatographische Trennung der Tetracycline erst möglich oder verbessert wurde.

Es zeigte sich, daß Waschvolumina von 2 bis 4 ml tridest. Wasser unmittelbar nach Anreicherung für eine ungestörte Chromatographie erforderlich waren. Hierbei führten kleinere Waschvolumina zu sehr breiten Peaks mit deutlichem Fronting.

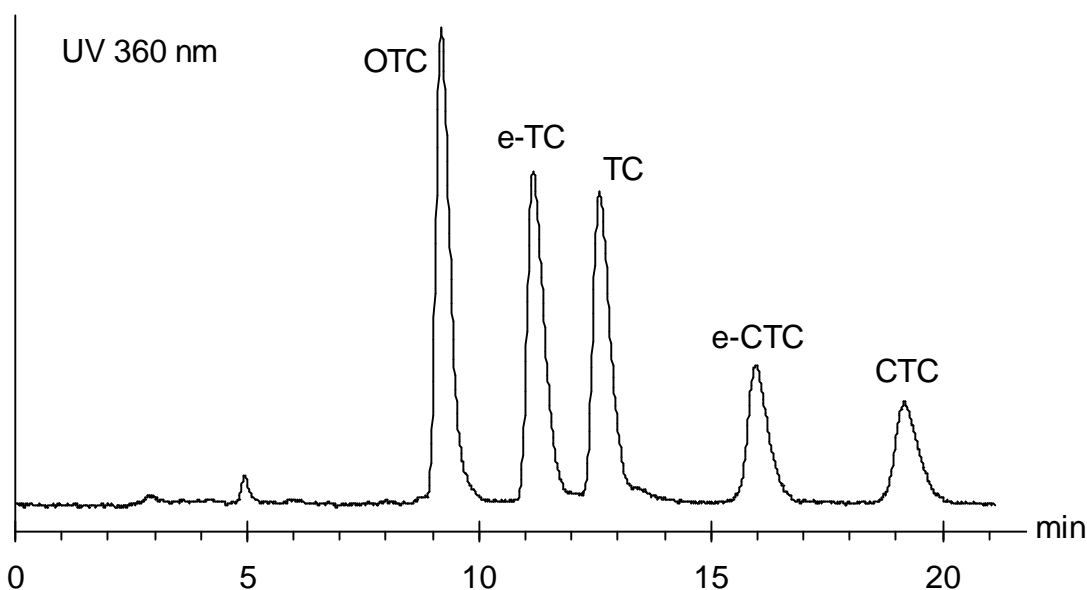
Wurde die in der Anreicherungssäule vorhandene Akzeptorkammerlösung nicht ausgewaschen, so erhöhte sich die Salzfracht und der pH-Wert der mobilen Phase. Bei höherem pH-Wert ließ sich jedoch für Tetracycline und Isotetracycline eine Verschlechterung der Trennleistung an der verwendeten Trennphase (ohne Endcapping) feststellen (Abb. 15). Die Verschlechterung ließ sich vermutlich auf die Wechselwirkung der Analyten mit Silanolgruppen der Trennsäule zurückführen.

Der Waschvorgang ermöglichte die pH-Wert-Änderung von 5,85 der Akzeptorkammerlösung auf pH 2,2 des Fließmittels, indem die Puffersalze des Dialysates mit tridestilliertem Wasser entfernt wurden. Erst bei einem sauren pH-Wert ließen sich die drei Tetracycline (CTC, TC, OTC) und die Isotetracycline (IOTC, ITC, ICTC) chromatographisch trennen.



**Abb. 15: Manuelle Injektion von Standards gelöst in Akzeptorkammerlösung :**  
**Chromatogramm A : pH 2,4 eingestellt mit Phosphorsäure, und**  
**Chromatogramm B : pH 5,85**

**LC-MS-Bestimmungen** erfordern den Einsatz flüchtiger Bestandteile für die mobile Phase, damit es nicht zu Ablagerungen in der Ionenquelle kommt. Mit einem Fließmittel aus Acetonitril und 0,5 % wäßriger Ameisensäure (40 + 60. v/v) ließ sich unter Verzicht auf die nicht-flüchtige Oxalsäure eine Basislinientrennung von OTC, e-TC, TC, e-CTC und CTC erzielen (Abb. 16).



**Abb. 16:** Chromatogramm einer Standardlösung mit OTC, TC und CTC, die bei 6°C im Kühlschrank 12 Monate gelagert wurde. Fließmittel : Acetonitril + 0,5 % Ameisensäure in Wasser, 40 +60, v +v. Detektion UV 360 nm pH 2,2

#### 4.6 Chromatographische Bestimmung der Tetracycline, der Anhydrotetracycline, der Isotetracycline und ihrer Epimere

Neben den drei Tetracyclinen CTC, TC und OTC sowie ihrer Epimere wurden die Anhydrotetracycline und die drei Isotetracycline (IOTC, ITC, ICTC) chromatographisch getrennt. Die chromatographischen Bedingungen für diese Umwandlungs- und Dehydratationsprodukte wurden ermittelt. Tab. 9 gibt die Retentionszeiten dieser Substanzen bei zwei verschiedenen Fließmitteln wieder. Die Wegstrecke vom Säulenende bis zum Detektor war bei den zwei Detektionsarten UV- und Fluoreszenz-Detektion unterschiedlich, so daß sich hier z.B. für das ICTC und e-ICTC unterschiedliche Retentionszeiten ergaben.

In Tab. 9 sind auch Retentionszeiten von Substanzen aufgeführt, die kommerziell nicht erhältlich sind. Da das Isooxytetracyclin (IOTC), das Isotetracyclin (ITC) und das e-ICTC als Umwandlungsprodukte von OTC, TC und ICTC gewonnen wurden, waren diese Substanzen nur in geringer Reinheit verfügbar. Die N-Desmethyldrivate, die nur in Eigelb-, Plasma- oder Volleipproben nachgewiesen wurden, waren nicht als Standards verfügbar und wurden nicht als Vergleichssubstanzen hergestellt. Die Identifizierung dieser *in vivo* gebildeten Substanzen wird in Kap. 6.4 beschrieben. Die Reinheit der Standards (CTC, ICTC, IOTC, ITC, Apo-Oxytetracyclin) wird im Anhang 12.1 beschrieben.

Analyt	als reine Standard- Substanz (> 80%) verfügbar	Retentionszeit [min.]	
		Fließmittel I : 0,01 mol/l Oxalsäure, Acetonitril 50 : 50, v+v	Fließmittel II : 0,005 mol/l Oxalsäure, Acetonitril 50 : 50, v+v
Isooxytetracyclin	nein	--	12,7*/11,0
e-N-DMOTC + N-DMOTC	nein	8,8	12,3
α-apo-Oxytetracyclin	ja	9,3	13,1
β-apo-Oxytetracyclin	ja	10,1	14,3
OTC	ja	10,1	14,3
e-OTC	ja	10,6	15,2
Isotetracyclin	nein	11,9*/10,2	16,4*/14,6
N-Desmethyl-ICTC	nein	12,2*/10,6	17,5*/15,3
e-N-DMTC + N-DMTC	nein	10,5/11,4	15,8/17,8
e-TC	ja	11,8	18,3
TC	ja	13,1	20,5
e-ICTC	nein	13,9*/12,4	20,9*/19,3
ICTC	ja	15,0*/13,5	22,8*/21,0
e-CTC	ja	15,9	25,0
CTC	ja	19,0	29,4
4-Epi-Anhydrotetracyclin	ja	27,5	-
Anhydrotetracyclin	ja	34,3	-
4-Epi-Anhydrochlortetracyclin	ja	42,5	-
Anhydrochlortetracycline	ja	54,7	-

\*Fluoreszenzdetektion ansonsten UV-Detektion bei 310 nm (Isotetracycline), 360 nm Tetracycline und apo-Oxytetracycline, und 420 nm Anhydrotetracycline.

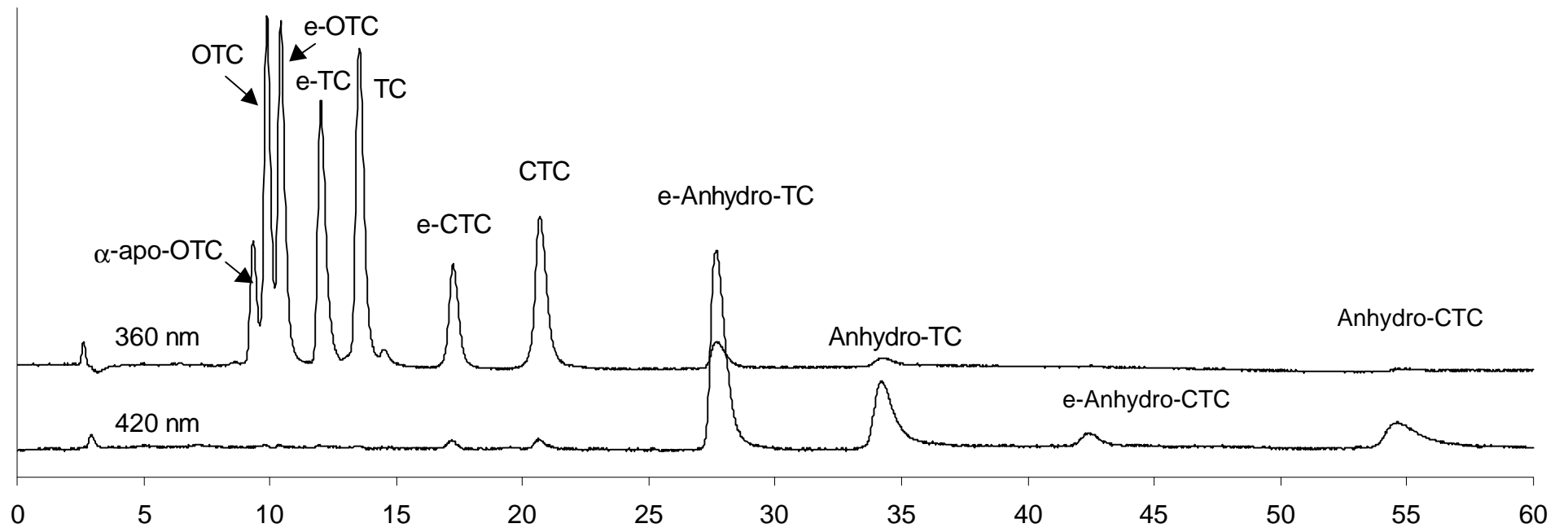
**Tab. 9: Retentionszeiten der Tetracycline, der Anhydro- und Iso-tetracycline, und N-Desmethylderivate bei zwei Fließmitteln**

Aus den Retentionszeiten ist zu erkennen, daß nicht alle Substanzen basisliniengetrennt eluiert wurden. Um diese Substanzen nebeneinander zu erfassen und ihnen Retentionszeiten zuordnen zu können, waren mehrere Detektionsarten erforderlich. Die Bestimmung der drei Tetracycline, ihrer Epimere, der N-Desmethylderivate des TC und des OTC, sowie des α- und β-apo-Oxytetracyclins wurde bei 360 nm durchgeführt, die Bestimmung der Anhydroderivate des TC und des CTC sowie ihrer Epimere bei 420 nm. Die Bestimmung der Isotetracycline mittels Fluoreszenz-Detektion geschah wahlweise bei 350 nm als Anregungswellenlänge für

ICTC und 335 nm als Anregungswellenlänge für Isooxytetracyclin und Isotetracyclin sowie bei 420 nm als Emissionswellenlänge für alle drei Isotetracycline. Die Fluoreszenz-Detektion der Isotetracycline wurde nach einer pH-Wertänderung von pH 2,2 auf pH 12,0 durchgeführt. Zwischen dem Fluoreszenz-Detektor und der hierbei eingesetzten zusätzlichen HPLC Pumpe 3 (Abb. 9) wurde noch ein zusätzliches Reaktionscoil eingeführt, was zu einer Retentionszeitverschiebung zu längeren Zeiten führte. Zur Absicherung der Ergebnisse der Medikationsversuche wurden Standards und Vollei-, Eigelb- und Eiklarproben mit besonders hohen Rückstandsgehalten mittels LC-MS/MS untersucht.

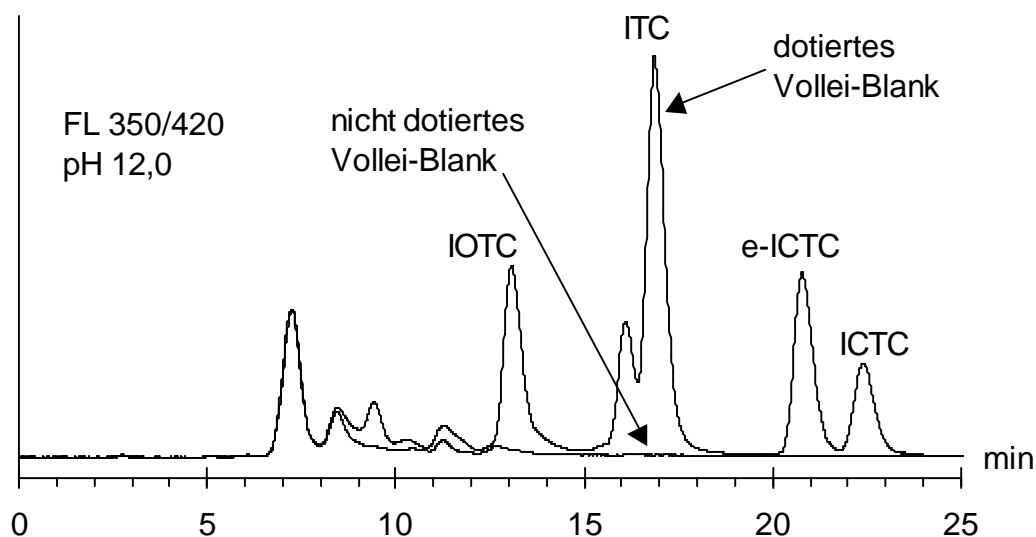
Die Abb. 17 zeigt die Chromatographie mit Fließmittel I eines Standardgemisches (in HPLC-Fließmittel I gelöst, manuelle Injektion), welches die Tetracycline und ihre Epimere, sowie die Anhydrotetracycline mit ihren Epimeren enthält. Die Abb. 17 zeigt, daß bei 420 nm pH 2,2 die Anhydrotetracycline detektierbar und die Tetracycline nicht detektierbar sind.

Die **Keto-Enol-Tautomere** wurden an der RP-8 Phase bei Raumtemperatur nicht chromatographisch getrennt. Ein Problem bei diesen Untersuchungen war die Tatsache, daß die Keto-Enol-Tautomere nicht als Standards verfügbar sind. Prinzipiell bestand die Möglichkeit, daß die drei Tetracycline und ihre Epimere mit den Keto-Enol-Tautomeren coeluierten.



**Abb. 17: Chromatographische Trennung und Detektion der Tetracycline,  $\alpha$ -apo-Oxytetracyclin bei 360 nm pH 2,2 und der Anhydrotetracycline des TC und CTC bei 420 nm pH 2,2 mit Fließmittel I, Mischstandard gelöst in FLM 1, manuelle Injektion.**

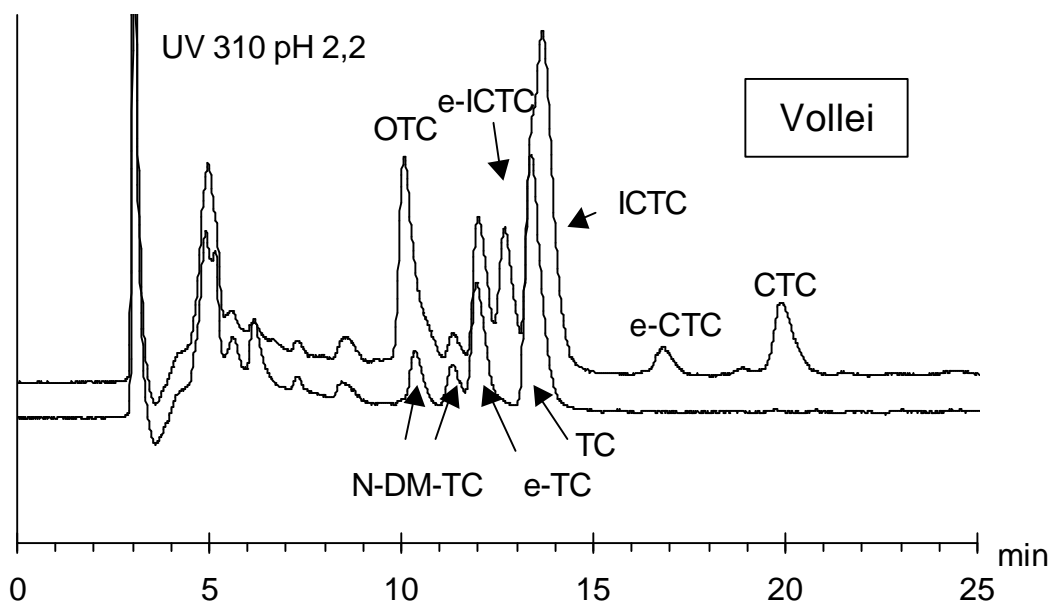




**Abb. 18: Chromatographische Trennung und Detektion der Isotetracycline und ihrer Epimere vor sowie nach Dotierung einer Vollei-Blankprobe.**  
**Alle Gehalte wurden über das ICTC berechnet und betragen 70 µg/kg IOTC, 190 µg/kg ITC und 70 µg/kg e-ICTC und 40 µg/kg ICTC**

Die Abb. 18 zeigt die Chromatogramme eines Volleiblanks und einer mit den drei Isotetracyclinen (IOTC, ITC, ICTC) dotierten Volleiprobe mit Fließmittel II, Detektion mit einer Anregungswellenlänge bei 350 nm und einer Emissionswellenlänge bei 420 nm. Aus dem Chromatogramm ist auch ersichtlich, daß Isooxytetracyclin und Isotetracyclin neben ICTC zu detektieren sind.

Durch die Vielzahl an Analyten und durch die Wahl der unterschiedlichen Fließmittel und Detektionsarten wurde die Ermittlung der Retentionsreihenfolge erschwert. Da, wie aus Tab. 9 hervorgeht, auch Coelution vorliegt, ist eine Kenntnis der Retentionsreihenfolge wichtig. Da die N-Desmethylderivate nicht als Standards existieren, wurde zur Ermittlung der Retentionsreihenfolge bei 310 nm UV pH 2,2 die Chromatogramme von zwei Volleiprobe mit gewachsenen Rückständen übereinander gelegt (Abb. 19). Die Proben stammten aus zwei verschiedenen Medikationsstudien, bei der mit 750 mg/kg die gleiche Konzentration an TC im Hühnerfutter vorlag. Die Volleiprobe hatten auch das gleiche Legedatum und sollten daher vergleichbar sein. Die Detektion bei 310 nm wurde gewählt, damit die Tetracycline und die Isotetracycline detektiert wurden. Das obere Chromatogramm ist das Chromatogramm einer Volleiprobe mit gewachsenen Rückständen an CTC, TC und OTC, das untere Chromatogramm ist das Chromatogramm einer Probe mit Tetracyclinrückständen. Durch Vergleich der beiden Chromatogramme (bei Fließmittel I) der Abb. 19 ergab sich eine Elutionsreihenfolge der Analyten, die in Tab. 9 wiedergegeben ist. Diese Reihenfolge wurde mittels LC-MS-MS bestätigt.



**Abb. 19:** Retentionsreihenfolge der Tetracycline und der *in vivo* gebildeten Metaboliten, detektiert bei 310 nm pH 2,2. Oberes Chromatogramm : Probe mit OTC-, TC- und CTC-Rückständen, Unteres Chromatogramm : Probe mit Rückständen an TC

#### 4.7 Detektion von Tetracyclinen und Isotetracyclinen mittels UV-, Fluoreszenz- und Massenspektroskopie

Die Bestimmung der drei Tetracycline wurde durch die Wahl einer möglichst selektiven chromatographischen Trennung und eines selektiven Detektionsverfahrens mit dem Ziel entwickelt, zwischen den in den Medikationsstudien eingesetzten Wirkstoffen und anderen Substanzen (Matrixinhaltsstoffen, Umwandlungsprodukten und Metaboliten) zu unterscheiden. Die Dialyse kann nur höhermolekulare Substanzen abtrennen, hingegen kann die Anreicherungssäule auch andere niedermolekulare Substanzen als die Zielanalyten anreichern. Damit liegt der Methode eine nicht allzu spezifische Probenaufarbeitung zugrunde. Die für den Routinebetrieb entwickelte Methode erlaubt zwar keine eindeutige Identifizierung, die molekularspektrometrischen Methoden vorbehalten ist, jedoch konnten mit Hilfe der massenspektroskopischen, der UV- und Fluoreszenz-Detektion wichtige Informationen zur Struktur der Analyten zusammengetragen werden. Die UV- bzw. Fluoreszenz-Detektion ermöglichte hierbei die Unterscheidung der Tetracycline von den Isotetracyclinen. Es wurden außerdem bei Blankproben keine Matrixinterferenzen im Bereich der Elutionszeiten der Analyten beobachtet. Die Detektion sollte außerdem so selektiv sein, daß die drei Tetracycline und ihre Epimere neben den drei Isotetracyclinen und ihren

Epimeren detektiert werden können, da - wie aus Tab. 9 hervorgeht - teilweise Coelution von Tetracyclinen und Isotetracyclinen vorlag.

Die Anhydrotetracycline beeinträchtigten nicht die Detektion der anderen Tetracycline, da sie erst nach dem CTC eluierten und bei 425 nm detektiert werden konnten. Eine Besonderheit stellte das  $\alpha$ - $\beta$ -apo-Oxytetracyclin dar, das ein ähnliches UV-Spektrum wie OTC aufweist. Auf die Anwesenheit von apo-Oxytetracyclin mußte deshalb in biologischen Proben aus Medikationsstudien gezielt geprüft werden. Die Ergebnisse sind in Kap. 6 dargestellt.

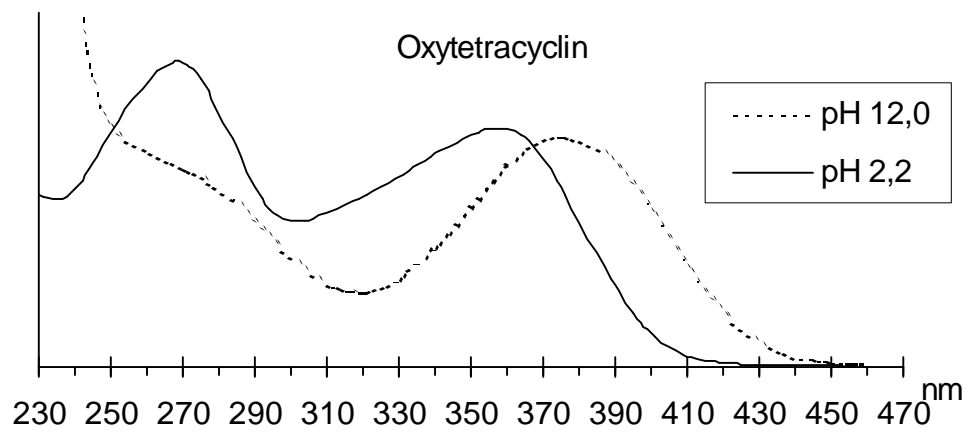
In folgenden Schritten wurde die Detektion von Tetracyclinen und Isotetracyclinen untersucht:

- **Untersuchungen zur UV-Detektion**

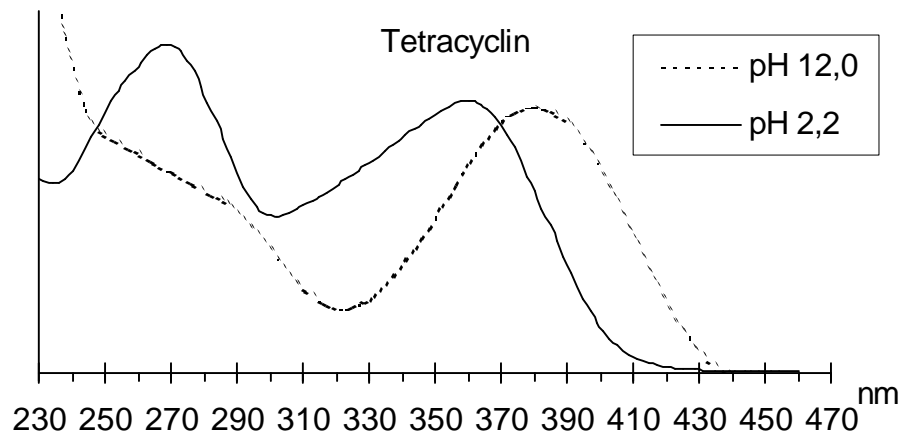
Ausgangspunkt für die Detektion der drei Tetracycline waren mehrere in der Literatur beschriebene Detektionsverfahren, die die Detektion der Tetracycline bei 350 oder 360 nm beschreiben [169]. Bei der Analyse pharmazeutischer Präparate, insbesondere bei der Untersuchung auf Epimere wird auch die Wellenlänge 280 nm genutzt, bei der die Tetracycline ihr Hauptmaximum haben und sich die Epimere deutlich von ihren Muttersubstanzen unterscheiden [10, 11].

Zur Ermittlung und Überprüfung der Detektion mittels UV sollte bei zwei Werten der Einfluß des pH-Wertes auf die UV-Detektion der drei Tetracycline, der drei Isotetracycline sowie ihrer Epimere untersucht werden.

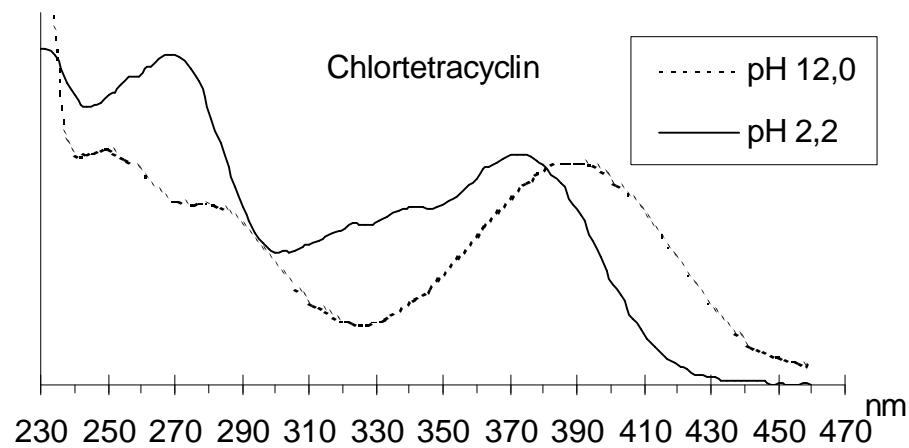
Hierzu wurde mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) von den chromatographisch getrennten Substanzen UV-Spektren bei pH 2,2 und pH 12,0 aufgenommen (Abb. 20, 21, 22). Für die Aufnahme der UV-Spektren bei pH 12,0 wurde zwischen dem HPLC-Säulenausgang und dem DAD über ein T-Stück von einer weiteren HPLC-Pumpe ein alkalischer Natrium-Glycin-Puffer pH 12,0 zugepumpt. Zwischen dem T-Stück und dem DAD wurde ein 5 m langes Reaktionscoil eingebaut, um pH-Wert-Änderungen in der Meßzelle des DAD zu vermeiden. Diese Vorgehensweise war notwendig, um die für Standards erhaltenen UV-Spektren mit UV-Spektren von Substanzen vergleichen zu können, welche in Proben mit gewachsenen Rückständen festgestellt wurden. Hierdurch wurde sichergestellt, daß die Meßbedingungen bei Standard-Substanz und unbekannter Substanz aus einer Probe eines Medikationsversuches nahezu gleich waren. Ein weiterer Vorteil war die Tatsache, daß durch die chromatographische Trennung Spektren von reinen Substanzen erhalten wurden. Das Spektrum des HPLC-Fließmittels wurde ebenfalls bei den zwei pH-Werten aufgenommen und ist im Anhang 12.2 dokumentiert. Bei allen Untersuchungen wurde aus Kostengründen technisches Acetonitril, welches über Kaliumcarbonat destilliert wurde, verwendet. Störungen durch nicht abgetrennte Verunreinigungen des Fließmittels wurden im Bereich von 250 bis 470 nm nicht beobachtet.



*Abb. 20: DAD-Spektrum von OTC bei pH 12,0 und pH 2,2*



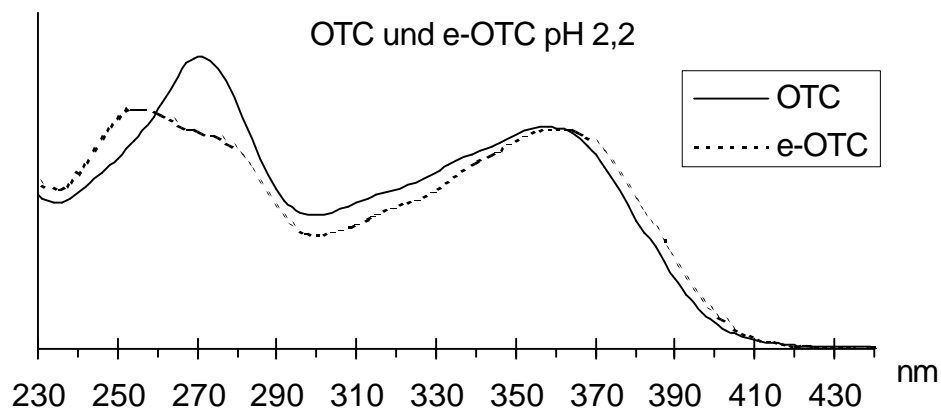
*Abb. 21 : DAD-Spektrum von TC bei pH 12,0 und pH 2,2*



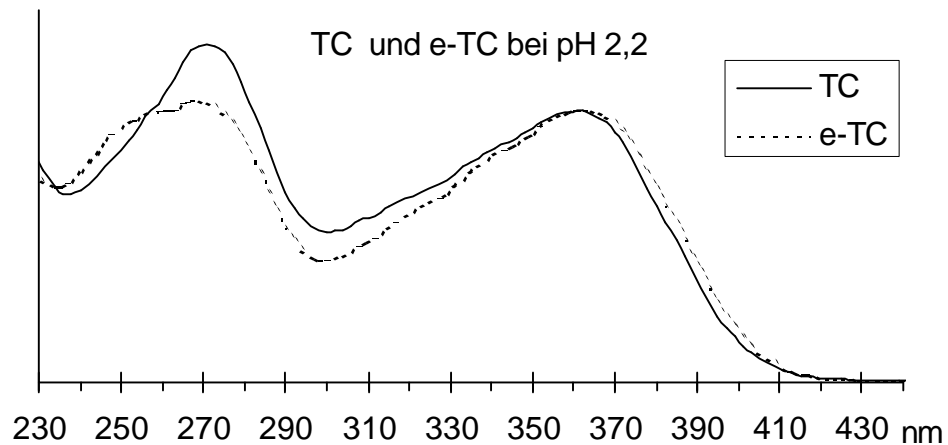
*Abb. 22: DAD-Spektrum von CTC bei pH 12,0 und pH 2,2*

- **UV-Spektren vom Epimer und Muttersubstanz bei pH 2,2**

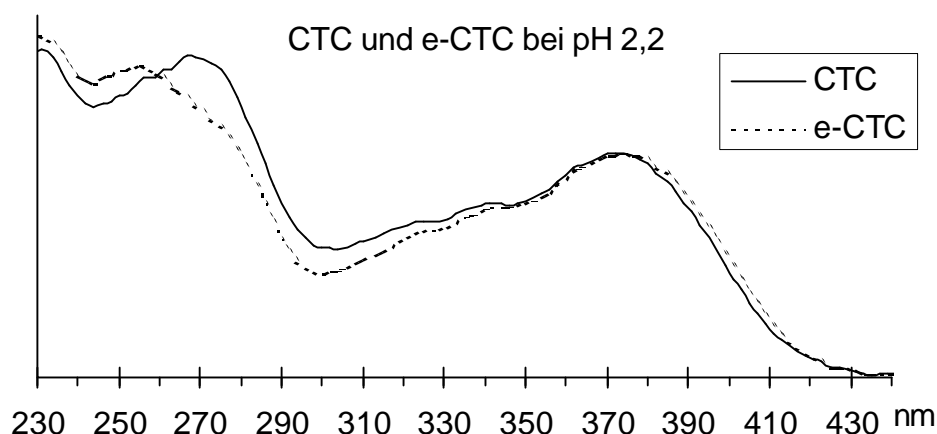
In der umfangreichen Literatur zur Tetracyclinanalytik werden die Epimere über die UV-Absorption der als Standard verwendeten Muttersubstanzen quantifiziert. Diese übliche Praxis und Vorgehensweise sollte durch eigene Untersuchungen überprüft werden. Die Identifizierung der Epimere von CTC, TC und OTC erfolgt in der Literatur und bei unseren Untersuchungen über die von der Firma Acros Organics (Vertrieb: Fisher Scientific) vertriebenen Epimere.



*Abb. 23: DAD- Spektren von OTC und e-OTC bei pH 2,2*



*Abb. 24 : DAD- Spektren von TC und e-TC bei pH 2,2*

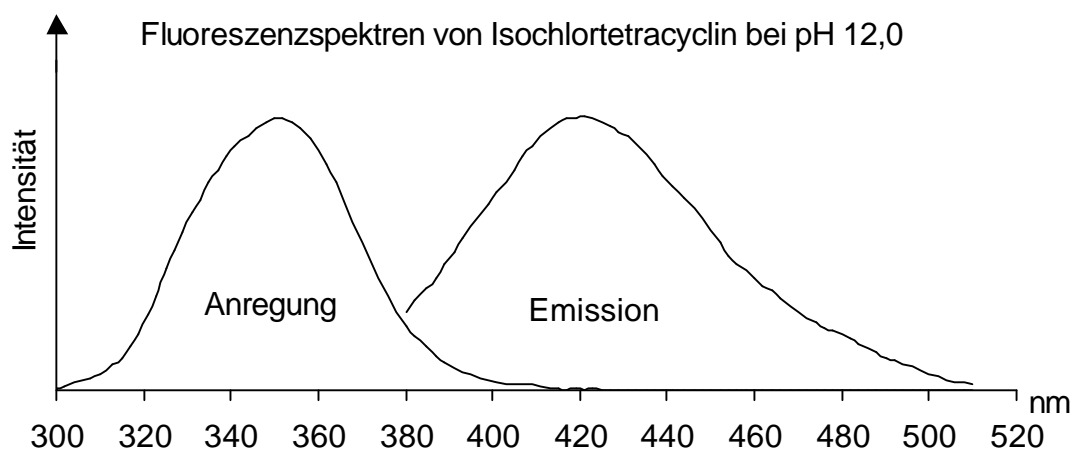


**Abb. 25: DAD-Spektren von CTC und e-CTC bei pH 2,2**

Als Wellenlänge zur Detektion der drei Tetracycline OTC, TC und CTC sowie ihrer Epimere (Abb. 23, 24, 25) wurde 360 nm UV in Verbindung mit dem pH-Wert 2,2 der mobilen Phase gewählt. Durch diese Untersuchung wurde die in der Literatur beschriebene Praxis, die Epimere über die UV-Absorption der als Standards verwendeten Muttersubstanzen zu quantifizieren, überprüft.

- **Untersuchungen zur Bestimmung des Isochlortetracyclins mittels Fluoreszenz-Detektion**

Die fluorimetrische Bestimmung des CTC nach Überführung in das ICTC wurde bereits 1947 von Levine et al. [109] beschrieben. Abb. 26 zeigt das Anregungs- und Emissionsspektrum des ICTC. Das Fluoreszenzspektrum wurde ermittelt, indem die Anregungswellenlänge auf das Absorptionsmaximum (350 nm) fest eingestellt wurde und die emittierte Intensität der Strahlung wellenlängenabhängig aufgezeichnet wurde. Umgekehrt wurde das Anregungsmaximum ermittelt, indem das Maximum der Emission (420 nm) fixiert und der energiereiche Wellenlängenbereich gescannt wurde. Maximale Fluoreszenzintensitäten wurden erreicht, wenn eine Anregungswellenlänge von 350 nm und eine Emissionswellenlänge von 420 nm gewählt wurden.



**Abb. 26:** *Anregungs- und Emissionspektrum von ICTC, in Acetonitril- 0,01 mol/l Oxalsäure (50:50, v + v), Schichtdicke: 1 cm, gemessen gegen Acetonitril - 0,01 mol/l Oxalsäure (50:50, v + v)*

Ausgangspunkt für die Entwicklung der Fluoreszenz-Detektion zur Bestimmung des *in vivo* gebildeten ICTC war die von Bryan et al. [20] entwickelte Nachsäulen-derivatisierung zur Bestimmung des CTC nach on-line Überführung in das ICTC.

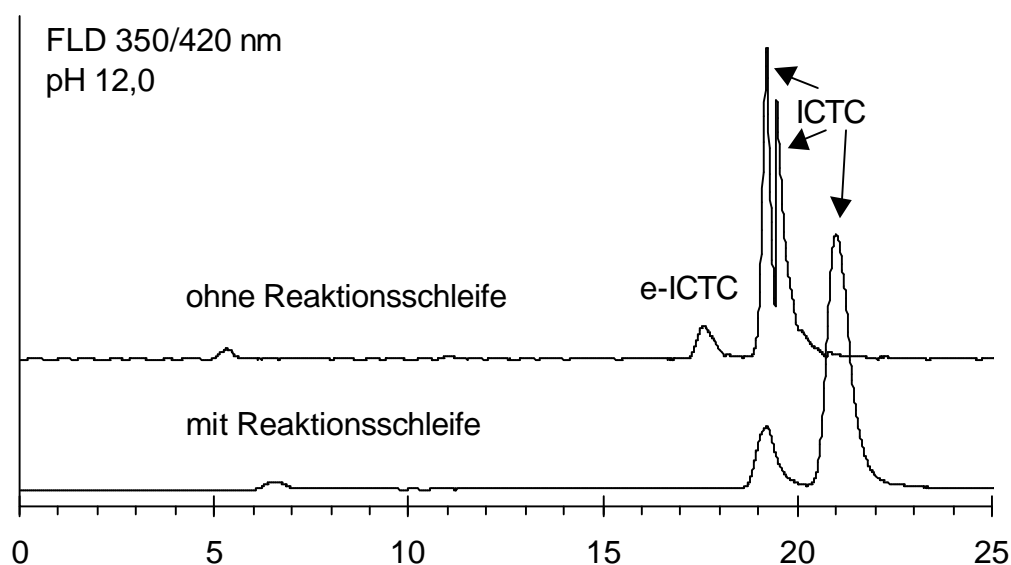
Auf den Einsatz eines beheizten Reaktionscoils wurde verzichtet, da das bereits in der biologischen Probe vorhandene und chromatographisch vom CTC abgetrennte ICTC in Gegenwart von coeluiertem TC bestimmt werden sollte. Durch die Fluoreszenz-Detektion wurde nur ICTC detektiert, was durch Dotierungsversuche mit TC überprüft wurde. Aus diesen Gründen wurden bei gewachsenen Proben mit Rückständen an TC und CTC das CTC und e-CTC bei UV 360 nm und pH 2,2 und mittels einer separaten Fluoreszenz-Detektion die Isoderivate des CTC bestimmt. Da die Meßzelle des UV-Detektors nicht druckstabil war und für die Fluoreszenz-Detektion eine Nachsäulen-Pumpe eingesetzt wurde, ist eine simultane UV- und Fluoreszenz-Detektion in einem chromatographischen Lauf nicht durchgeführt worden. Mit einer druckstabilen UV-Zelle wäre eine Bestimmung von e-CTC, CTC, N-DM-ICTC, e-ICTC und ICTC mit einer Analyse und zwei Detektionsarten möglich.

Eine simultane Bestimmung des ICTC und des CTC in Volleproben - bei Abwesenheit von TC- und OTC-Rückständen - wurde mittels UV-Detektion bei 310 nm und pH 2,2 realisiert.

Als optimale Flußrate für die Nachsäulen-Pumpe 3 (s. Abb. 10) wurde eine Flußrate von 0,1 ml/min gewählt. Als Nachsäulenreagenz wurde in Anlehnung an das Vorsäulenreagenz von Blanchflower et al. [170] ein 0,4 mol/l Natrium-Glycinpuffer bei pH 12,0 gewählt. Die von Bryan et al. [20] verwendete 25 % Natronlauge bei

pH 14 wurde nicht verwendet, um eine Schädigung der HPLC-Pumpe und der Meßzelle des Fluoreszenzdetektors bei Dauerbetrieb zu vermeiden. Die relativ hohe Molarität des Nachsäulenreagenzes von 0,4 mol/l wurde deshalb gewählt, damit der pH-Wert vor dem Erreichen der Meßzelle im Fluoreszenzdetektor zwischen 11,8 und 12,0 lag, da die Peakflächenwerte pH-abhängig waren.

Nach der HPLC-Pumpe 3 wurde eine 5 m lange Reaktionsschleife, i.D. 0,3 mm in das System eingebaut, da sonst in unreproduzierbarer Art und Weise Peakaufspaltungen im Chromatogramm sichtbar wurden (Abb. 27).



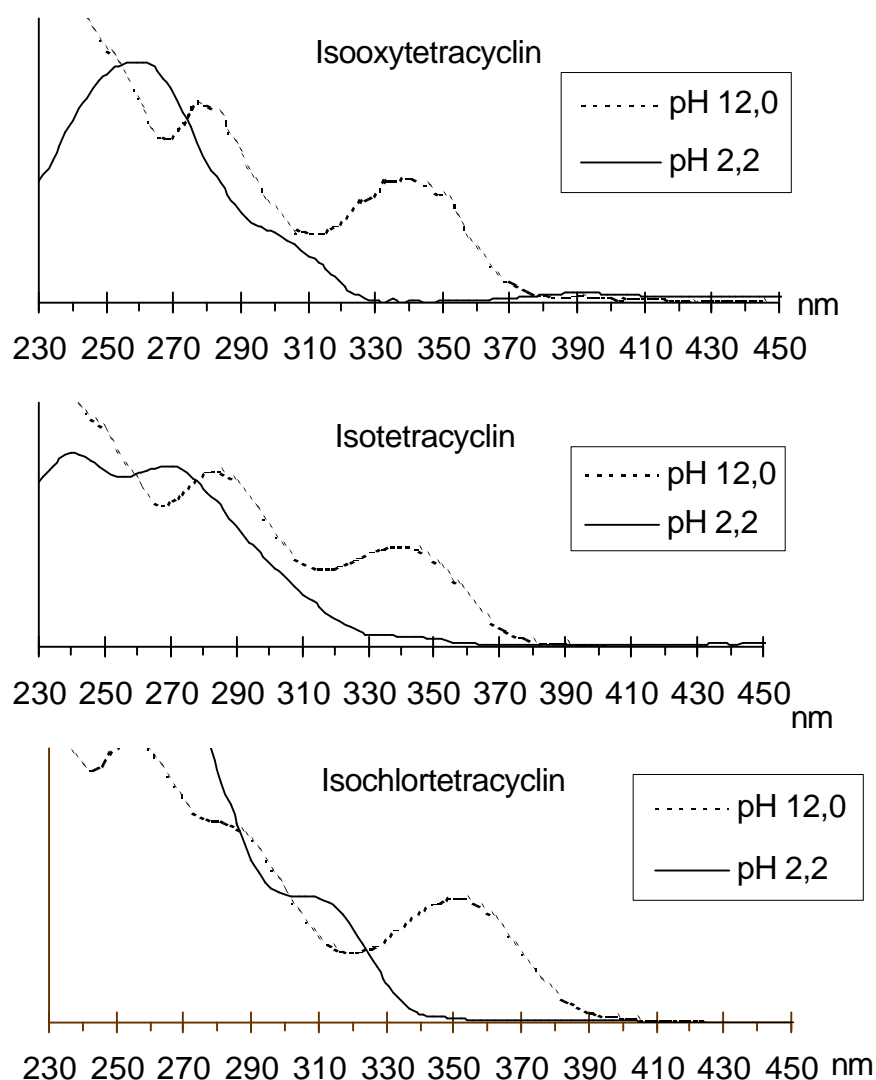
**Abb. 27: Chromatogramm eines ICTC-Standards (Fluoreszenzdetektion) jeweils mit Nachsäulen-pH-Wert-Änderung.**  
**Oberes Chromatogramm: ohne Reaktionsschleife (coil)**  
**unteres Chromatogramm: mit Reaktionsschleife**

Beim ICTC-Peak war ohne Reaktionsschleife eine Peakaufspaltung zu erkennen, die auf eine unzureichende pH-Wert Einstellung zurückzuführen war. ICTC zeigt bei sauren pH-Werten keine Fluoreszenz. Die Peakaufspaltung war unregelmäßig und nicht in jedem Chromatogramm so deutlich zu sehen. Der Einsatz der Reaktionsschleife zur besseren pH-Werteinstellung wurde beibehalten, um eine zufällige Fehlerquelle ausschließen zu können. Aufgrund der Reaktionsschleife und der Nachsäuleneinheit ergab sich gegenüber der UV-Detektion eine Retentionszeitverschiebung von ca. 1,8 Minuten. Bei größeren Verschiebungen wurde die Dichtheit und die Flußraten der Pumpen 2 und 3 überprüft.



- **Untersuchungen zur selektiven UV-Bestimmung der Tetracycline bei 360 nm bei Anwesenheit von ICTC in biologischen Proben**

Um die drei Tetracycline mittels UV bei 360 nm neben den Isotetracyclinen zu bestimmen wurde geprüft, ob die Isotetracycline bei 360 nm pH 2,2 die UV-Detektion der Tetracycline beeinträchtigen. Hierzu wurden - wie bereits erläutert - UV-Spektren mit einem Diodenarray-Detektor bei zwei pH-Werten aufgenommen. Da nur das ICTC kommerziell erhältlich ist, wurden zuvor Isooxytetracyclin (IOTC) und Isotetracyclin (ITC) als Standards aus OTC und TC hergestellt. Die Herstellung und die Charakterisierung der Isotetracycline ist im Kap. 10.5 (Arbeitsvorschriften) dargestellt. Abb. 28 zeigt die DAD-Spektren für die drei Isotetracycline bei den zwei pH-Werten pH 2,2 und pH 12,0.



**Abb. 28:** DAD-Spektren von Isooxytetracyclin, Isotetracyclin und Isochlortetracyclin bei zwei pH-Werten pH 12,0 und pH 2,2

Aus den UV-Spektren bei pH 2,2 ist zu erkennen, daß die Isotetracycline beim pH 2,2 und der Wellenlänge 360 nm allenfalls nur eine minimale UV-Absorption zeigen. Die Selektivität der UV-Detektion wurde überprüft, indem Vollei mit ICTC unterschiedlicher Konzentration dotiert wurde und bei der Detektion 360 nm pH 2,2 untersucht wurde, ab welcher ICTC-Konzentration auch bei diesem pH-Wert eine UV-Absorption meßbar wurde. Da in gewachsenen Proben mit Rückständen an CTC und TC eine Coelution von TC und ICTC zu erwarten war, ist diese Bestimmung auch für die quantitative Erfassung des TC von besonderer Bedeutung. Es wurden Konzentrationen von 400 bis 700 µg/kg ICTC in Vollei für diese Untersuchungen verwendet. Die untersuchten ICTC-Vollei-Standards waren nur zu einem geringen Anteil (□ 10%) epimerisiert. Größere Konzentrationen als 700 µg/kg pro Substanzpeak, bzw. 1400 µg/kg als Summe von e-ICTC und ICTC (bei 50 % Epimerisierung) wurden nicht bei 360 nm UV pH 2,2 untersucht, da solch hohe Konzentrationen keine praktische Bedeutung bei Proben mit gewachsenen Rückständen an TC und CTC hatten. Die höchste gewählte Konzentration an ICTC von 700 µg/kg Vollei täuschte bei der UV-Detektion 360 nm und pH 2,2 einen TC-Gehalt von 11 µg/kg vor. Dieser analytische Wert lag unter der Bestimmungsgrenze. Bei den Untersuchungen zeigte sich, daß bei den gewählten Untersuchungsbedingungen keine Störung der TC-Bestimmung durch die Anwesenheit von ICTC zu erwarten war, die zu einem bedeutenden Meßfehler hätte beitragen können.

Die DAD-Spektren der Abb. 28 und der Abb. 20, 21, 22 zeigen auch, daß bei einem alkalischen pH-Bereich (hier pH 12) die Isotetracycline und die Tetracycline bei UV 360 nm bestimmt werden könnten, was aufgrund der Coelution nicht erwünscht war (siehe Tab. 9). Erst durch die Fluoreszenz-Detektion wurde die selektive Bestimmung der drei Isotetracycline in Gegenwart der drei Tetracycline möglich, da die Tetracycline ein anderes Emissionsmaximum aufweisen. Andererseits ist eine selektive Bestimmung der Tetracycline mittels UV-Detektion ohne die gleichzeitige Erfassung der Isotetracycline bei 360 nm UV nur bei einem sauren pH-Wert möglich.

Es blieb nun noch zu überprüfen, ob Tetracycline im alkalischen pH Bereich nach Anregung bei 350 nm auch Licht bei 420 nm emittieren könnten und so die Anwesenheit von Isotetracyclinen vortäuschen könnten.

Dazu wurden Volleiprobe, die mit den drei Tetracyclinen (CTC, TC, OTC) dotiert worden waren, bei den für das ICTC ermittelten Detektionsbedingungen untersucht. Die Analyseergebnisse lassen eine quantitative Abschätzung zu, inwieweit eine falsch-positive Bestimmung der drei Isotetracycline durch anwesende Tetracycline (CTC, TC, OTC) möglich wäre. Aufgrund der Retentionszeiten hat diese Untersuchung eine wichtige Bedeutung bei der Erfassung der Isoderivate des CTC

mittels Fluoreszenz-Detektion, wenn gleichzeitig TC in der Probe vorhanden ist. So könnte die Bestimmung des ICTC und e-ICTC durch anwesendes TC und e-TC quantitativ zu hoch ausfallen.

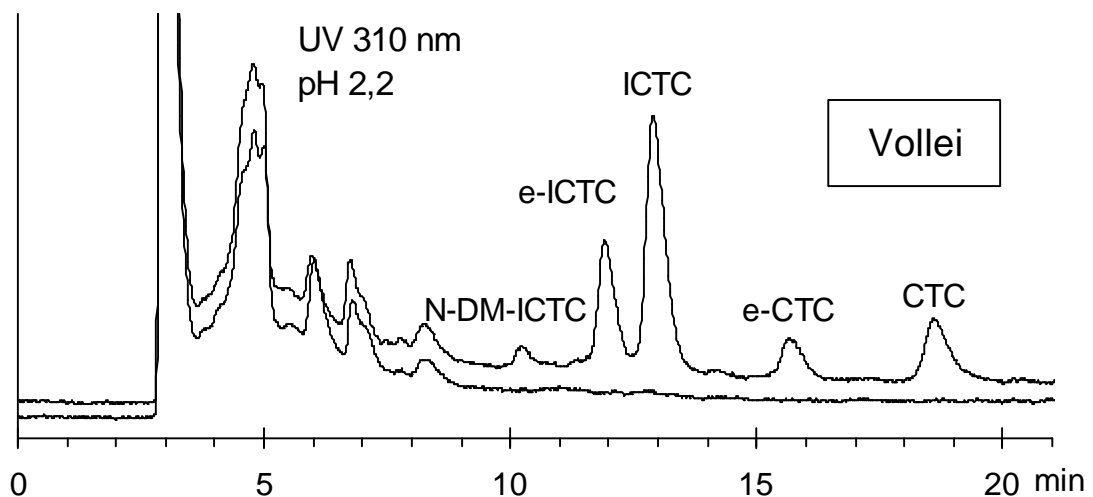
Es wurden für die Untersuchungen dotierte Volleiprobe verwendet, die die drei Tetracycline (600 µg/kg jeweils pro OTC, TC und CTC) enthielten. Die bei der Fluoreszenz-Detektion erhaltenen Flächenwerte der drei Tetracycline wurden als ICTC berechnet.

Bei einer Konzentration von 600 µg/kg von TC in Vollei wurde eine Konzentration von 5 µg/kg ICTC vorgetäuscht. Dieser falsch-positive ICTC-Wert kann toleriert werden und stellt einen vernachlässigbaren Fehler dar. Ähnlich geringe falsch-positive Werte ergaben sich auch bei der Auswertung des OTC- und des CTC-Flächenwertes nach Fluoreszenzdetektion und Berechnung als ICTC. Folglich wurde die Bestimmung der drei Isotetracycline (IOTC, ITC und ICTC) durch anwesende Tetracycline (CTC, TC und OTC) nicht behindert. Die automatisierte Probenaufarbeitung trug auch nicht zur Bildung der drei Isotetracycline aus den drei Tetracyclinen bei.

- **Bestimmung der Isoderivate des Chlortetracyclins bei 310 nm und pH 2,2**

Die Bestimmung von ICTC, seinem Epimer und seinem N-Desmethylderivat war auch (ohne Fluoreszenzdetektion) bei pH 2,2 und UV 310 nm möglich. Die Abb. 28 zeigt das UV-Spektrum von ICTC bei den zwei verschiedenen pH-Werten 12,0 und 2,2. Bei 310 nm UV zeigt ICTC bei pH 2,2 eine UV-Absorption, die analytisch genutzt werden kann und auch genutzt wurde, und auch das CTC Abb. 22 zeigt bei dieser Wellenlänge und pH-Wert noch eine UV-Absorption.

Die Abb. 29 zeigt das Chromatogramm einer Volleiprobe mit gewachsenen Rückständen an CTC. Eine kleinere Wellenlänge als 310 nm wurde nicht gewählt, um Matrixinterferenzen zu minimieren. Als Matrix für die Untersuchung des CTC und seiner Metaboliten bei 310 nm UV wurden Volleiprobe verwendet. CTC wurde aus Gründen der Selektivität bei 360 nm bestimmt.



**Abb. 29:** Chromatogramm einer Volleiprobe mit gewachsenen Rückständen an CTC am 4. Behandlungstag mit einem Medizinalfutter, welches 1200 mg/kg CTC enthielt, und eines Volleiblanks vor Beginn der Medikation.

Die Methode zur Bestimmung des ICTC mittels UV-Detektion bei 310 nm wies eine Einschränkung auf, so daß es nötig war, eine Fluoreszenz-Methode zur Bestimmung des ICTC zu entwickeln. Die Einschränkung bestand darin, daß die Detektion des ICTC bei 310 nm pH 2,2 durch die Anwesenheit von TC gestört wurde. Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenz-Detektion war, daß das *in vivo* gebildete N-DM-ICTC auch in geringerer Konzentration noch sicher und selektiv nachweisbar war.

- **Vergleich der UV- und Fluoreszenz-Detektion von Isochlortetracyclin**

ICTC ist in Gegenwart von Laugen und bei höherer Temperatur relativ instabil [20, 170]. Es war zu prüfen, ob sich diese Instabilität auf die Quantifizierung auswirkte und damit zu niedrigeren Rückstandsgehalten an ICTC führen würde.

Die Volleiprobe dieser Meßreihe stammten aus einer Medikationsstudie mit 1200 mg/kg CTC pro kg Futter.

Gemessen wurde bei 310 nm, pH 2,2 (UV-Detektion) sowie bei 350/420 nm, pH 12,0 (Fluoreszenz-Detektion). Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Lege- datum	e-ICTC FL	ICTC FL	e-ICTC UV 310	ICTC UV 310
09.02.98	0	0	0	0
10.02.98	80	310	78	306
11.02.98	108	390	107	392
12.02.98	120	381	120	379
13.02.98	125	350	130	347
14.02.98	180	375	178	380
15.02.98	118	155	116	151
16.02.98	96	100	100	98
17.02.98	82	75	80	74
18.02.98	64	100	61	97
19.02.98	47	92	45	89
20.02.98	20	70	22	69
21.02.98	8	40	8	45

**Tab. 10: Ergebnisse von Vollei-Mischproben in µg/kg von 5 Hennen, die mit einem Medizinalfutter 1200 mg/kg CTC vom 9.2.98 bis 13.2.98 (5 Tage) gefüttert wurden, detektiert mittels Fluoreszenz 350/420 nm bei pH 12 und UV 310 nm bei pH 2,2.**

Mit den zwei verwendeten Detektionsarten wurden nahezu identische Ergebnisse erhalten. Die verwendeten Detektionsarten hatten also keinen Einfluß auf die Quantifizierung von ICTC.

- **Untersuchungen zur massenspektroskopischen Bestimmung der Tetracycline, Isotetracycline, N-Desmethylderivate und Anhydrotetracycline**

Zur zusätzlichen Überprüfung der Anwesenheit bereits bekannter Tetracycline sowie zur strukturellen Analyse und damit zur Identifizierung der mittels UV-Detektion entdeckten unbekanntem Tetracycline wurden extern (Landwirtschaftszentrum der Bayer AG, Staatliches Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Münster) massenspektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Eine Voraussetzung dafür war eine chromatographische Trennung der Tetracycline, da die Epimere die gleiche Masse und die gleichen Massenübergänge besitzen. Die Bedingungen für die LC-MS-MS Untersuchungen sind im Kap. 10.3 wiedergegeben.

Die drei bereits in der Ionenquelle ionisierten Tetracycline CTC, TC und OTC und ihre Epimere werden in der Kollisionszelle des MS/MS durch Stoß mit Argongas angeregt. Das erste Folgeion entsteht durch Abspaltung von Ammoniak von der Amidgruppe am C2-Atom (Massenverlust von 17 amu). Die Abspaltung von Wasser wird bei den drei Tetracyclinen und ihren Epimeren nur bei gleichzeitiger

Ammoniakabspaltung beobachtet (Tab. 10). Das Folgeion mit dem Massenverlust von 35 Atommasseneinheiten stellt hierbei das intensitätsstärkere Folgeion dar. Die Quantifizierung der drei Tetracycline und ihrer Epimere mittels LC-MS/MS sollte daher über dieses Folgeion (Massenverlust 35 amu) erfolgen. Die Ausbeute an Folgeionen, die detektiert werden können, wird beim Tuning (Einstellen des MS) mit Standardlösungen optimiert und kann sich mit den Einstellungen des Linsensystems (z.B. Cone voltage) ändern.

Für die drei Isotetracycline ICTC, ITC und IOTC und ihre Epimere ergibt sich nur ein bedeutendes Folgeion, das einen Massenverlust von 17 aufweist. Durch die Isomerisierung am C-Atom 6 kann jetzt kein Wasser mehr abgespalten werden, so daß nur Ammoniak abgespalten wird. Dieser Übergang bzw. Massenverlust von 17 ist beim ICTC mit größerer Intensität zu messen, als der Massenverlust von 35 beim CTC (Tab. 11). Da die Isotetracycline keinen Massenverlust von 35 in der Kollisionszelle des MS erfahren, kann man diese auch mittels MS-MS von den Tetracyclinen unterscheiden (Tab. 11). Eine chromatographische Trennung der Tetracycline von Isotetracyclinen ist allerdings auch bei einer MS-MS-Detektion erforderlich, da die Tetracycline beide Folgeionen bilden.

Für die Anhydrotetracycline Anhydrotetracyclin und Anhydrochlortetracyclin und ihre Epimere - sowie für  $\alpha$ - und  $\beta$ -apo-Oxytetracyclin - kann ebenfalls nur das Ion mit dem Massenverlust 17 festgestellt werden (Tab. 11).

Die N-Desmethyl-Derivate des OTC, TC und des ICTC haben gegenüber OTC, TC und ICTC aufgrund der *in vivo* abgespalteten Methylgruppe eine um die Masse 14 verringerte Masse. Bildet jetzt dieses Molekül zwei Folgeionen mit dem Massenverlust 35 und 17, so handelt es sich um ein N-desmethyliertes Tetracyclin-Derivat, wobei das Folgeion mit dem Massenverlust um 35 das intensivere Signal geben sollte. Bildet das Ion nur ein Folgeion mit dem Massenverlust 17 und kein Ion mit dem Massenverlust 35, so handelt es sich bei dieser Verbindung um ein N-desmethyliertes Isoderivat (Tab. 11).

Analyt	Masse des Vorläuferions	Masse der Folgeionen
	$[M+H]^+$	$[M+H-NH_3]^+$ und $[M+H-NH_3-H_2O]^+$
Isooxytetracyclin	461	444
N-DM-IOTC	447	430
N-DM-OTC	447	412 und 430
$\alpha$ -/ $\beta$ - apo-Oxytetracyclin	443	426
Oxytetracyclin	461	426 und 444
N-DM-ITC	431	414
Isotetracyclin	445	428
N-DMTC	431	396 und 414
Tetracyclin	445	410 und 428
N-Desmethyl- Isochlortetracyclin	465	448
Isochlortetracyclin	479	462
N-Desmethyl- Chlortetracyclin	465	448 und 430
Chlortetracyclin	479	444 und 462
N-Desmethyl-Anhydro- tetracyclin	413	396
Anhydrotetracyclin	427	410
N-Desmethyl- Anhydrochlortetracyclin	447	430
Anhydrochlortetracyclin	461	444

**Tab. 11: Massenübergänge der Tetracycline, Isotetracycline und Anhydrotetracycline und der in vivo gebildeten N-Desmethyl-Tetracycline**

Die N-Desmethyl-derivate waren nicht als Standards erhältlich. ITC und IOTC wurden aus TC bzw. OTC hergestellt, siehe Kap. 10.5. Mittels LC-MS-MS wurden in den Chromatogrammen von Standards neben den Muttersubstanzen und den Epimeren keine zusätzlichen Peaks für Keto-Enol-Tautomere beobachtet.

## 5 Methodenvalidierung und Qualitätssicherung

Die Validierung einer analytischen Methode umfaßt unter anderem die Ermittlung, Beschreibung und Überprüfung der Leistungsparameter einer Methode und stellt eine grundlegende, qualitätssichernde Maßnahme dar. Die Anforderungen, die an eine Methode gestellt werden, werden u.a. bezüglich Spezifität, Nachweisgrenze, Genauigkeit und Präzision in der EG-Entscheidung 93/256/ EWG [180] definiert.

Zuerst wurde auf Linearität des chromatographischen Systems (ohne Probenaufarbeitung) geprüft. Im zweiten Schritt (Kap. 5.2) wurde die Methode mit dotiertem Probenmaterial validiert.

### 5.1 Kenndaten der Chromatographie

Die Linearität des chromatographischen Systems wurde mit wässrigen Standards (ohne Probenaufarbeitung) bestimmt.

Hierzu wurden Standardlösungen direkt über eine 20 µl Probenschleife injiziert. Die Dialysekammer wurde hierzu vom Probeninjektionsport gelöst und der Injektionsport über eine kurze Kapillare direkt mit dem Sechs-Wege Schaltventil B (Abb. 10) des ASTED-Systems verbunden.

Zunächst wurden für jede der vier Substanzen, OTC, TC, CTC (UV, pH 2,2) und ICTC (FLD pH 12,0) Kalibriergeraden erstellt, in denen die Summe der Flächenwerte von Epimer und Muttersubstanz gegen die absolut pro Injektion (ng Wirkstoff/20 µl) aufgegebene Tetracyclinmenge aufgetragen wurde (Abb. 30-33).

Jeder Meßpunkt beruht auf einer Vierfach-Bestimmung, die mit einem Mischstandard, der OTC, TC und CTC enthielt, durchgeführt wurde. Für ICTC wurde ein Standard angesetzt, der keine Tetracycline (OTC, TC, CTC) enthielt. Die Auswertung der Meßpunkte durch eine Regression 1. Grades erfolgte mit Hilfe des Programms KALIBO® [184]. Die einzelnen statistischen Parameter sind in Tab. 12 zusammengestellt. Die Bestimmung erfolgte mit 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ng je 20 µl Injektionsvolumen. Bei einer Dialyseausbeute von 50 %, einer Probenverdünnung von 1 plus 2 Teile Probenverdünnungslösung und einem Donorkammervolumen von 0,74 ml entspricht die Konzentration 25 ng/20 µl dem EU-MRL-Wert von 200 µg/kg im Vollei.



Analyt	Korrelationskoeffizient	y-Achsenabschnitt	Steigung	Verfahrenskoeffizient VK %	NG [ng/20 µl]	BG [ng/20 µl]
OTC #	0,99971	-1046	2736	1,2	0,8	2,7
TC #	0,99964	-2685,7	3415	1,3	0,9	3
CTC #	0,99905	-1945	2095,4	2,15	1,4	4,7
ICTC*	0,99906	-3442	465568	1,9	0,5	1,7

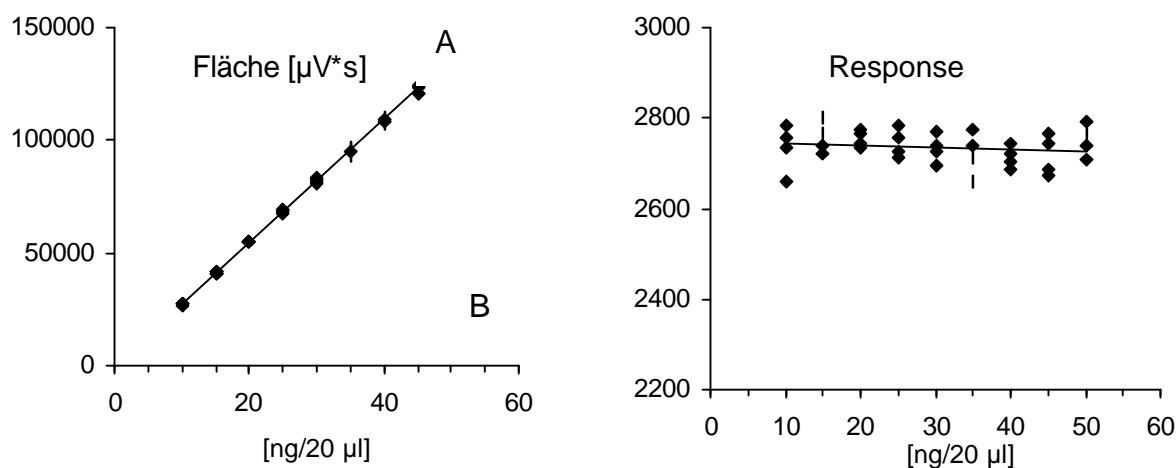
# UV-Detektion bei 360 nm pH 2,2

\* Fluoreszenz-Detektion nach pH-Wert Einstellung auf pH 12,0

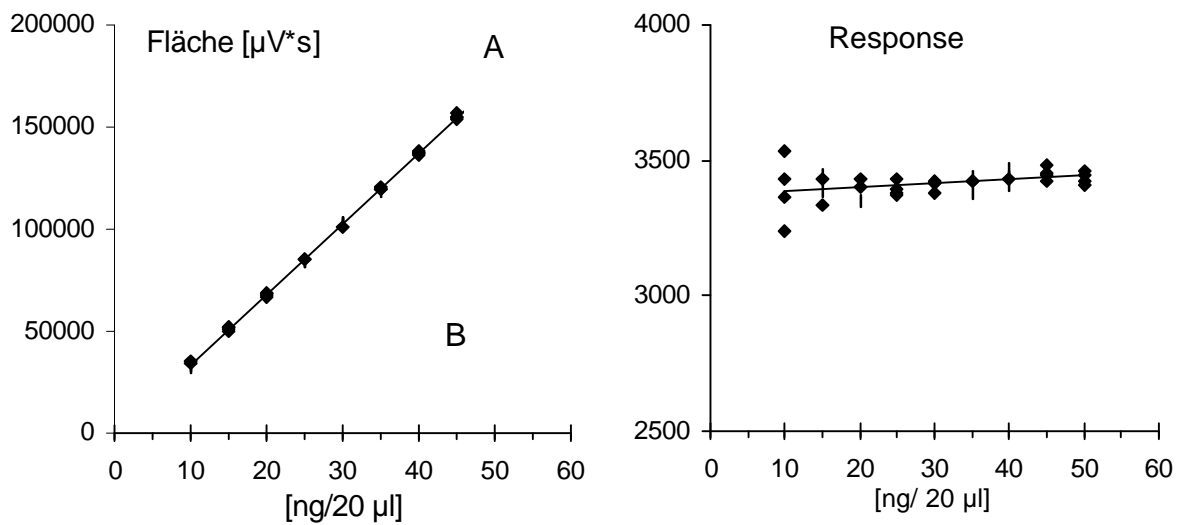
**Tab. 12: Regression 1. Grades der Flächenwerte einer Standard-Kalibriergeraden für das chromatographische System bei 10 bis 50 ng pro Injektion (20 µl), ermittelt mit oxalsäure-sauren Standards, Auswertung nach DIN 32645**

Die unterschiedlichen Werte für die Steigung der Regressionsgeraden (Tab. 12) lassen erkennen, daß die Methode die vier Analyten mit unterschiedlicher Empfindlichkeit erfaßt.

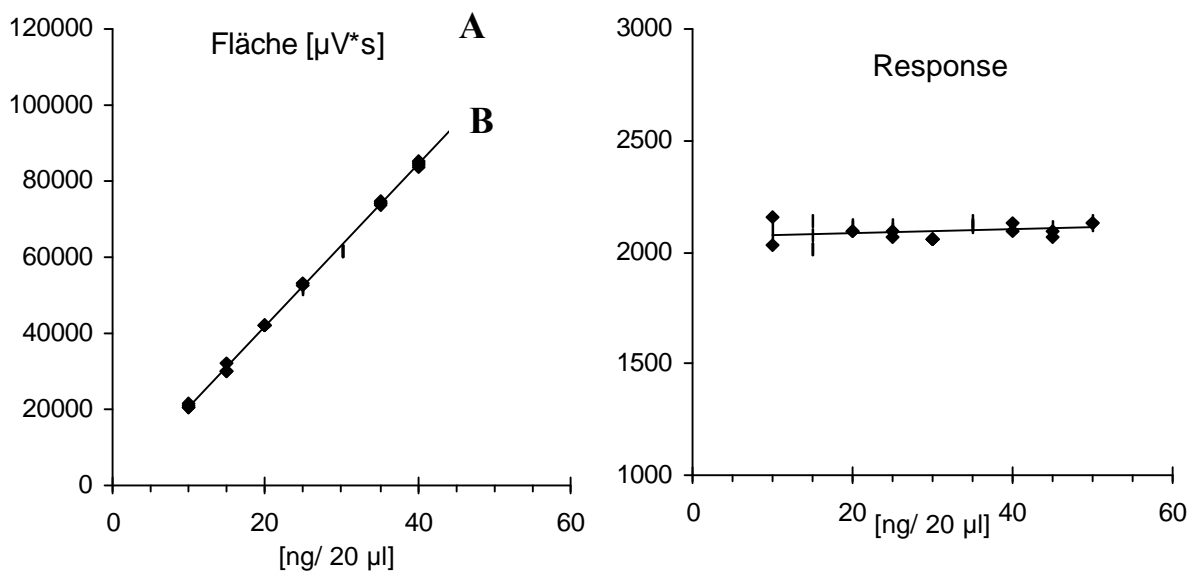
Um die Grenzen des linearen Meßbereiches anschaulich darzustellen, wurde der **Response-Wert** (Quotient aus Peakfläche und injizierter Menge) gegen den absoluten Analytgehalt aufgetragen. Für die vier Substanzen OTC, TC, CTC und ICTC ist dies in der Abb. 30 bis 33 dargestellt. Der parallele Verlauf der Kurve zur x-Achse zeigt, daß die Methode hier linear ist.



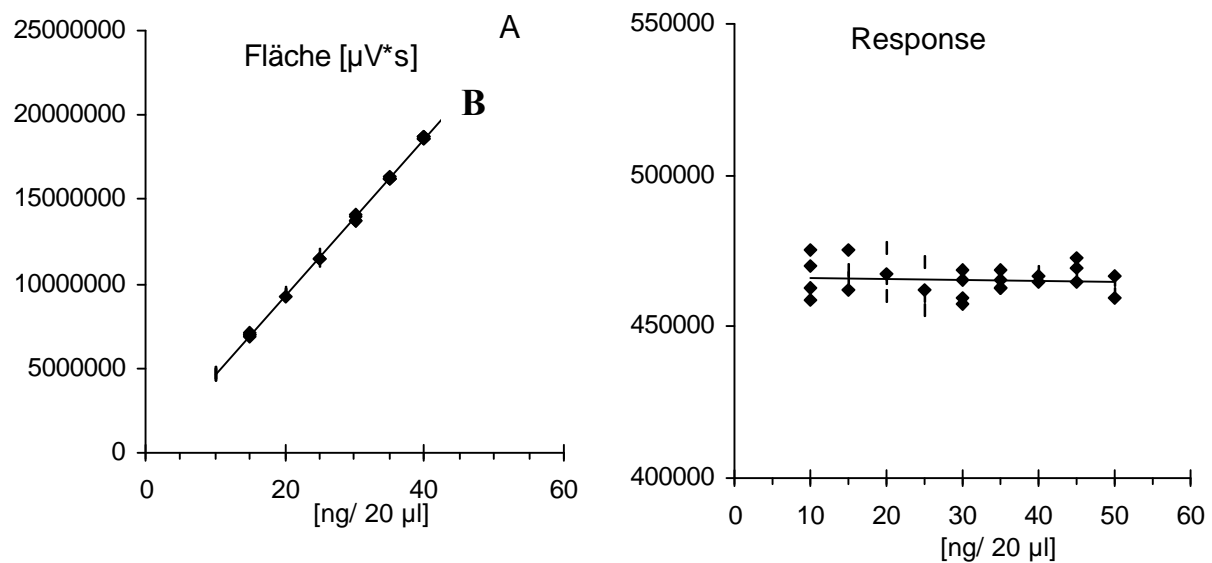
**Abb. 30 : Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von OTC mittels UV 360 nm pH 2,2**



**Abb. 31 : Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von TC und e-TC mittels UV 360 nm pH 2,2**



**Abb. 32: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von CTC und e-CTC mittels UV 360 nm pH 2,2**



**Abb. 33: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von ICTC und e-ICTC mittels FLD 350/420 nm pH 12,0**

## 5.2 Methodenvalidierung mit dotiertem Probenmaterial

Die Validierung mit dotiertem Probenmaterial wurde im ersten Schritt mit dotiertem Vollei durchgeführt und später auf die verschiedenen Matrices Eigelb, Eiklar und Plasma erweitert. Sie wurde unter denselben Bedingungen wie die Validierung mit undotierten Proben durchgeführt.

Referenzmaterialien sind für viele Analyten in verschiedenen Matrices noch nicht verfügbar. Deswegen wurde die Kalibrierung des Systems stets mit dotiertem Material durchgeführt.

Der exakte **Dotierungsvorgang** ist im Anhang Kap. 10.2 beschrieben. Der Dotierungsvorgang wurde so durchgeführt, daß die Matrix selbst durch den Dotierungsvorgang nicht verändert wurde. Dies konnte auch dadurch erreicht werden, daß die Dotierung (siehe Kap. 10.2 ) mit weniger als 1 % des Probenvolumens durchgeführt wurde. Um eine einheitliche Vorgehensweise einhalten zu können sowie um die dotierten Proben den Proben mit gewachsenen Rückständen anzunähern, wurde die Einwirkzeit von 1,5 Stunden nicht unterschritten.

Der Unterschied, der sich durch den Zusatz der Dotierungslösung gegenüber der undotierten gewachsenen Probe ergibt, ist vernachlässigbar klein. Berücksichtigt man für dotierte Proben - mit einer Konzentration von 400 µg/kg - einen Zusatz von 600 µl Dotierungslösung zu

150 g Vollei, so ändert sich die Gesamtmasse um 0,4 % gegenüber einer undotierten Probe. Durch den anschließenden Verdünnungsschritt - ein Teil Matrix plus zwei Teile Probenverdünnungslösung - verkleinert sich der Unterschied zu 0,13 % gegenüber einer undotierten Probe.

Der Autosampler füllt die Donorkammer des Dialyseblockes stets mit demselben Probenvolumen von 0,74 ml. Die der Dialyse vorausgehende Probenverdünnung wurde durch einen Wägevorgang hergestellt. Der Anteil Matrix in der Probelösung ist daher bei allen Matrices gleich. Der Autosampler injiziert immer ein Aliquot der homogenen verdünnten Matrixlösung. Die verdünnten Probelösungen verschiedener Matrices unterscheiden sich in ihrer Dichte kaum noch, da die Dichte-Unterschiede durch die relativ hohe Probenverdünnung mit dem 0,3 molaren Citratpuffer aufgehoben oder vernachlässigbar klein geworden ist. Da zusätzlich die Quantifizierung mit dotierten Matrices erfolgt, die in gleicher Weise verdünnt wurden, wird auch dieser geringe Fehler durch die Kalibrierung berücksichtigt.

Eine Besonderheit stellt in diesem Zusammenhang auch die fettreiche und proteinreiche Matrix Eigelb dar. Die für die drei Tetracyclinpeaks (OTC, TC, CTC) erhaltenen Flächenwerte unterschieden sich bei gleicher Dotierung nur um die unterschiedliche Verdünnung von Vollei und Eigelbproben. Die unterschiedliche Probenverdünnung von Vollei- und Eigelbproben konnte bei Berechnung der Analytkonzentration mit dem Faktor 1,333 berücksichtigt werden.

Die Probenaufarbeitung und der Dotierungsvorgang wurden auf die Bildung von Umwandlungsprodukten der Tetracycline als Artefakte geprüft.

Die Abb. 34 zeigt hier Chromatogramme von dotierten Volleiproben, die mit den Konzentrationen 100, 200, 400 und 600 µg/kg jeweils mit einer Mischung aus OTC, TC und CTC dotiert worden waren. Bei den höheren Dotierungsniveaus lassen sich geringe Konzentrationen an Epimeren erfassen. Die Epimerisierungsrate liegt allerdings weit unterhalb dessen, was für Proben aus den Medikationsstudien ermittelt wurde. Die Epimere waren hier bereits in den Standardlösungen vorhanden, die zur Dotierung verwendet wurden. Eine Änderung der Epimerisierungsrate von dotierten Volleiproben, d.h. eine zusätzliche Epimerisierung nach Dotierung lag unterhalb der Nachweisgrenze.

Bei dotierten Proben konnte auch keine Bildung von N-Desmethylderivaten des OTC, TC und ICTC festgestellt werden. Mittels Fluoreszenz-Detektion konnten bei dotierten Matrices auch keine Isotetracycline (IOTC, ITC, ICTC) oder deren Epimere nachgewiesen werden.

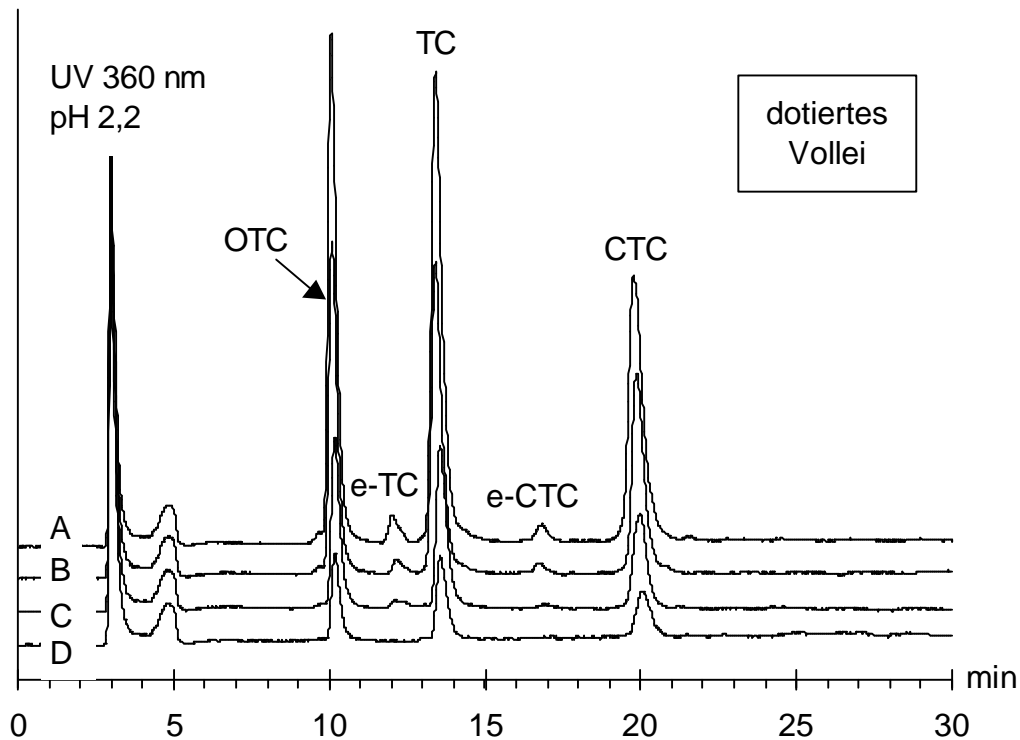


Abb. 34: Dotierte Volleproben : A : 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  je Tetracyclin (OTC, TC, CTC)

B : 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , C : 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , D : 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  jeweils pro Tetracyclin (OTC, TC, CTC)

Um eine Epimerisierung oder eine Änderung der bereits vorliegenden Epimerisierungsrate (Anteil an Epimer bezogen auf die Summe von Epimer und Ausgangssubstanz) von biologischen Proben während des Zeitraumes zwischen Abfüllung und Analyse der Proben zu unterdrücken, wurde das Probenrack des Autosamplers auf 6°C gekühlt. Auch ein lichtabhängiger Abbau der Analyten konnte nicht festgestellt werden. Um unter möglichst konstanten Bedingungen zu arbeiten und eine gute Langzeitstabilität des Systems zu erhalten, wurde der direkte Einfluß von Sonnenlicht vermieden. Die Proben wurden stets in Braunglasvials abgefüllt und zusätzlich mit einer Aluminiumfolie ummantelt.

Die Linearität der Methode wurde mit Dotierungen der verschiedenen Matrices ermittelt. Die relative Wiederfindung sollte in dem zu validierenden Konzentrationsbereich konstant sein. Eine zur x-Achse parallele Responsekurve steht für eine konstante Steigung der Kalibriergeraden über dem dargestellten Konzentrationsbereich. Die Steigung, die man für dotiertes Matrix-Material erhalten hat, setzt man nun ins prozentuale Verhältnis zu der Steigung, die man für wässrig-matrixfreie Analytlösungen mit Durchlauf durch das ASTED-System erhalten hat und erhält die **relative Wiederfindung**. Sie sollte für den validierten Bereich konstant sein. Mit Hilfe der graphischen Darstellung der Responsekurven kann man erkennen, ob sich eine konstante relative Wiederfindung über den validierten Bereich ergibt. Auf ähnliche Weise kann man auch die **absolute Wiederfindung** berechnen. Hierzu setzt

man die Steigung, die man für dotiertes Matrix-Material erhalten hat, mit der Steigung, die man durch Direktinjektionen mit Analytlösungen (Analyten im HPLC-Fließmittel gelöst) erhalten hat, in ein prozentuales Verhältnis. Die Kalibriergeraden, die mit der Direktinjektion von 20 µl erhalten wurden, beziehen sich auf die absolute Analytmenge, die vom Detektor registriert werden (Abb. 30-33). Die Wiederfindungen sind in Tab. 13 zusammengestellt. Für die Quantifizierung spielt die berechnete absolute Wiederfindung keine Rolle, da die unbekanntes Analytgehalte der Proben aus den Medikationsstudien mit Hilfe einer Geradengleichung bestimmt wurden, die mit dotierten Matrix-Standards berechnet worden sind.

Im folgenden werden die **Validierungsparameter für die unterschiedlichen Matrices** beschrieben :

- **Wässrige Lösungen**

Wässrige Lösungen wurden mit der Probenverdünnungslösung (PVL) verdünnt und wie Eiprobe einer vollständigen Probenaufarbeitung unterzogen. Als Dotierungsniveaus wurden 100, 200, 400 und 600 µg/kg gewählt. Da eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, lagen jeder Kalibriergerade 8 Bestimmungen zugrunde.

Die Darstellung der Kalibriergeraden und der Response-Werte befindet sich im Anhang 12.4.

- **Vollei**

Validierungsdaten für dotiertes Vollei wurden an 9 verschiedenen Tagen innerhalb eines Zeitraums von 12 Monaten ermittelt. Als Dotierungsniveaus wurden 0, 50, 100, 200, 400 und 600 µg/kg gewählt. Eine Kalibrierung stützt sich hierbei auf 12 Analysen. Volleiprobe dotiert mit 50 µg/kg für jedes Tetracyclin wurden hierbei bei der Validierung berücksichtigt, da der halbe MRL bereits mit diesem Wert erreicht wird, wenn 50 µg/kg Muttersubstanz und 50 µg/kg Epimer vorliegen.

Die Darstellung der Kalibriergeraden und der Response-Werte befinden sich im Anhang 12.4.

- **Eiklar und Eigelb**

Die Matrices Eiklar und Eigelb wurden mit vier verschiedenen Konzentrationsniveaus dotiert. Die Dotierungen waren 100, 200, 400 und 600 µg/kg. Da eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, lagen jeder Kalibriergerade 8 Bestimmungen zugrunde. Zusätzlich wurden auch undotiertes Eiklar und Eigelb untersucht. Innerhalb eines Monats wurden die Analysenwerte an vier Meßtagen ermittelt. Die Ergebnisse (Tab. 13) stimmten mit den Ergebnissen für die Matrix Vollei überein, so daß Regelkarten des analytischen Systems auf die Matrix Vollei beschränkt werden konnten. Die Darstellung der Kalibriergeraden und der Response-Werte ist im Anhang 12.4 zu finden.

Matrix	Analyt	Zeit- raum [Monat]	Konzentrations- bereich µg/kg	Steigung	relative Standard- abweichung der Stei- gung [%]	Achsen- abschnitt	Anzahl der Kalibrier- ungen	Wiederfindung in %		Korrelations- koeffizient
								relativ - absolut		
<b>Wässrige Lösungen</b>	OTC	1	100 - 600	375	1.6	-306	4	-	55,5	0,9995
	TC	1		484	1.7	-798	4	-	57,4	0,9996
	CTC	1		287	2.2	-814	4	-	53,7	0,9994
	ICTC	1		61501	3.2	-85844	4	-	53,5	0,9998
<b>Vollei</b>	OTC	12	50 – 600	365,4	4.5	-650	9	97	54	0,9995
	TC	12		464	5.0	-367	9	96	55	0,9993
	CTC	12		262,2	5.8	-877	9	91	50,7	0,9992
	ICTC	6		60334	5.6	12143	6	98	52,5	0,9990
<b>Eiklar</b>	OTC	1	100 – 600	370	2.7	-314	4	99	54,7	0,9998
	TC	1		465	3.0	870	4	96	55,1	0,9998
	CTC	1		272	4.2	-275	4	95	52,6	0,9990
	ICTC	1		60844	3.8	161044	4	99	53	0,9994

Tabelle wird fortgesetzt

Matrix	Analyt	Zeit- raum [Monat]	Konzen- trations- bereich µg/kg	Steigung	relative Standard- abweichung der Stei- gung [%]	Achsen- abschnitt	Anzahl der Kalibrier- ungen	Wiederfindung in %		Korrelations- koeffizient
								relativ	absolut	
<b>Eigelb</b>	OTC	1	100 – 600	264	2.9	72	4	94	52,1	0,9995
	TC	1		341	3.3	-788	4	94	53,9	0,9994
	CTC	1		195	4.1	119	4	90	50,2	0,9984
	ICTC	1		43800	5.2	-25424	4	95	50,8	0,9994
<b>Plasma</b>	OTC	5	200 – 600	356	2.6	1381	6	95	52,7	0,9984
	TC	5		466	2.9	-688	6	96	55,2	0,9992
	CTC	5		266	4.4	-501	6	93	51,4	0,9979
	ICTC	5	100 – 300	59817	3.3	93507	6	97	52	0,9970

**Tab. 13: Validierungsdaten für wässrige Lösungen und für die Matrices Vollei, Eiklar, Eigelb und Plasma, aufgearbeitet mit der automatisierten Probenaufarbeitung**



- **Plasma**

Die Matrix Plasma wurde mit drei verschiedenen Konzentrationsniveaus dotiert. Die Dotierungen waren 100, 300 und 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Es stand nur wenig rückstandsfreies Plasma zur Verfügung. Von einem Plasma-Homogenat von 40 g wurden je 10 g pro Dotierungsstufe und 10 g als „Blank“ verwendet. Da es für Plasma keinen MRL-Wert gibt, wurden die Dotierungsniveaus im Bereich der Konzentrationen durchgeführt, die aufgrund einer Testmessung mit Plasmaproben aus einer Medikationsstudie erhalten wurden. Bei der Validierung wurden sechs Proben an sechs verschiedenen Tagen innerhalb eines 5 monatigen Zeitraums bestimmt. Die Ergebnisse (Tab. 13) stimmten mit den Ergebnissen für die Matrix Vollei überein, so daß die Regelkarten des analytischen Systems auf die Matrix Vollei beschränkt wurden.

Die Darstellung der Kalibriergeraden und die Response-Werte befinden sich im Anhang 12.4.

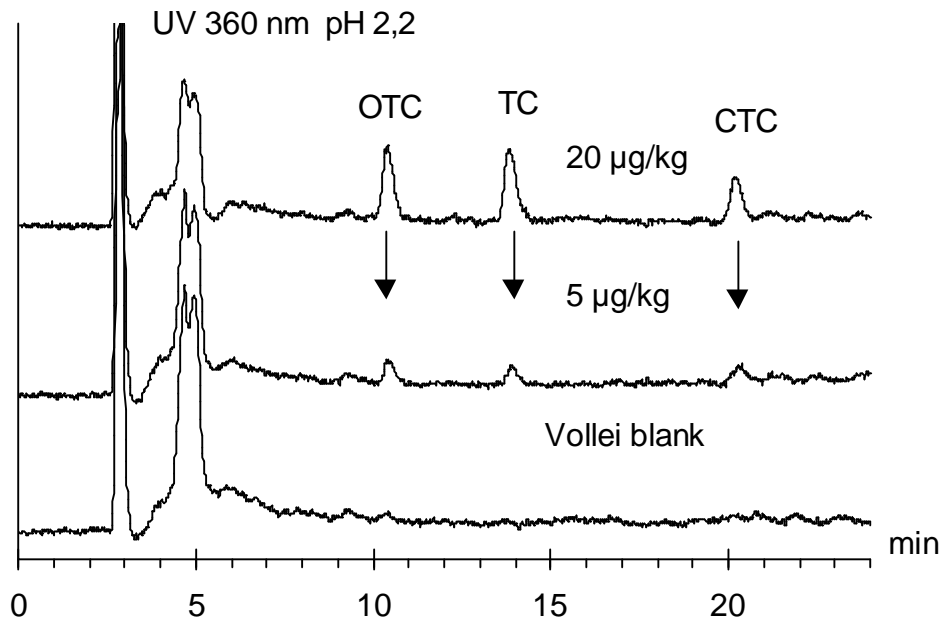
Die Steigung der Regressionsgeraden ist ein Maß für die Nachweisstärke einer Methode. Die Tab. 12 zeigt, daß die Durchschnittswerte für die Steigungen bei gleichem Analyt bei den verschiedenen Matrices nahezu gleich sind.

Im Falle von Eigelb muß eine höhere Verdünnung berücksichtigt werden und nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von 1,333 ergibt sich für die Steigung der Kalibriergeraden ein Wert von 352 für OTC, 454 für TC, 260 für CTC und 58400 für ICTC.

### 5.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Es gibt verschiedene Konzepte zur Ermittlung der kleinsten Konzentration eines Analyten, die sich mit ausreichender statistischer Sicherheit qualitativ (Nachweisgrenze) bzw. quantitativ (Bestimmungsgrenze) erfassen lassen. Die berechnete Nachweisgrenze kann mit dotiertem Probenmaterial überprüft werden.

Das EG-Konzept zur Ermittlung der Nachweisgrenze [180] basiert auf der Frage, ob coeluerende Matrixbestandteile die Identifizierung und Quantifizierung der Analyten beeinflussen würde. In Abb. 35 ist hierbei das Ergebnis mit der Matrix Vollei dargestellt.



**Abb. 35:** Mit OTC, TC, CTC an der Nachweisgrenze dotierten Volleiprüben im Vergleich mit einem Volleiblank.

Auch bei den anderen Matrices Eigelb, Eiklar und Plasma wurden in Chromatogrammen von Blankproben keine Interferenzen mit den Analyten beobachtet. Als Legehennen wurden zwei Hühnerrassen (siehe Kap. 10.6) auf dem Versuchsgut des BgVV gehalten. Die Validierung wurde vor Beginn der Medikationsstudien mit Eiern aus dem Handel durchgeführt. Die untersuchten Proben der zwei Hühnerrassen zeigten keinen Einfluß auf die ermittelten Charakteristika der Methode.

Anstelle des EG-Verfahrens wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenze aus dem Datenmaterial, das aus den für die Validierung durchgeführten Dotierungsversuchen stammte, entsprechend der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 [185] mit dem Statistiksoftwareprogramm Kalibo<sup>®</sup> [184] näherungsweise berechnet (Tab. 14). Die verwendeten Kalibrierwerte sollten dabei nur um den Faktor 10 über der Nachweisgrenze liegen, da nur in diesem Konzentrationsbereich die Homogenität der Varianzen gegeben ist. Diese Anforderung wurde durch die gewählten Kalibrierpunkte bei 50, 100, 200 usw. nur bei der Matrix Vollei für die Analyten zumindest für den unteren Kalibrierbereich erfüllt. Bei der Wahl der Kalibrierpunkte für die anderen Matrices wurde schwerpunktmäßig darauf Wert gelegt, daß die Kalibriergerade in dem Konzentrationsbereich der ermittelten Analytgehalte der Proben lagen. Für diese Matrices, für ICTC und die N-Desmethylderivate sind keine Höchstmengen festgelegt.

Die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen lagen um den Faktor 13 bzw. 5 unter der festgesetzten Höchstmenge für die Summe aus Muttersubstanz und Epimer (Tab. 14). Für die

Einzelsubstanzen ergeben sich bei einer Epimerisierungsrate von 50 % eine Höchstmenge von 100 µg/kg pro Muttersubstanz oder Epimer. Die mit den angewendeten Verfahren erhaltenen Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen liegen ungefähr um den Faktor 6-7 und bei Berücksichtigung einer Epimerisierungsrate von 50 %, wie sie bei gewachsenen Proben zu erwarten ist, ungefähr um den Faktor 2-3 unterhalb des EU-MRL-Wertes von 200 µg/kg. Die Methode ist daher auch bei Berücksichtigung einer hohen Epimerisierungsrate dazu geeignet, die drei Tetracycline und ihre Epimere auch am halben MRL-Wert sicher zu quantifizieren.

Matrix	Analyt	NG <sub>DIN</sub>	BG <sub>DIN</sub>
Vollei	Oxytetracyclin	12	36
Vollei	Tetracyclin	11	35
Vollei	Chlortetracyclin	15	45
Vollei	Isochlortetracyclin	11	34
Eigelb	Oxytetracyclin	15	44
Eigelb	Tetracyclin	15	46
Eigelb	Chlortetracyclin	20	59
Eigelb	Isochlortetracyclin	15	44
Eiklar	Oxytetracyclin	10	31
Eiklar	Tetracyclin	11	33
Eiklar	Chlortetracyclin	14	44
Eiklar	Isochlortetracyclin	12	33
Plasma	Oxytetracyclin	13	38
Plasma	Tetracyclin	12	38
Plasma	Chlortetracyclin	17	47
Plasma	Isochlortetracyclin	13	36

NG: Nachweisgrenze BG: Bestimmungsgrenze

**Tab. 14: Nachweis- und Bestimmungsgrenze [µg/kg] der drei Tetracycline und des ICTC in unterschiedlichen Matrices berechnet mittels KALIBO® nach dem DIN Verfahren [184, 185]**

Die Ergebnisse, die für das ICTC erhalten wurden, zeigen, daß eine Quantifizierung des ICTC im Bereich 100 bis 600 µg/kg sicher möglich ist. Mit einer groben Abschätzung können die erhaltenen Ergebnisse auf die möglichst strukturähnlichsten Metaboliten - die jeweiligen N-Desmethyl-derivate des OTC, TC oder ICTC - übertragen werden.

Die mit dem DIN-Konzept [185] errechneten Ergebnisse dienen hierbei auch zur Abschätzung der Nachweisgrenze der Epimere, sowie der N-Desmethyl-derivate des OTC, TC und ICTC, die als Minormetaboliten in den Matrices Eigelb, Plasma und Vollei nachgewiesen wurden

und als Standards nicht kommerziell erhältlich sind. Die Nachweisgrenze dieser Metaboliten kann abgeschätzt werden, indem man dieser Abschätzung die Ergebnisse, die für die jeweilige strukturähnlichste Muttersubstanz ermittelt wurde, zugrunde legt. Der Abschätzung liegt also die Näherung zu Grunde, daß durch die Veränderung der Dimethylaminogruppe keine wesentliche Änderung des Extinktionskoeffizienten bei konstantem pH-Wert resultiert. Im Falle des e-ICTC und des N-DM-ICTC ist also die grobe Abschätzung über die Ergebnisse möglich, die mit Dotierungsversuchen des ICTC für die verschiedenen Matrices erhalten wurden.

Das Umwandlungsprodukt (Epimer oder Isomer) muß in der Probe in einer Konzentration vorliegen, in der es noch sicher nachgewiesen werden kann. Bei einer Konzentration von 600 µg/kg als Summe von Muttersubstanz und Epimer und bei einer Epimerisierungsrate von 5 % liegt das Epimer mit einer Konzentration von 30 µg/kg in der Probe vor. Die Nachweisgrenze wird deutlich überschritten, aber die Bestimmungsgrenze wird noch nicht erreicht. Die Quantifizierung einer so kleinen Epimerisierungsrate ist erst bei sehr hohen Konzentrationen über 600 µg/kg (Summe Muttersubstanz und Epimer) möglich. Eine quantitative Verhältnisangabe der Anteile an Epimeren, N-Desmethylderivaten oder Isomeren an den Gesamtrückständen in gewachsenen Proben muß sich daher auch an den Bestimmungsgrenzen orientieren.

Weitere Konzepte zur Berechnung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, wie das DFG-Konzept [186] oder das Konzept von Vogelgesang und Hädrich [187], welches eine Kombination und Weiterentwicklung des DIN- und DFG-Verfahrens darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

## **5.4 Qualitätssichernde Maßnahmen**

Zusätzlich zur Validierung mit dotiertem Probenmaterial wurden qualitätssichernde Maßnahmen durchgeführt. Diese sind im folgenden aufgeführt :

- **Regelkarten**

Zu Beginn und zu Ende einer Meßreihe von 16 Analysen wurden zur Präzisionskontrolle dotierte Proben (200 µg/kg) untersucht und die ermittelten Flächenwerte mit den während der Validierung erhaltenen Werte verglichen. Die graphische Darstellung der über einen Zeitraum von 18 Monaten ermittelten Flächenwerte ist in Form von Qualitätsregelkarten dargestellt. Das Führen der Regelkarten ermöglichte die Analyse von Proben aus den Medikationsstudien unter kontrollierten Bedingungen. Die

Regelkarten wurden für dotiertes Volleimaterial geführt und sind im Anhang 12.3 aufgeführt.

• **Qualitätssicherung durch verdeckte Analysen**

Zur Qualitätssicherung der Analysenwerte, wurden 'verdeckte' Kontrollvolleiprobe analysiert, d.h. von einer unabhängigen Person wurden Kontrollvolleiprobe dotiert. Sechs Volleiprobe mit unterschiedlichen und dem Analytiker unbekanntem Gehalten an Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin wurden analysiert. Die Ergebnisse der Tab. 14 zeigen, daß weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse ermittelt wurden und die Genauigkeit der Methode in den geforderten Grenzen [180] von -20% bis +10 % lag.

Probe	Analyt	dotierte Konzentration µg/kg	gefundene Konzentration µg/kg	Genauigkeit %
1	OTC	0	<NG	-
	TC	0	<NG	-
	CTC	333	366	110
2	OTC	200	200	100
	TC	266	280	105
	CTC	333	364	109,3
3	OTC	0	<NG	-
	TC	120	123	102,5
	CTC	0	<NG	-
4	OTC	0	<NG	-
	TC	0	<NG	-
	CTC	0	<NG	-
5	OTC	266	270	101,5
	TC	200	200	100
	CTC	166	176	106
6	OTC	400	400	100
	TC	233	227	97,4
	CTC	0	<NG	-

<NG: Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze

**Tab. 15 : Analyseergebnisse aus 'verdeckten' Kontroll-Volleiprobe**

• **Vergleichsuntersuchungen durch ein externes Labor**

Die Reproduzierbarkeit ist als Mehrfachanalyse eines Probenmaterials definiert. Zur Ermittlung dieser Präzisionsgröße wurde das Probenmaterial mit dem gleichen Verfahren in unterschiedlichen Labors, mit unterschiedlichem Personal und

verschiedenen Geräten durchgeführt. Um abschätzen zu können, inwieweit die entwickelte HPLC Methode quantitativ und qualitativ „richtige“ Ergebnisse liefert, wurde gefriergetrocknetes Probenmaterial an ein in der Tetracyclinanalytik ausgewiesenes Labor (z.H. Glenn Kennedy, Department of Agriculture of Northern Ireland) versandt. Das Probenmaterial war Blank-Vollei ohne Rückstände, dotiertes Vollei und Vollei mit gewachsenen Rückständen. Die Analysenergebnisse der untersuchten Proben wurden in einem separaten verschlossenen Brief, gleichzeitig mit dem Versand der Proben dem nordirischen Labor mitgeteilt. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 - 18 dokumentiert.

Analyt	Konzentration ASTED-Analytik µg/kg	Konzentration Vergleichslabor	Unterschied %
e-TC	87 ± 5	125	
TC	112 ± 6	68,8	
<b>Summe</b>	<b>199</b>	<b>193,8</b>	<b>2,7</b>

*Tab. 16: Mit Tetracyclin dotiertes rekonstituiertes gefriergetrocknetes Vollei Rückstandsgehalte ASTED-Analytik sind Mittelwerte aus 7-facher Bestimmung (± - Werte = Standardabweichung aus 7-facher-Bestimmung)*

Analyt	Konzentration ASTED-Analytik µg/kg	Konzentration Vergleichslabor	Unterschied %
e-TC	235 ± 12	285,7	
TC	335 ± 15	208,3	
<b>S e-TC + TC</b>	<b>570</b>	<b>494</b>	<b>14</b>

*Tab. 17: gewachsene Rückstände in rekonstituiertem gefriergetrocknetem Vollei Rückstandsgehalte ASTED-Analytik sind Mittelwerte aus 7-facher Bestimmung (± - Werte = Standardabweichung aus 7-facher-Bestimmung)*

Aus TC und OC bildet sich in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und Zeit das entsprechende Epimer bis ein bestimmtes Gleichgewicht von Epimer und Muttersubstanz erreicht ist (Kap. 1.3). Bei CTC kann sich neben e-CTC irreversibel auch e-ICTC und ICTC bilden. Schon geringe Unterschiede in der Probenaufarbeitung (pH-Wert, Temperatur, Dauer) können bei zwei verschiedenen analytischen Methoden auch zu unterschiedlichen Analysenergebnissen für die Muttersubstanzen, Epimere

und für ICTC und e-ICTC führen. Nur die Konzentrationssummen beider Substanzen (Muttersubstanz und Epimer) und im Falle des CTC die Summe über e-CTC, CTC, e-ICTC und ICTC sollten deshalb bei zwei verschiedenen Methoden verglichen werden und im Rahmen des in der Rückstandsanalytik üblichen Meßfehlers übereinstimmen. Deshalb gibt es bei den Konzentrationen der einzelnen Analyten diese großen Unterschiede zwischen der modifizierten ASTED-Methode und dem Vergleichslabor und die gute Übereinstimmung, wenn nur die entsprechenden Summenwerte verglichen werden.

Analyt	Konzentration ASTED- Analytik $\mu\text{g}/\text{kg}$	Konzentration Vergleichslabor	Unterschied %
OTC	$190 \pm 9$		
e-OTC	$30 \pm 5$		
<b>S (OTC + e-OTC)</b>	<b>220</b>	<b>260,9</b>	<b>16</b>
e-TC	$200 \pm 10$	232,1	
TC	$240 \pm 12$	187,5	
<b>S (e-TC + TC)</b>	<b>440</b>	<b>419,6</b>	<b>5</b>
e-CTC	$65 \pm 5$	keine Angabe	
CTC	$125 \pm 7$	100	
$\Sigma$ (CTC + e-CTC)	190	? (100)	
e-ICTC	$205 \pm 11$	keine Angaben	
ICTC	$345 \pm 20$	607,1	
$\Sigma$ (ICTC + e-ICTC)	550	? (607,1)	
<b>S (e-CTC + CTC + e-ICTC + ICTC)</b>	<b>740</b>	<b>707,1</b>	<b>4,6</b>

? = keine Angabe zu e-CTC

**Tab. 18: gewachsene Rückstände in rekonstituiertem gefriergetrocknetem Vollei Rückstandsgehalte ASTED-Analytik sind Mittelwerte aus 7-facher Bestimmung ( $\pm$  - Werte = Standardabweichung aus 7-fach-Bestimmung)**

Für das Epimer des Chlortetracyclins und des Isochlortetracyclins sowie für die N-Desmethylderivate des OTC, TC und ICTC wurden vom Vergleichslabor keine Werte angegeben. Zur Vereinfachung des Vergleichs der Analysenwerte werden die Gehalte an N-Desmethylderivate in den Tab. 16-18 nicht aufgeführt.

Weiterhin wurde zur Qualitätssicherung das chromatographische System und das Detektionssystem vor Beginn einer Analysenserie mit Standardlösungen überprüft.

---

## **5.5 Langzeitstabilität des Systems**

Die Dialysemembranen wurden nach ca. 500 Analysen und die Anreicherungssäulen bereits nach ca. 200 Analysen ausgetauscht. Der erforderliche Austausch kündigt sich mit einem erhöhten Rückdruck im analytischen System an.

Durch den Wechsel von Anreicherungssäule, Membran oder einer der Lösungen änderten sich die Analysenwerte nicht. Alle verwendeten RP-8 Supersphersäulen (3 Stück) ermöglichten die Trennung der Muttersubstanzen von ihren Epimeren. Der Austausch des Materials (z.B. Trennsäule, Anreicherungssäule, usw.) und der Lösungen (z.B. Pufferlösungen, Acetonitril usw.) beeinflusste die Analysenergebnisse nicht.

Die Untersuchungen mit MS/MS als Detektionsart wurden mit unterschiedlichen Flußraten durchgeführt, so daß es zu Retentionszeitverschiebungen kam. Ein Grund für die Wahl unterschiedlicher Flußraten war die Durchführung der Untersuchungen an mehreren nicht aufeinanderfolgenden Tagen. Zwischen den Meßtagen wurde das Gerät für andere Untersuchungen mit einer anderen HPLC-Säule (größere Säulendurchmesser und größere Flußraten) genutzt. Hierbei wurden offensichtlich auch Parameter geändert, die den Spraykegel, d.h. den Ionenstrom, der auf das MS gerichtet ist, beeinflussen. Eine Erhöhung der Flußrate stellte hierbei das einfachste Mittel dar, eine Detektion der Ionen wieder zu erreichen.



## 6. Medikationsstudien

### 6.1 Untersuchung von Hühnerfutter

Das Hühnerfutter und seine Bestandteile (Tab. 21) können neben der Resorption (durch anwesendes Calcium) eventuell auch die Stabilität der drei Tetracycline (OTC, TC, CTC) beeinflussen und Einfluß auf die Bildung von Epimeren oder Isomeren ausüben. Bevor über die Ergebnisse der Tetracyclinrückstände in biologischen Proben berichtet wird, werden daher die Ergebnisse der Untersuchungen des Hühnerfutters im folgenden aufgeführt:

- **Chemische Zusammensetzung des Hühnerfutters**

Hervorzuheben ist der Calciumgehalt des Hühnerfutters, da Tetracycline mit Calcium Komplexe bilden und so die Resorption des Hühnerfutters behindert werden kann. Bei einigen veterinärmedizinischen Applikationen wird daher die Anwesenheit von Citronensäure oder der Natrium- oder Kaliumsalze empfohlen [70, 71]. Bei dem verwendeten Hühnerfutter handelte es sich um ein Trockenfutter (Tab. 21). Die chemische Zusammensetzung des Hühnerfutters wurde vom BgVV übermittelt und ist in Tab. 22 angegeben.

<b>Komponenten</b>	<b>%</b>
Weizen	30,00
Mais	31,00
Sojaschrot extr. 42 %	24,00
Grünmehl	3,00
Jojobaöl	1,60
DL-Methionin	0,04
Kohlensaurer Kalk	8,36
Monocalciumphosphat	1,00
Vitamin-Spurenelemente Vormischung	1,00
	<u>100,00</u>

*Tab. 19 : Komponenten des Hühnerfutters nach [188]*

<b>Nährstoffe</b>	errechnet %	Analyse (Beispiel) %
Trocken- substanz	89,48	90,43
Rohprotein	17,13	17,99
Rohfett	4,06	4,04
Rohfaser	3,65	3,08
Rohasche	12,91	10,57
Ca	3,65	3,76
P	0,57	0,73
Na	0,12	0,26
Cl	0,13	-

*Tab. 20: Chemische Zusammensetzung des Hühnerfutters [188]*

- **Untersuchungen zur Bestimmung im Hühnerfutter**

Die in der Literatur beschriebenen HPLC-Verfahren zur Tetracyclinanalytik in Futtermitteln empfehlen eine Extraktionslösung mit einem pH 2,0 [140, 141] und einen Filtrationsschritt als einzigen Aufreinigungsschritt [142].

- **Vorgehensweise zur Extraktion**

Die eingesetzten Konzentrationen im Hühnerfutter lagen zwischen 3000 mg/kg und 750 mg/kg und ermöglichten eine einfache Vorgehensweise zur Extraktion der drei Tetracycline (OTC, TC, CTC) aus dem Hühnerfutter mit einer wässrigen oxalsäure- und methanolhaltigen Extraktionslösung.

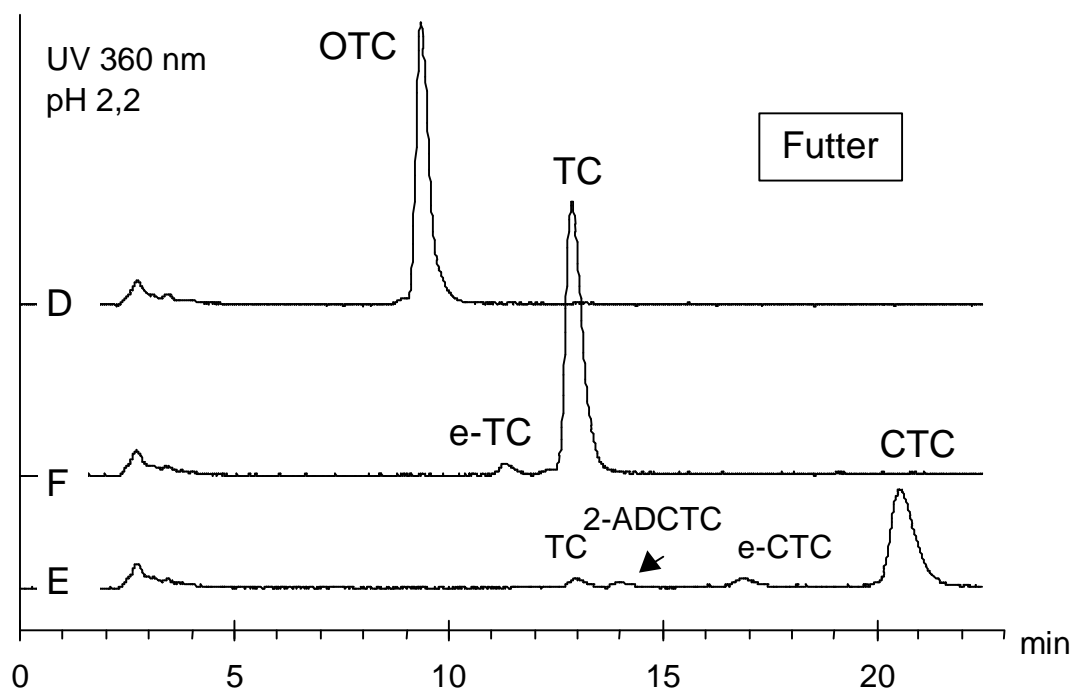
Die Extraktionslösung hatte einen sauren pH-Wert von 2,3, da bei diesem pH-Wert eine Komplexbildung mit zweiwertigen Ionen, insbesondere mit Calciumionen, ausgeschlossen werden konnte [3] und so auf den Einsatz des im sauren schwerlöslichen EDTA verzichtet werden konnte. Die Extraktionsausbeute wurde mittels Wiederfindungsexperimenten kontrolliert. Die genaue Arbeitsvorschrift ist in Kap. 10.4 angegeben.

Die Untersuchungen wurden mittels UV 360 nm pH 2,2 und mittels FLD 350/420 nm bei pH 12,0 durchgeführt, um auf die Anwesenheit der zugesetzten Tetracycline und aller in Ei- und Plasmaproben gefundenen Metaboliten zu prüfen.

- **Ergebnisse der Untersuchungen**

Die Abb. 36 zeigt Chromatogramme von Futterproben, die jeweils eins der drei Tetracycline OTC, TC und CTC in einer Konzentration von 3000 mg/kg enthielten. Das Chromatogramm zeigt nur die Anwesenheit der zugesetzten Tetracycline und sehr geringe Konzentrationen an den Epimeren. Aus der Abb. 36 ist klar ersichtlich, daß das Hühnerfutter nicht zur Bildung von Epimeren und N-Desmethyl-Derivaten beiträgt. Mittels Fluoreszenz-Detektion wurde kein ICTC oder ein anderes der drei Isotetracycline in Futterproben nachgewiesen.

Beim CTC wurden in der Futterprobe (Abb. 36) - wie bei der Standardsubstanz - neben CTC ca. 10 % TC und 2-ADCTC (2-Acetyl-desamino-CTC) [189, 190] als Verunreinigungen des CTC-Standards ermittelt (Anhang 12.1).



**Abb. 36:** Chromatogramme von 3 Futterproben (D, E, F), denen jeweils nur eins der drei Tetracycline OTC, TC und CTC in einer Konzentration von 3000 mg/kg zugesetzt worden waren.

- **Quantitative Ergebnisse der Futteranalysen**

Die **Wiederfindung** wurde mit Dotierungsexperimenten bei den erwarteten Konzentrationen ermittelt und lag zwischen 88 und 98 %. Die in Tab. 20 angegebenen quantitativen Ergebnisse der Futteranalysen wurden entsprechend korrigiert.

Bei der Mischung der Futterprobe C am 6.2.98 kam es zu einem Mischungsfehler, bei dem statt 1000 mg/kg Tetracyclin nur 500 mg/kg dem Futter zugesetzt worden waren. Der Mischungsfehler wurde auch in dem Analysenergebnis der LUFA, Kiel, bestätigt. Aus Tab. 20 wird auch ersichtlich, daß die Konzentrationen, berechnet als freie Base, unterhalb des jeweiligen Sollgehalt lagen. Eine weitere Ursache für die Abweichungen

der Gehalte vom Sollgehalt kann auch auf eine heterogene Verteilung der drei Tetracycline im Hühnerfutter zurückgeführt werden. Die Vorgehensweise zur Mischung der drei Tetracycline mit dem Futter erfolgte hierbei nach einer praxisüblichen Vorgehensweise, bei der eine homogene Vormischung erstellt wird und diese dann weiter gemischt wird. Die Vorgehensweise ist in Kap. 10.9 angegeben.

Bezeichnung	Zeitraum der Fütterung	Sollgehalt	Eigene	Analyse LUFA
			Untersuchungen	Kiel
			Mittelwert n = 2	
B 6.2.98	9.2. – 13.2.98	1200 CTC	852	1210 CTC # 33,9 TC #
C 6.2.98	9.2. – 25.2.98	1000 OTC	909	860
		1000 TC	500	611 #
		1000 CTC	707	1070 #
C 12.2.98	9.2. – 25.2.98	1000 OTC	908	810
		1000 TC	1002	814 #
		1000 CTC	732	949 #
B	28.3. – 15.4.98	750 TC	634	k. A.
C	28.3. – 15.4.98	800 OTC	773	k. A.
		750 TC	714	
		1300 CTC	995	
A	30.7. – 13.8.98	750 OTC	688	k. A.
B	30.7. – 13.8.98	750 CTC	650	k. A.
C	30.7. – 13.8.98	750 TC	704	k. A.
D	30.7. – 13.8.98	3000 OTC	2894	k. A.
E	30.7. – 13.8.98	3000 CTC	2761	k. A.
F	30.7. – 13.8.98	3000 TC	2875	k. A.

k.A. = keine Analyse, # = Hydrochlorid

**Tab. 21: Quantitative Ergebnisse der Futteranalysen. Resultate in mg/kg als freie Basen, # als Hydrochloride**

## 6.2 Rückstandsdaten im Ei nach Medikation mit CTC, TC und OTC

In diesem Kapitel werden die Rückstandsdaten der unterschiedlichen Medikationsstudien (Tab. 22) vorgestellt.

Die quantitativen Analysenergebnisse wurden alle mit dem validierten Verfahren erhalten.

Medikationsstudie	Huhn - bezeichnung	Medikationszeitraum	Medikationsdauer Tage	Wirkstoff im Futter mg/kg
1	B 21- B 30	9.2. – 13.2.98	5	1200 CTC
2	C 41- C 50	9.2. – 12.2.98	4, wurde fortgesetzt	1000 OTC 500 TC*
2	C 41- C 50	12.2. – 25.2.98	↓ 12	1000 CTC 1000 OTC 1000 TC*
3	B 21-B 30	28.3. – 15.4.98	19	750 TC
4	C 41- C 50	28.3. – 15.4.98	19	800 OTC 750 TC 1300 CTC
5	A 1 – A 7	30.7.– 13.8.98	15	750 OTC
6	B 30- B 36	30.7. – 13.8.98	15	750 CTC
7	C 59- C 60	30.7. – 13.8.98	15	750 TC
8	D 86 –D 88	30.7. – 13.8.98	15	3000 OTC
9	E 111- E 113	30.7. – 13.8.98	15	3000 CTC
10	F 101- F 103	30.7. – 13.8.98	15	3000 TC

\* gleicher Medikationsversuch: nur die Konzentration an Tetracyclin wurde am 12.2. geändert  
Die Kontrollfütterungen mit wirkstofffreiem Futter wurden in dieser Tabelle nicht aufgeführt.

**Tab. 22: Übersicht über die Medikationsstudien. Es wurden nur Fütterungsversuche durchgeführt.**

Bei den Medikationsstudien 5, 6 und 7 wurden neben der Legehennenrasse Lohmann White SL, auch Hennen der Kreuzung „Warren-Brown x Araucana“ verwendet. Diese Hennen trugen die Bezeichnung A6, A7, B35, B36, C59 und C60 und legten braune Eier.

## 6.2.1 Rückstände in Eigelbproben

Eigelbproben aus Medikationsstudien enthielten Rückstände von CTC, ICTC, TC, OTC sowie ihrer Epimere und ihrer N-Desmethylderivate. Eine Ausnahme bildet das N-DM-CTC, das nicht nachgewiesen werden konnte. Der Metabolismus von CTC ist aufgrund der Bildung von ICTC vielfältiger als der Metabolismus von TC und OTC. Aus diesem Grund werden die Rückstandsdaten von CTC vor denen von TC und OTC beschrieben.

### 6.2.1.1 Chlortetracyclin

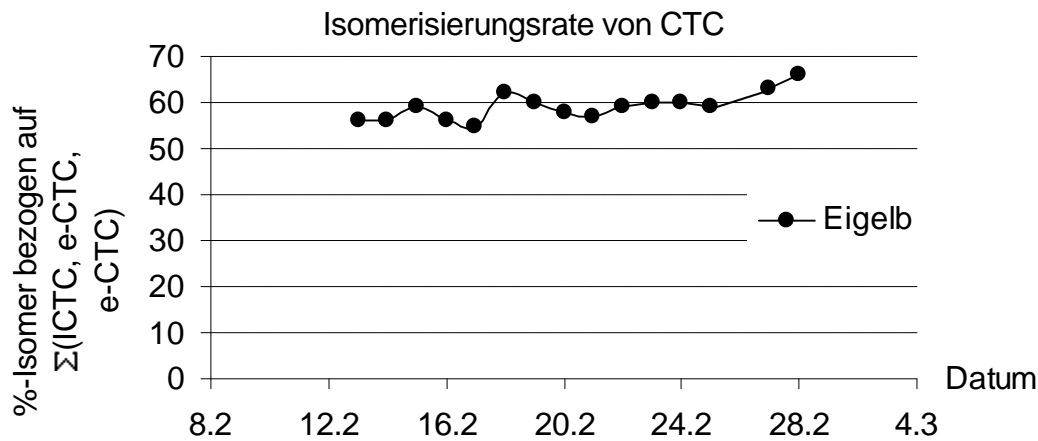
Nach Medikation der Legehennen mit Chlortetracyclin lassen sich im Ei CTC, e-CTC, ICTC, e-ICTC und postuliertes N-DM-ICTC ermitteln. ICTC ist der Hauptmetabolit des CTC in Eiern [21]. In diesem Kapitel wird ergänzend zur Arbeit von Kennedy et al. [21, 58] die Verteilung des CTC und des e-CTC, des ICTC und seines 4-Epimers sowie des postulierten N-DM-ICTC im Eigelb beschrieben.

Hinweise, die auf die Bildung von N-Desmethylchlortetracyclin schließen lassen, wurden nicht gefunden.

Die Tab. 23 zeigt die Rückstandsdaten, die auf die Medikation mit CTC zurückzuführen sind, nach der Analyse von Eigelbproben einer einzelnen Henne. Die Verhältnisse der Rückstandsgehalte für das Epimer und für die Muttersubstanz waren jeweils im zeitlichen Verlauf der Medikationsstudie nahezu konstant. Die absoluten Rückstandsgehalte unterlagen aber bei einer ad libitum Fütterung täglichen Schwankungen. Gleichzeitig nahmen von Tag zu Tag, wenn auch in einem geringen Umfang, die Rückstandsgehalte im Eigelb zu.

Das ICTC und e-ICTC treten in Eigelb- und in Eiklarproben jeweils in einem konstanten Verhältnis auf. Der Anteil am Epimer bezogen auf die Summe von e-ICTC und ICTC beträgt im Eigelb 55 %.

Unter der Isomerisierungsrate wird der Anteil an der Summe der Rückstände von ICTC und e-ICTC in Bezug auf die Summe der Rückstände von CTC, e-CTC, ICTC und e-CTC verstanden.



**Abb. 37:** Anteil ICTC und e-ICTC bezogen auf die Summe von e-CTC, CTC, e-ICTC und ICTC in Eigelbproben einer Henne der Medikationsstudie 2, Tab. 23

Aus der Abb. 37 ist zu entnehmen, daß die Isomerisierungsrate von CTC im Eigelb über einen längeren Fütterungszeitraum hinweg nicht konstant ist und mit der Fütterungsdauer zunimmt. Auch nach Medikationsende (25.2.) nimmt der prozentuale Anteil an ICTC im Eigelb zu.

Bezogen auf die Summe aller Rückstände im Eigelb ergab sich eine nahezu konstante N-Desmethylierungsrate von 8 bis 10 % (Tab. 24 und 25). Die Bildung von N-Desmethylisochlortetracyclin und die Bildung von ICTC und e-ICTC scheinen nicht zu korrelieren, d.h. die N-Desmethylierungsrate ist relativ konstant, während die Isomerisierungsrate des Chlortetracyclins über den Fütterungszeitraum hinweg zunimmt.

Auch bei verschiedenen Hennen sind die Epimerisierungs- und N-Desmethylierungsraten nahezu gleich (Tab. 24, 25). Aus den Daten ist ebenfalls ersichtlich, daß das ICTC und e-ICTC die Hauptrückstände nach Fütterung mit CTC in Eigelbproben darstellen.

Legedatum 1998	CTC µg/kg	e-CTC µg/kg	%-e-CTC an <b>S</b> (e- CTC + CTC)	ICTC µg/kg	e-ICTC µg/kg	%-e-ICTC an <b>S</b> (ICTC, e-ICTC)	%- <b>S</b> (ICTC + e-ICTC) an <b>S</b> (e-CTC, CTC, e-ICTC, ICTC)	N-DM-ICTC µg/kg	% N-DM-ICTC an <b>S</b> (e-CTC, CTC, ICTC, e-CTC, N-DM- ICTC)
9.2 <b>Beginn</b>	<NG	<NG	-	< NG	< NG	-	-	<NG	-
10.2	< NG	< NG	-	< NG	< NG	-	-	< NG	-
11.2	< NG	< NG	-	< BG	< BG	-	-	< NG	-
12.2	< BG	< BG	-	< BG	< BG	-	-	< BG	-
13.2	61	< BG	-	58	74	56	56	< BG	-
14.2	116	77	40	109	138	56	56	45	9
15.2	118	86	42	126	167	57	59	50	9
16.2.	123	99	45	126	162	56	56	50	9
17.2	161	110	41	143	190	57	55	59	9
18.2	133	98	42	172	211	55	62	59	9
19.2	147	115	44	172	214	55	60	61	9
20.2	159	128	45	178	226	56	58	63	8
21.2	165	125	43	172	213	55	57	60	8
22.2	174	135	44	197	260	57	59	72	9
23.2	178	143	45	210	274	56	60	74	8
24.2	197	145	42	225	291	56	60	78	8
25.2 <b>Ende</b>	205	140	41	219	285	57	59	77	8
26.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27.2	161	130	45	214	276	56	63	79	9
28.2	105	79	43	157	209	57	66	55	9
1.3.	63	< BG	-	111	150	57	-	< BG	-
2.3	< BG	< BG	-	62	84	57	-	< BG	-
3.3	< NG	< NG	-	-	48	-	-	< NG	-

**Tab. 23 : Rückstandsdaten des CTC und seiner Metaboliten in Eigelbproben der Medikationsstudie 2, Henne C43 mit u.a. 1000 mg/kg CTC im Legehennenfutter (Rückstandsgehalte in Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 32)**



Henne	Gesamt CTC+ ICTC + NDM- ICTC µg/kg	CTC µg/kg	e-CTC µg/kg	%-e-CTC an S(CTC + e-CTC)	ICTC µg/kg	e-ICTC µg/kg	N-DM- ICTC µg/kg	%-e-ICTC an S(ICTC + e-ICTC)	%-Anteil von S(ICTC + e-ICTC) an S(ICTC + e-ICTC + CTC + e-CTC)	%-N-DM-ICTC an S(ICTC + e-ICTC + CTC + e-CTC + N-DM-ICTC)
C41	1362	241	180	43	360	453	128	56	66	9
C42	4409	940	681	42	1043	1364	381	57	59	9
C43	912	175	139	44	236	287	75	55	63	8
C44	1276	259	211	45	285	408	113	59	59	9
C45	522	89	73	45	138	175	47	56	66	9
C46	1927	407	319	44	444	584	173	57	59	9
C47	769	151	107	41	203	247	61	55	64	8
C48	877	164	124	43	241	272	76	53	64	9
C49	850	181	149	45	201	243	76	55	57	9
C50	1396	252	156	38	356	508	124	59	68	9

**Tab. 24: Eigelbproben der Medikationsstudie 4. Hennen C41 bis C50 : Medikation mit der Konzentration 1300 mg/kg an CTC,  
Legedatum : 14.4.98 (18. Behandlungstag). (Rückstandsgehalte in Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 33)**

Henne	Summe aller Rückstände µg/kg	CTC µg/kg	e-CTC µg/kg	%-e-CTC an <b>S</b> (CTC + e-CTC)	ICTC µg/kg	e-ICTC µg/kg	N-DM-ICTC µg/kg	%-e-ICTC an <b>S</b> (ICTC + e-ICTC)	%- <b>S</b> (ICTC + e-ICTC) an <b>S</b> (CTC, e-CTC, e-ICTC, ICTC)	%-N-DM-ICTC an <b>S</b> (ICTC + e-ICTC + CTC + N-DM-ICTC)
B 30	530	78	< BG	-	136	222	45	62	-	-
B 31	515	91	63	41	141	180	< BG	56	68	-
B 32	552	126	74	37	147	161	44	52	61	8
B 33	502	60	65	52	135	195	47	59	72	9
B 34	411	< BG	< BG	-	111	147	< BG	-	-	-
B 35	530	112	88	44	112	178	40	60	58	8
B 36	413	65	< BG	-	115	163	< BG	59	73	-
E 111	1879	423	249	37	440	619	148	58	61	8
E 112	2825	613	360	37	632	951	229	60	61	8
E 113	1518	359	213	37	321	484	141	60	58	9

**Tab. 25: Eigelbproben der Medikationsstudien 6 und 9. Henne B30 bis B36 : Medikation mit der Konzentration 750 mg/kg an CTC, Hennen E 112 und E113 : Medikation bis zum 15.8.98 mit einem Futter mit der Konzentration 3000 mg/kg, Legedatum 13.8.98 (15. Behandlungstag); (Rückstandsgehalte in Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 34)**

### 6.2.1.2 Tetracyclin

Nach Medikation von Legehennen mit TC wurden in Eigelbproben TC und e-TC sowie das postulierte N-Desmethylyltetracyclin (N-DM-TC) und sein postuliertes Epimer (e-N-DM-TC) bestimmt.

Zur Untersuchung des Metabolismus von Tetracyclin wurden die Medikationsstudien 2, 3, 4, 7 und 10 durchgeführt (Tab. 22). Bei den Medikationsstudien 3, 7 und 10 erhielten die Legehennen ein Medizinalfutter, welches nur Tetracyclin als Wirkstoff enthielt.

Tab. 26 zeigt die Rückstandsdaten von Eigelbproben einer einzelnen Henne aus Medikationsstudie 2.

Lege- datum 1998	Eigelb		
	TC µg/kg	e-TC µg/kg	% e-TC an S(e-TC + TC)
9.2. <b>Beginn</b>	<NG	<NG	-
10.2	< NG	< NG	-
11.2	< BG	< BG	-
12.2	50	< BG	-
13.2	107	101	49
14.2	192	187	49
15.2	224	216	49
16.2.	223	225	50
17.2	264	259	50
18.2	278	269	49
19.2	337	316	48
20.2	364	345	49
21.2	387	371	49
22.2	410	395	49
23.2	415	418	50
24.2	426	420	50
25.2 <b>Ende</b>	422	425	50
26.2	-	-	-
27.2	398	384	49
28.2	317	311	50
1.3.	201	249	55
2.3	143	175	55
3.3	101	125	55

NG = Nachweisgrenze, # = alle Werte für e-TC im Eiklar liegen unterhalb der Bestimmungsgrenze

**Tab. 26: Eigelbproben einer einzelnen Henne der Medikationsstudie 2  
(Rückstandsgehalte in Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 37)**

Über einen längeren Medikationszeitraum hinweg liegt eine konstante Epimerisierungsrate von Tetracyclin in Eigelbproben vor. Nachdem bei einer einzelnen Henne Rückstandsdaten über einen längeren Fütterungszeitraum hinweg vorlagen, wurde untersucht, ob die Rate von

Tier zu Tier unterschiedlich ist. Die Epimerisierungsrate ist bei verschiedenen Hennen nahezu identisch (Tab. 27, 28). Ebenfalls konnte in den Eigelbproben das N-Desmethyl-Tetracyclin bestimmt werden (Tab. 27).

Henne	Eigelb					
	<b>S(TC + e-TC + N-DM-TC)</b> µg/kg	TC µg/kg	e-TC µg/kg	N-DM-TC µg/kg	%-e-TC an <b>S(e-TC + TC)</b>	%-N-DM-TC an <b>S(e-TC + TC + N-DMTC)</b>
F 101	2342	996	917	429	47	18
F 102	2034	859	818	357	48	18
F 103	2337	1115	783	439	41	19
C59	285	121	110	54	49	19
C60	236	101	92	< BG	48	-
B21	734	306	290	138	49	19
B22	1744	732	672	340	48	20
B23	746	307	303	136	50	18
B24	413	189	148	76	44	18
B25	438	191	164	83	46	19
B26	862	389	309	164	44	19
B27	581	246	226	109	48	19
B28	701	306	255	140	45	20
B29	286	119	106	61	47	21
B30	1721	727	648	346	47	20

Die N-Desmethylierung bezieht sich hier auf die Summe aller Rückständen im Eigelb, die auf die Medikation mit Tetracyclin zurückzuführen sind.

**Tab. 27: Henne F101 bis F103 Medikation mit der Konzentration 3000 mg/kg an TC, Legedatum 12.8.98 (14. Medikationstag der Medikationsstudie 10)**  
**Henne C59 und C60 Medikation mit der Konzentration 750 mg/kg an TC Legedatum 12.8.98 (14. Medikationstag der Medikationsstudie 7)**  
**Henne B21 bis B30 Medikation mit der Konzentration 750 mg/kg an TC Legedatum 14.4.98 (18. Medikationstag der Medikationsstudie 3)**  
**(Rückstandsgehalte in Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 36)**

Henne	TC µg/kg	e-TC µg/kg	%-e-TC an S(e-TC + TC)	Henne	TC µg/kg	e-TC # µg/kg	%-e-TC an S(e-TC + TC)
C41	327	297	48	C46	572	554	49
C42	1272	1013	44	C47	216	197	48
C43	352	264	43	C48	289	255	47
C44	519	466	47	C49	275	276	50
C45	198	208	46	C50	499	508	50

Aufgrund der Coelution mit e-OTC wurden die Rückstandsgelhalte für N-DM-TC in Eigelbproben nicht bestimmt.

**Tab. 28: Henne C41 bis C50 : Medikation mit der Konzentration 750 mg TC/kg Futter (neben OTC und CTC, Tab. 20).**

**Legedatum : 12.4.98, 16. Behandlungstag, Medikationsstudie 4.  
(Rückstandsgelhalte in Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 35)**

### 6.2.1.3 Oxytetracyclin

Nach Medikation der Legehennen mit Oxytetracyclin lassen sich in Eigelbproben OTC, e-OTC und postuliertes N-DM-OTC bestimmen.

Zur Untersuchung des Metabolismus von OTC wurden die Medikationsversuche 5 und 8 durchgeführt, bei denen die Legehennen mit einem Medizinalfutter behandelt wurden, das nur OTC enthielt.

Henne	S (OTC + e-OTC + N-DM- OTC) µg/kg	OTC µg/kg	e-OTC µg/kg	N-DM- OTC µg/kg	%-e OTC an S(OTC + e-OTC)	%-N-DM- OTC an S(OTC + e-OTC)
A1	205	161	44	< BG	21	-
A2	196	151	45	< BG	23	-
A3	187	142	45	<NG	24	-
A4	106	106	< BG	<NG	-	-
A5	273	210	63	< BG	23	-
A6	210	163	47	<NG	22	-
A7	203	157	46	< BG	23	-
D86	829	591	179	59	23	7
D87	828	600	165	63	22	8
D88	714	496	158	60	24	8

**Tab. 29: Henne A1 bis A6 : Medikation mit der Konzentration 750 mg/kg an OTC**

**Henne D86 bis D88 : Medikation mit der Konzentration 3000 mg/kg an OTC**

**Legedatum 12.8.98, 14. Behandlungstag der Medikationsstudien 5 und 8.  
(Rückstandsgelhalte in Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 39)**

Die Epimerisierungsrate von OTC war bei allen Hennen nahezu identisch und lag bei 23 % (Tab. 29). Die N-Desmethylierung des OTC bezieht sich bei den Medikationsstudien 5 und 8 auf die Summe von allen Rückständen im Eigelb, die auf die Medikation mit OTC zurückzuführen sind.

Bei den anderen Medikationsstudien 2 und 4 enthielt das Medizinalfutter neben OTC auch TC und CTC. Hier konnte das e-OTC wegen der Coelution mit N-DM-TC nicht bestimmt werden. OTC wurde über die Höhe quantifiziert, da keine Basislinientrennung zwischen OTC und e-OTC sowie dem N-DM-TC möglich war. Allerdings wurde die Bestimmung des postulierten N-DM-OTC nicht gestört. Hier lagen allerdings in vielen Fällen die Konzentrationen des N-DM-OTC zwischen der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, so daß nur bei der Henne C 42 die N-Desmethylierungsrate bestimmt werden konnte.

Henne	Eigelb		
	OTC µg/kg	N-DM-OTC µg/kg	%-N-DM-OTC an S(OTC + N-DM-OTC)
C41	228	< BG	-
C42	721	61	8
C43	278	< BG	-
C44	299	< BG	-
C45	115	< NG	-
C46	343	< BG	-
C47	131	< NG	-
C48	127	< NG	-
C49	176	< BG	-
C50	244	< BG	-

**Tab. 30: Henne C41 bis C50: Medikation mit der Konzentration 800 mg/kg an OTC, Legedatum : 12.4.98 (16. Medikationstag), Medikationsstudie 4. (Rückstandsgehalte in Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 39)**

Die N-Desmethylierungsrate des OTC erwies sich für alle Eigelbproben der Tab. 29 und 30 als nahezu identisch und lag bei 7 bis 8 %. Die Rückstandsdaten für N-DM-OTC der Medikationsstudie 2 lagen alle unterhalb der Bestimmungsgrenze (Tab 29). Die Rückstandsdaten für das OTC der Tab. 31 wurden ebenfalls wegen der Coelution mit N-DM-TC über die Höhe berechnet.

Legedatum 1998	Eigelb
9.2 <b>Beginn</b>	< NG
10.2	< NG
11.2	< BG
12.2	80
13.2	157
14.2	264
15.2	266
16.2	267
17.2	304
18.2	282
19.2	312
20.2	297
21.2	303
22.2	311
23.2	331
24.2	315
25.2 <b>Ende</b>	317
26.2	--
27.2	305
28.2	190
1.3	106
2.3	72
3.3	49

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze

**Tab. 31: Medikationsstudie 2, Medikation mit 1000 mg OTC/kg Futter.  
(Rückstandsdaten Eiklarproben derselben Eier siehe Tab. 38)**

## 6.2.2 Rückstände in Eiklarproben

### 6.2.2.1 Chlortetracyclin

In Eiklarproben liegen nach Medikation mit CTC vor allem ICTC und e-ICTC vor. Die Isomerisierungsrate beträgt hier nahezu 100 %, da CTC und e-CTC nur in Spuren anwesend sind. In Eiklarproben konnte kein postuliertes N-DM-ICTC nachgewiesen werden.

Im zeitlichen Verlauf der Medikationsstudie waren die Verhältnisse der Rückstandsgehalte für e-ICTC und für ICTC in Eiklarproben relativ zueinander konstant (Tab. 32). Die absoluten Rückstandsgehalte unterlagen aber bei einer *ad libitum* Fütterung täglichen Schwankungen. In Eiklarproben wurde, abgesehen von täglichen Schwankungen, schnell ein Maximalwert erreicht. Ähnlich wie bei Eigelbproben (Kap. 6.2.1.2) sind in Eiklarproben die Epimerisierungsraten des ICTC für verschiedene Hennen nahezu konstant (Tab. 33 und 34), unabhängig von der Medikationsstudie.

Legedatum 1998	ICTC µg/kg	e-ICTC µg/kg	% e-ICTC	S(ICTC + e-ICTC) µg/kg
9.2 <b>Beginn</b>	<NG	<NG	-	
10.2	165	45	21	210
11.2	243	57	19	300
12.2	213	54	20	267
13.2	209	55	21	264
14.2	252	70	22	322
15.2	253	68	21	321
16.2.	286	77	21	363
17.2	240	70	23	310
18.2	299	83	22	382
19.2	222	67	23	289
20.2	198	63	24	261
21.2	182	59	25	241
22.2	339	88	21	427
23.2	309	82	21	391
24.2	241	68	22	309
25.2 <b>Ende</b>	281	82	23	363
26.2	-	-	-	-
27.2	147	35	19	182
28.2	< BG	-	-	< BG
1.3	< BG	-	-	< BG
2.3	< BG	-	-	< BG
3.3	< NG	-	-	< NG

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze

**Tab. 32: Rückstandsdaten der Metaboliten des CTC in Eiklarproben der Medikationsstudie 2 mit 1000 mg/kg CTC im Futter**



Henne	<b>S(ICTC + e-ICTC)</b> µg/kg	ICTC µg/kg	e-ICTC µg/kg	%-e-ICTC an <b>S(ICTC + e-ICTC)</b>
C41	586	457	129	22
C42	2296	1837	459	20
C43	440	348	92	21
C44	889	667	222	25
C45	307	233	74	24
C46	831	648	183	22
C47	348	275	73	21
C48	472	373	99	21
C49	521	401	120	23
C50	881	687	194	22

N-DM-ICTC, e-CTC waren im Eiklar nicht nachweisbar, CTC nur in Spuren nachweisbar

**Tab. 33: Henne C41 bis C50 : Medikation mit der Konzentration 1300 mg/kg an CTC, Legedatum : 14.4.98 (18. Medikationstag), Medikationsstudie 4.**

Henne	<b>S(ICTC + e-ICTC)</b> µg/kg	ICTC µg/kg	e-ICTC µg/kg	%-e-ICTC an <b>S(ICTC+ e-ICTC)</b>
B 30	230	168	62	27
B 31	227	165	62	27
B 32	202	155	47	23
B 33	260	200	60	23
B 34	247	198	49	20
E 35	220	176	44	20
E 36	480	357	123	26
E 111	1677	1235	442	26
E 112	1547	1178	369	24
E 113	1164	876	288	25

N-DM-ICTC, e-CTC waren im Eiklar nicht nachweisbar, CTC nur in Spuren nachweisbar

**Tab. 34: Henne B30 bis B36 : Medikation mit der Konzentration 750 mg/kg an CTC, Henne E112 und E113 : Medikation mit der Konzentration 3000 mg/kg, Legedatum 13.8.98 (15. Behandlungstag), Medikationsstudien 6 und 9**

### 6.2.2.2 Tetracyclin

Eiklarproben, die aus Medikationsstudien mit Tetracyclin stammen, enthalten in relativ niedriger Konzentration Rückstände an e-TC und TC. Aufgrund der deutlich geringen Konzentrationen an TC und e-TC im Eiklar waren massen- und UV-spektroskopische Untersuchungen bei Eiklarproben nicht erfolgreich. Die Zuordnung der Peaks im Chromatogramm erfolgte durch Co-Chromatographie mit TC und e-TC und über die Retentionszeit von TC und e-TC. In den Chromatogrammen von Eiklarproben konnte kein Peak dem postulierten N-DM-TC oder e-N-DM-TC zugeordnet werden.

Die Epimerisierungsraten waren auch bei verschiedenen Hennen nahezu konstant (Tab. 35 und 36), unabhängig von der Medikationsstudie. Die meisten Rückstandsdaten, die für das e-TC erhalten wurden lagen jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Henne	Eiklar		
	TC µg/kg	e-TC # µg/kg	%-e-TC an S(e-TC + TC)
C41	63	< BG	-
C42	211	68	24
C43	57	< BG	-
C44	92	< BG	-
C45	39	< BG	-
C46	110	37	25
C47	42	< BG	-
C48	52	< BG	-
C49	52	< BG	-
C50	108	37	25

# Die Bestimmungsgrenze nach DIN für e-TC in Eiklarproben ist 33 µg/kg

**Tab. 35: Henne C41 bis C50 : Medikation mit der Konzentration 750 mg/kg an TC  
Legedatum 12.4.98, 16. Behandlungstag der Medikationsstudie 4.**

Henne	Eiklar			
	<b>S(TC + e-TC)</b>	TC	e-TC #	<b>%-e-TC an S(e-TC + TC)</b>
		$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$	
F 101	238	178	60	25
F 102	218	165	53	24
F 103	254	194	60	24
C59	-	< BG	< NG	-
C60	-	< BG	< NG	-
B21	-	55	< BG	-
B22	173	129	44	25
B23	-	62	-	-
B24	-	< BG	< NG	-
B25	-	33	< NG	-
B26	-	67	< BG	-
B27	-	44	< NG	-
B28	-	53	< BG	-
B29	-	< BG	< NG	-
B30	185	137	48	26

In Eiklarproben ist kein N-DM-TC enthalten, # Die Bestimmungsgrenze nach DIN für e-TC in Eiklarproben ist 33  $\mu\text{g/kg}$

**Tab. 36: Henne F101 bis F103 : Medikation mit der Konzentration 3000 mg/kg an TC, Legedatum 12.8.98 (14. Behandlungstag der Medikationsstudie 10)**  
**Henne C59 und C60 : Medikation mit der Konzentration 750 mg/kg an TC Legedatum 12.8.98 (14. Behandlungstag der Medikationsstudie 7)**  
**Henne B21 bis B30 : Medikation mit der Konzentration 750 mg/kg an TC Legedatum 14.4.98 (18. Behandlungstag der Medikationsstudie 3)**

Legedatum 1998	TC $\mu\text{g/kg}$	Legedatum 1998	TC $\mu\text{g/kg}$
9.2 <b>Beginn</b>		19.2	81
10.2	< BG	20.2	80
11.2	40	21.2	55
12.2	37	22.2	57
13.2	35	23.2	62
14.2	41	24.2	47
15.2	44	25.2 <b>Ende</b>	64
16.2.	52	26.2	-
17.2	52	27.2	45
18.2	70	28.2	< NG

NG = Nachweisgrenze, alle Werte für e-TC im Eiklar liegen unterhalb der Bestimmungsgrenze

**Tab. 37: Rückstandsdaten von Eiklarproben einer einzelnen Henne, Medikationsstudie 2**

### 6.2.2.3 Oxytetracyclin

Nach Medikation der Legehennen mit OTC lassen sich in Eiklarproben nur OTC und ein weiterer unbekannter Metabolit des OTC ermitteln (Kap. 6.3).

Im folgenden sind sowohl der zeitliche Verlauf der Rückstandskonzentration von OTC in Eiklarproben (Tab. 38) sowie die Rückstandsdaten bei verschiedenen Hennen und verschiedenen Medikationsstudien angegeben (Tab. 39).

Legedatum 1998	Eiklar OTC µg/kg
9.2 <b>Beginn</b>	< NG
10.2	61
11.2	130
12.2	129
13.2	133
14.2	135
15.2	157
16.2.	174
17.2	160
18.2	161
19.2	195
20.2	195
21.2	151
22.2	160
23.2	182
24.2	143
25.2 <b>Ende</b>	168
26.2	--
27.2	128
28.2	86
1.3	58
2.3	
3.3	

NG = Nachweisgrenze, # = Werte für N-DM-OTC in Eigelbproben liegen alle unterhalb der errechneten Bestimmungsgrenze nach DIN

**Tab. 38 :** *Eiklarproben einer einzelnen Henne der Medikationsstudie 2, Rückstände nach Medikation mit 1000 mg/kg OTC*

Eiklar	
Henne	OTC µg/kg
C41	102
C42	327
C43	148
C44	154
C45	66
C46	164
C47	66
C48	69
C49	101
C50	134

Tab. 39 a

Eiklar	
Henne	OTC µg/kg
A1	112
A2	103
A3	98
A4	90
A5	180
A6	120
A7	95
D86	387
D87	467
D88	519

Tab. 39 b

*Tab. 39 a: Medikationsstudie 4. Henne C41 bis C50 : Medikation 800 mg/kg OTC,  
Legedatum : 12.4.98 (16. Medikationstag)*

*Tab. 39 b: Henne A1 bis A6 : Medikation mit 750 mg/kg OTC*

*Henne D86 bis D88 : Medikation mit 3000 mg/kg OTC*

*Legedatum 12.8.98, 14. Behandlungstag Medikationsstudien 5 und 8.*

### 6.2.3 Vergleich Eigelb – Eiklar

In diesem Abschnitt des Kapitels Medikationsstudien werden die Rückstandsdaten von Eigelbproben mit denen von Eiklarproben verglichen. Durch den Vergleich wird deutlicher, welche Rückstände sich in welchen Bestandteilen des Eies befinden.

#### 6.2.3.1 Chlortetracyclin

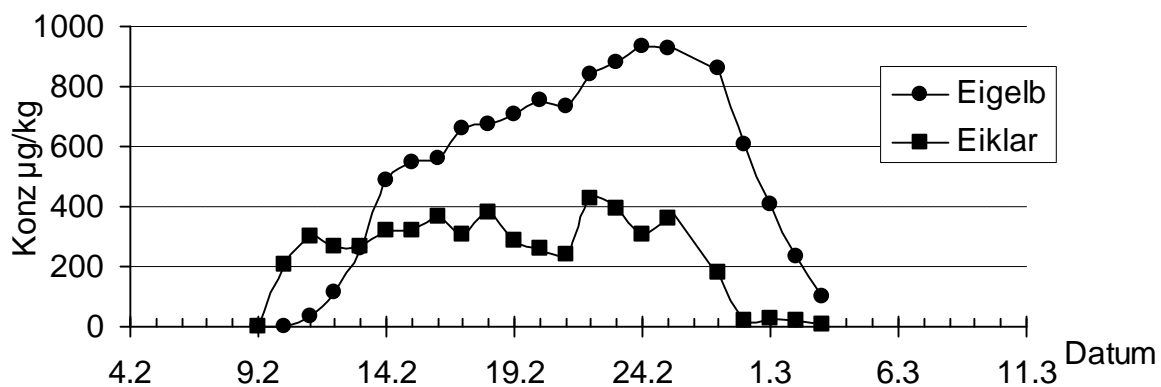
Beim Chlortetracyclin handelt es sich um den Wirkstoff mit den meisten bekannten Metaboliten. Neben dem bislang unbekanntem N-DM-ICTC wurden alle bekannten Metaboliten des CTC im Eigelb nachgewiesen und bestimmt (Tab. 40). Postuliertes N-DM-CTC konnte nicht nachgewiesen werden. In Eiklarproben lassen sich nur das e-ICTC und ICTC quantifizieren (Tab. 40), deswegen wird im folgenden Text auch nur die Epimerisierungsrate von ICTC in Eigelbproben mit der in Eiklarproben verglichen.

	Eigelb	Eiklar
CTC	+	nur in Spuren, < BG
e-CTC	+	-
ICTC	+	+
e-ICTC	+	+
N-DM-ICTC	+	-
N-DM-CTC	-	-

+ = nachweisbar, - = kleiner Nachweisgrenze

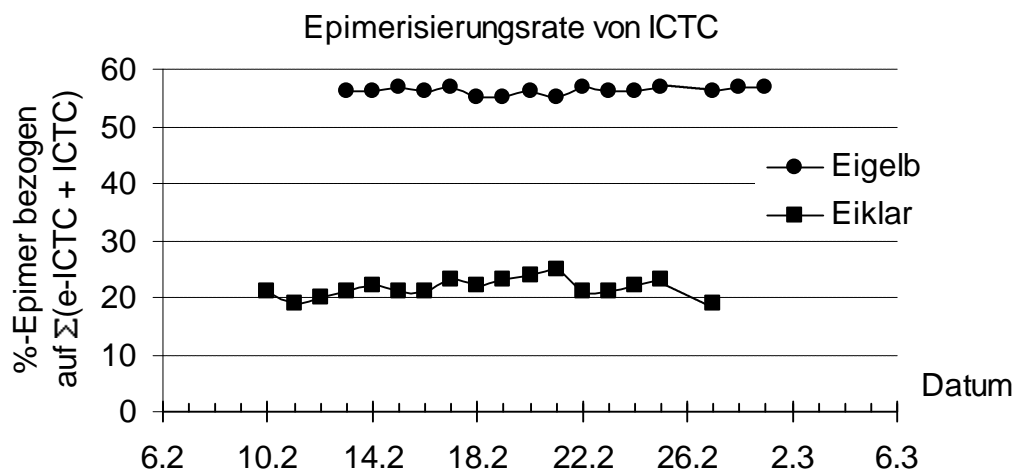
**Tab. 40: Rückstände nach Medikation mit CTC in Eigelb- und Eiklarproben.**

Die Gesamt-Rückstandskonzentration von CTC, e-CTC, ICTC und e-ICTC war nach dem 5. Behandlungstag in Eigelbproben deutlich höher als in Eiklarproben (Abb. 38). Im Eigelb strebte sie gegen Medikationsende ein Maximum an, hingegen im Eiklar war sie während der Medikationsdauer nahezu konstant.



**Abb. 38: Summe von CTC, e-CTC, ICTC, e-ICTC und NDM-ICTC in Eigelbproben und die Summe von ICTC und e-ICTC in Eiklarproben einer einzelnen Henne, Medikationsbeginn war der 9.2. und Medikationsende der 25.2. Medikationsstudie 2**

Das ICTC und sein Epimeres treten in Eigelb- und in Eiklarproben jeweils in einem nahezu konstanten Verhältnis auf (Abb. 39).



**Abb. 39: Epimerisierungsrate von ICTC in Eigelb- und in Eiklarproben einer einzelnen Henne, Medikationsstudie Nr. 2, Legepause am 26.2., Daten siehe Tab. 23 und 32**

Tab. 41 faßt die Ergebnisse der Medikationsstudien mit CTC zusammen. Die Eigelb- und Eiklarproben, die von verschiedenen Hennen stammten, zeigten vergleichbare Epimerisierungsraten und N-Desmethylierungsraten. Bei den Minimal- und Höchstwerten handelt es sich für bestimmte prozentuale Anteile oft nur um Einzelwerte, die meisten Werte lagen innerhalb eines engeren Bereiches. Nur der prozentuale Anteil der Summe von ICTC und e-ICTC an der Summe von (CTC, e-CTC, ICTC, e-ICTC) (Isomerisierungsrate) in Eigelbproben verschiedener Hennen weist eine deutlich größere Schwankungsbreite auf.

Rückstand	Eigelb Minimal- und Höchstwerte	Eiklar Minimal- und Höchstwerte
%-e-CTC bezogen auf $\Sigma(\text{e-CTC} + \text{CTC})$	37 bis 52 %	CTC nur in Spuren nachweisbar
%-e-ICTC bezogen auf $\Sigma(\text{e-ICTC} + \text{ICTC})$	52 bis 62 %	19 bis 27 %
%-S(ICTC + e-ICTC) bezogen auf $\Sigma(\text{e-CTC} + \text{CTC} + \text{e-ICTC} + \text{ICTC})$	55 % bis 73 %	nahezu 100 %
%-N-DM-ICTC bezogen auf $\Sigma(\text{e-CTC} + \text{CTC} + \text{ICTC} + \text{e-ICTC} + \text{N-DM-ICTC})$	8 bis 9 %	N-DM-ICTC nicht nachweisbar

**Tab. 41 : Minimal – und Höchstwerte für die Anteile an Epimeren und des Anteils an ICTC und N-DM-ICTC in Eigelb- und Eiklarproben nach Medikation mit CTC in unterschiedlicher Dosis**

6.2.3.2 Tetracyclin

Die Rückstandskonzentration von TC und e-TC war in Eigelbproben deutlich höher als in Eiklarproben (Abb. 40). In Eiklarproben der Studie 2 lagen nur die Rückstandsdaten von TC oberhalb der Bestimmungsgrenze.

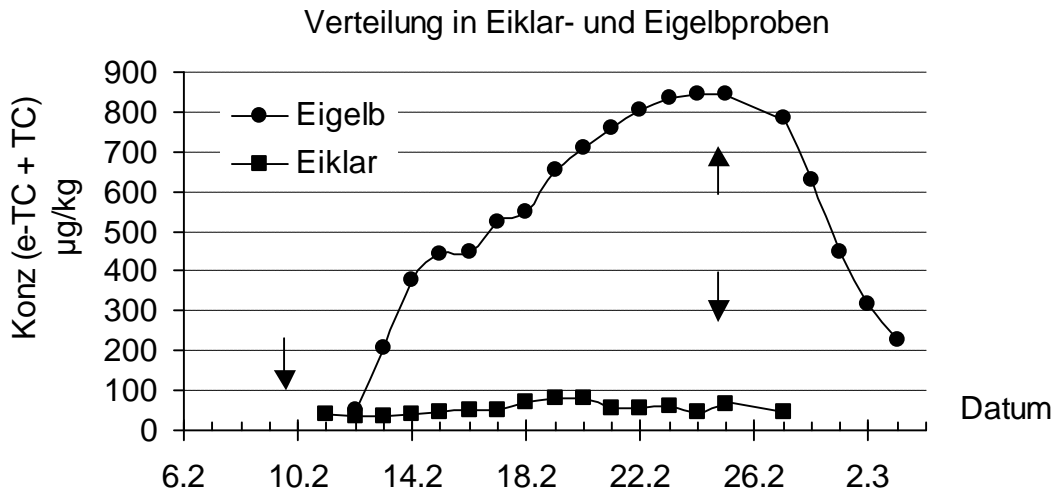


Abb. 40: Verteilung der Summe von e-TC und TC in Eigelb- und Eiklarproben einer einzelnen Henne, Tab. 26 und 37

Pfeile markieren Beginn (9.2) und Ende (25.2) der Medikationsstudie 2

Die Konzentration von TC blieb im Eiklar während der Medikationsstudie nahezu konstant, hingegen nahm sie im Eigelb gegen Medikationsende ein Maximum an.

Über einen längeren Medikationszeitraum liegt in Eigelb eine konstante Epimerisierungsrate vor (Abb. 41).

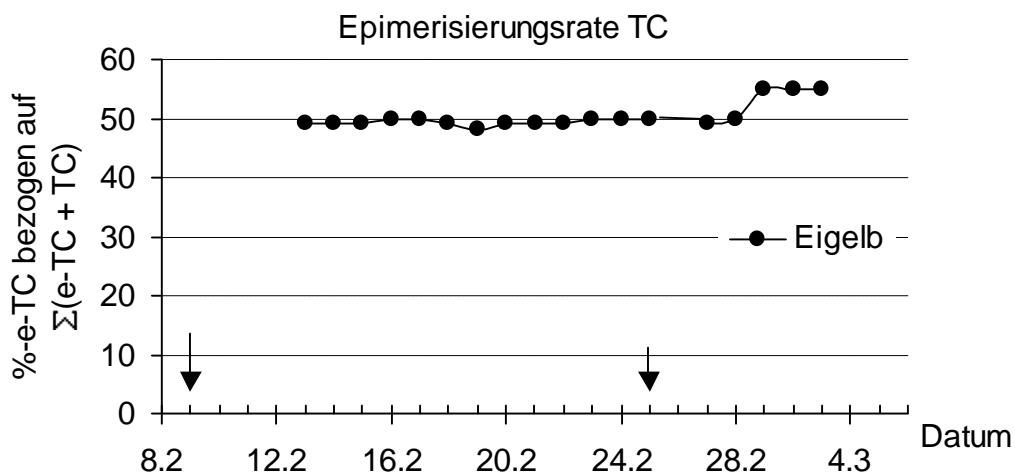


Abb. 41. : Epimerisierungsraten von TC in Eigelbproben von Eiern einer einzelnen Henne, Tab. 26

Pfeile markieren Beginn und Ende der Medikationsstudie 2



Die Epimerisierungsraten von TC sind in Eigelbproben waren deutlich höher als in Eiklarproben (Abb. 41, Tab. 42). N-DM-TC war in Eiklarproben nicht nachweisbar (Tab. 42) und die Rückstandsdaten von e-TC lagen bei vielen Eiklarproben zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

	Eigelb	Eiklar
%-e-TC bezogen auf $\Sigma(e\text{-TC} + \text{TC})$	41 bis 55 %	24 bis 26 %
%-N-DM-TC bezogen auf $\Sigma(e\text{-TC} + \text{TC} + \text{N-DM-TC})$	18 bis 20 %	N-DM-TC nicht nachweisbar

Tab. 42 : Minimal- und Maximalwerte für Epimerisierungs- und N-Desmethylierungsraten des Tetracyclins

### 6.2.3.3 Oxytetracyclin

E-OTC und N-DM-OTC waren nur in Eigelbproben nachweisbar (Tab. 43). Die höheren Rückstandskonzentrationen an OTC werden in Eigelbproben erreicht.

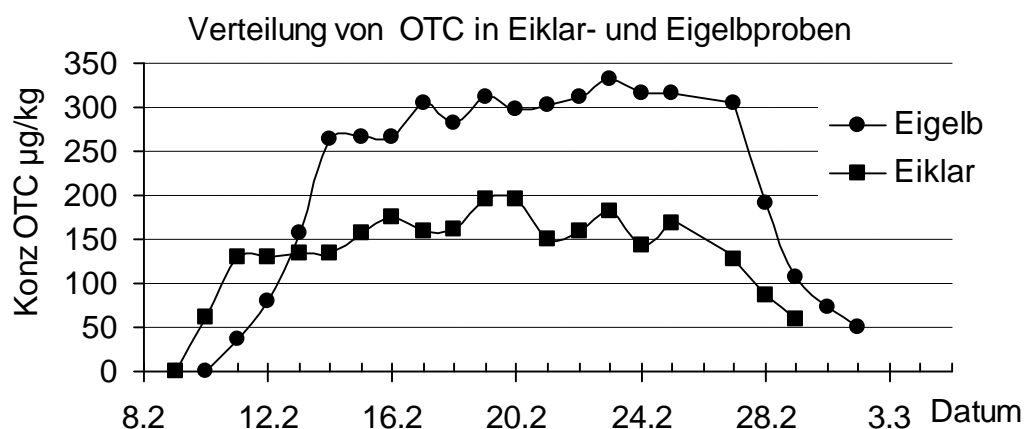


Abb.42 : Verteilung von OTC in Eiklar- und Eigelbproben der Medikationsstudie 2, Tab. 31 und 38, Medikationsbeginn 9.2, Medikationsende 25.2

	Eigelb	Eiklar
%-e-OTC bezogen auf $\Sigma(e\text{-OTC} + \text{OTC})$	21 bis 24 %	kein e-OTC nachweisbar
% N-DM-OTC bezogen auf $\Sigma(e\text{-OTC} + \text{OTC} + \text{N-DM-OTC})$	7 bis 8 %	kein N-DM-OTC nachweisbar

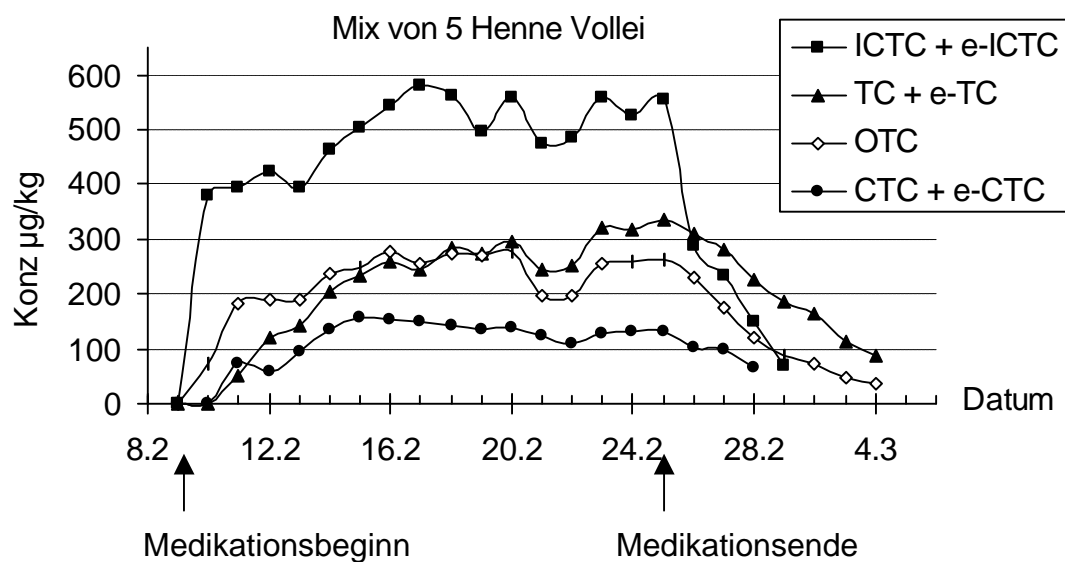
Tab. 43: Minimal- und Höchstwerte für die Anteile an Epimeren und des Anteils an postulierten N-DM-OTC in Eigelbproben. Eiklarproben enthalten nur OTC.

## 6.2.4 Rückstandsdaten im Vollei

Aus den Rückstandsdaten von Eigelb- und Eiklarproben lassen sich die Gehalte im Vollei berechnen, da der Eigelbanteil im Ei in Abhängigkeit vom Lebensalter der Henne nur geringfügig schwankt [68]. Umgekehrt lassen sich aus den Rückstandsgehalten von Volleiprobe keine Schlüsse über die mögliche Verteilung auf Eigelb- und Eiklarproben ziehen. Die Rückstandsdaten von Volleiprobe haben daher eine geringere Aussagekraft als die Rückstandsdaten von Eigelb- und Eiklarproben.

Proben der Medikationsstudie 2 wurden als Vollei auf die Rückstände von CTC, TC, OTC und ICTC untersucht (Abb. 43). Hierbei wurde auch untersucht, welches der drei Tetracycline in Ei zu den höchsten Rückstandskonzentrationen führen kann.

Ein Meßwert stellt eine Mischprobe von 5 Eiern 5 verschiedener Hennen dar, an die jeweils das gleiche Futter verfüttert wurde. Die Gehalte an den N-Desmethylderivaten des OTC und des ICTC wurden in Abb. 43 nicht mit aufgeführt, da die Konzentrationen im Vollei zwar nachweisbar, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Im Falle des N-DM-TC liegt eine Coelution mit e-OTC vor, so daß hier eine Quantifizierung nicht möglich war. Wegen der Coelution des e-OTC und des N-DM-TC, wurde außerdem das OTC über die Höhe der Peaks in den Chromatogrammen quantifiziert. Die Rückstandsgehalte sind in Tab. 44 zusammengefaßt, die Rückstandsverläufe sind in Abb. 43 dargestellt.



**Abb. 43: Medikationsstudie 2. Rückstandsgehalt von OTC, sowie von TC, CTC und ICTC und ihre Epimeren in homogenisiertem Vollei. Eine Analyse war eine Mischprobe von 5 Hennen. Analysenwerte siehe Tab. 44.**

Lege- datum	OTC	S TC e-TC	S CTC + e-CTC	S ICTC + e-ICTC	e-TC	TC	e-CTC	CTC	e-ICTC	ICTC	% e-TC	% e-CTC	% e-ICTC
9.2.98	< NG	< NG	< NG	< NG									
10.2.98	72	-	-	380	< NG	< BG	< NG	< BG	92	288	-	-	24
11.2.98	182	50	72	393	< BG	50	< BG	72	134	259	-	-	34
12.2.98	189	121	60	422	44	77	29	60	156	266	36	-	37
13.2.98	190	143	96	394	56	87	31	65	147	247	39	32	37
14.2.98	238	204	134	465	84	120	43	91	174	291	41	32	37
15.2.98	249	233	156	505	96	137	50	106	194	311	41	32	38
16.2.98	279	259	154	545	114	144	53	101	211	334	44	34	39
17.2.98	257	245	150	580	108	137	52	98	213	367	44	34	37
18.2.98	273	286	142	562	127	160	46	96	210	352	44	32	37
19.2.98	271	273	135	498	124	149	42	93	168	330	45	31	34
20.2.98	278	296	140	560	134	162	43	98	200	360	45	30	36
21.2.98	199	245	123	475	110	135	43	80	184	291	45	35	39
22.2.98	198	252	111	485	114	138	37	74	181	304	45	33	37
23.2.98	254	320	129	560	150	170	43	86	209	351	47	33	37
24.2.98	259	319	133	525	145	174	43	90	204	321	45	32	39
25.2.98	264	337	133	555	152	185	42	91	221	334	45	31	40
Ende der Medikation													
26.2.98	231	312	103	290	144	168	< BG	67	107	183	46	-	37
27.2.98	175	281	99	235	139	142	< BG	64	91	144	50	-	39
28.2.98	121	225	67	150	113	112	< BG	44	69	81	50	-	46
1.3.98	88	186	-	70	97	90	< BG	< BG	34	36	52		49
2.3.98	73	166	-	-	87	79	< NG	< BG	< BG	< BG	52		
3.3.98	46	114	-	-	63	51		< BG	< BG	< BG	55		
4.3.98	38	87	-	-	49	38		< BG	< BG	< BG	56		

**Tab. 44: Rückstandsdaten in Vollei µg/kg, Medikationsstudie 2, Mischprobe aus 5 Eiern, nach Medikation mit 1000 mg/kg OTC, TC und CTC.**

---

Für die Rückstandskonzentrationen im Vollei ergibt sich eine Reihenfolge von  $\Sigma(\text{OTC} + \text{e-OTC}) \leq \Sigma(\text{TC} + \text{e-TC}) < \Sigma(\text{CTC} + \text{ICTC})$  mit den höchsten Rückstandskonzentrationen für die Summe aller Rückstände nach Medikation mit CTC.

Kleinere Schwankungen im Rückstandsgehalt der drei Tetracycline im Vollei können wie beim Eiklar auf eine täglich unterschiedliche Futteraufnahme zurückgeführt werden, da die Hennen *ad libitum* mit dem Medizinalfutter gefüttert wurden.


Abb. 43 zeigt, daß die Rückstandskonzentrationen beim Isochlortetracyclin ( $\Sigma(\text{ICTC} + \text{e-ICTC})$ ) nach Medikationsende sehr rasch innerhalb von 48 Stunden, und damit rascher als bei den drei Tetracyclinen, abnimmt.

Der Tab. 44 sind auch die Epimerisierungsraten von TC, CTC und ICTC im Vollei zu entnehmen. Die N-Desmethylierungsrate wurden nicht ermittelt, da die Konzentrationen der N-Desmethyl-derivate im Vollei im Bereich zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen oder im Falle des N-DM-TC wegen der Coelution mit e-OTC nicht bestimmbar waren.

### 6.2.5 Tetracyclinrückstände in der Eischale

Die Eischalen der Eier, die während des Medikationszeitraumes gelegt wurden, zeigten nach Anregung mit langwelligem UV-Licht eine deutliche Fluoreszenz. Diese Fluoreszenzeigenschaft der Eischalen erlosch auch nicht längerer Lagerung der Eier oder nach dem Entleeren und Reinigen der Eier von anhaftendem Eiinhalt. Die Fluoreszenz der Eischale wurde bereits von Lindgren et al. [73] beschrieben worden. Im folgenden wird aufgezeigt, inwieweit die Fluoreszenz und die Tetracyclinkonzentration im Ei korrelieren. Da der EU-MRL-Wert für Vollei festgelegt ist, wurden die Eiinhalte homogenisiert und quantitativ bestimmt.

Die Eischalen aus einer 5-tägigen Medikationsstudie (Medikationsstudie 1), bei der Hennen für 5 Tage 1200 mg/kg CTC im Futter erhielten, wurden durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht auf Fluoreszenz geprüft. Während rückstandsfreie Kontrolleier das UV-Licht rotviolett reflektierten, zeigten die Schalen der Eier, die zwischen Medikationsbeginn und Medikationsende gelegt wurden, eine über diese Zeit von der Intensität her nicht zu unterscheidende, kräftige gelbe Fluoreszenz des Calcium-CTC-Komplexes (Abb. 44).

In Abb. 45 sind die Tage, an denen aufgrund der Medikation mit CTC Eier mit fluoreszierenden Eischalen gelegt wurden, mit einem Stern  gekennzeichnet. In der unteren Kurve sind die Rückstandsdaten für CTC, für das ein EU-MRL-Wert festgelegt ist, aufgetragen, in der oberen Kurve die Rückstandsdaten für die Summe aller Rückstände, die auf die Medikation mit CTC zurückzuführen sind und für die derzeit kein EU-MRL-Wert festgelegt ist.

Am 5. Tag liegt auch bei nicht-fluoreszierenden Eiern die Rückstandskonzentration noch oberhalb von 200 µg/kg. Die Eischalenfluoreszenz oder Nicht-Fluoreszenz (jeweils nach Anregung mit langwelligem UV-Licht) erlaubt keine direkten Rückschlüsse auf die Konzentrationen im Eiinhalt. Hingegen besagt das Auftreten einer fluoreszierenden Eischale eines Hühnereies, daß die Eier aus der Medikationsphase stammen und daß daher die gesetzlich vorgeschriebene Wartezeit nicht eingehalten wurde. Die Wartezeiten für Tetracycline nach oraler Gabe betragen in Deutschland 14 Tage [61].

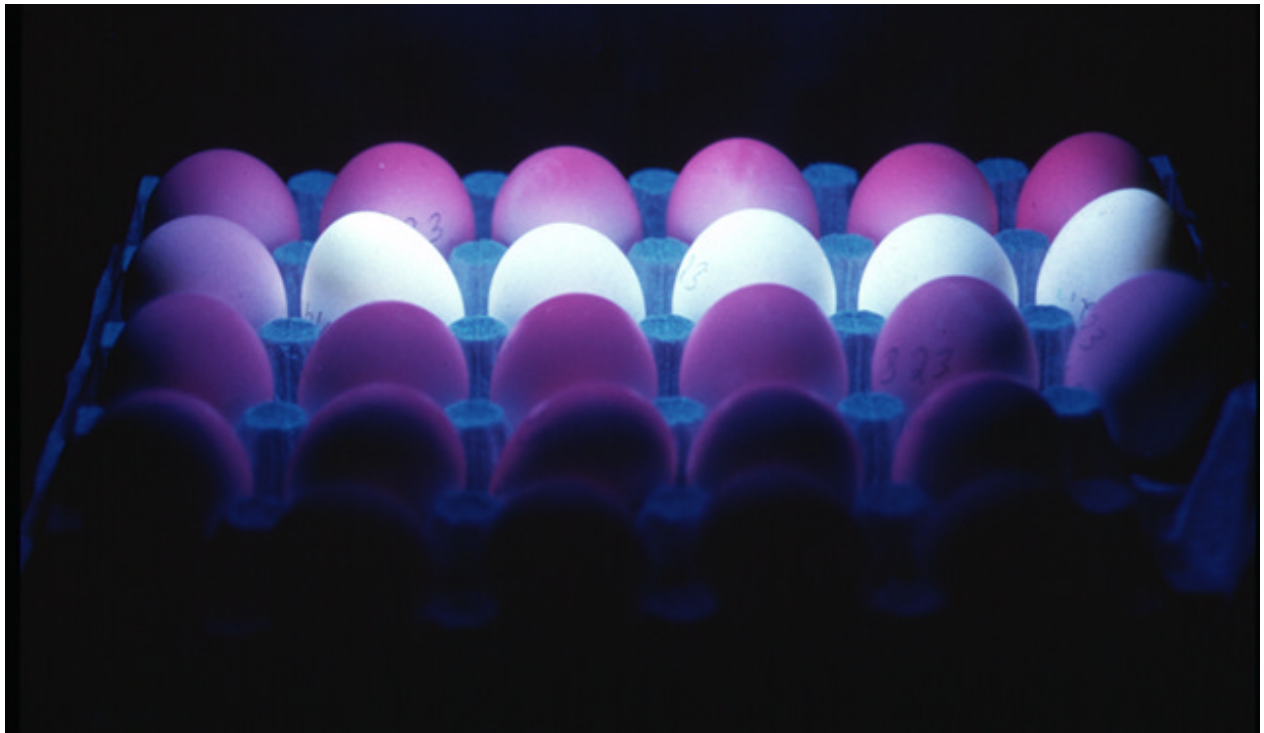


Abb. 44: Fluoreszenz der Eischalen der Medikationsstudie 2 mit 1200 mg/kg CTC

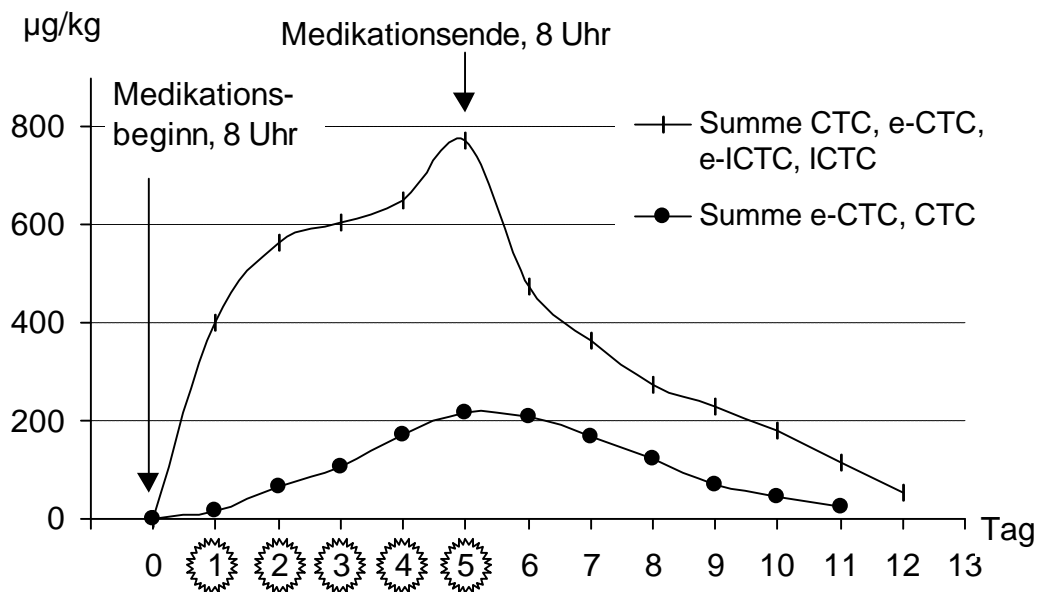



Abb. 45: Analyseergebnisse von Volleipproben nach Medikation mit 1200 mg/kg CTC für 5 Tage. (Mittelwert von 5 Legehennen). An den mit  gekennzeichneten Tagen zeigten die Eischalen nach Anregung mit langwelligem UV-Licht eine Fluoreszenz, siehe Abb. 44.

Mit einer batteriebetriebenen leistungsschwachen UV-Lampe kann man nach Medikationsende eine Eischalenfluoreszenz nicht mehr erkennen. Mit besonders leistungsstarken

UV-Lampen ließ sich noch bis zu 1-2 Tage nach dem Medikationsende eine schwache, von rückstandsfreien Eischalen unterscheidbare, Fluoreszenz erkennen.

Auch die Eischalen, die aus Medikationsstudien mit TC stammten, zeigten nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht eine Fluoreszenz, die allerdings eine geringere Fluoreszenz-Intensität aufwies als nach Medikation mit CTC.

Nach Medikation mit OTC-haltigem Medizinalfutter in den Konzentrationen von 750 mg/kg und 3000 mg/kg wurden Eier erhalten, deren Eischalen nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht eine deutliche Fluoreszenz aufwies. Die Fluoreszenz war etwas schwächer als die Fluoreszenz der Eier von Hühnern, die mit einem CTC- oder TC-haltigem Medizinalfutter gefüttert worden waren.

Mit einer leistungsstarken UV-Lampe kann auch bei braunschaligen Eiern nach Medikation mit jeweils nur einem Tetracyclin (OTC, TC oder CTC) visuell eine Fluoreszenz beobachtet werden. Bei Gebrauch einer leistungsschwachen Handlampe empfiehlt es sich zusätzlich, das Ei aufzuschlagen und nach Entfernung der Eischalenhaut die bei Tageslicht weiße Schaleninnenseite unter einer UV-Lampe auf Fluoreszenz zu prüfen. Mit dieser Vorgehensweise können CTC-, TC- und OTC-Rückstände im Vergleich mit rückstandsfreien Eischalen erkannt werden.

Bei Tageslicht wurde eine veränderte Färbung der Eischalen nur bei Eiern von Legehennen beobachtet, die weiße Eier legten und die aus Medikationsstudien mit CTC stammten. Die Eischalen waren hell-beige. Je höher die CTC-Konzentration im Futter war, desto deutlicher war die Farbänderung auch schon bei Tageslicht zu erkennen.

Bei braunfarbenen Eischalen, die aus einem Medikationszeitraum stammten, war aufgrund der natürlichen braunen Eigenfärbung der Eischalen bei Tageslicht keine Farbveränderung zu erkennen, die auf eine Medikation der Legehennen mit einem der drei Tetracycline hindeutete.

## 6.3 Rückstandsdaten in Plasmaproben und in Eidotterproben des Eierstocks nach Medikation mit CTC, TC und OTC

### 6.3.1 Rückstandsdaten in Plasmaproben

Ziel dieser Untersuchungen war es, weitere Hinweise für eine *in vivo* Epimerisierung der drei Tetracycline im Organismus der Henne zu erhalten.

Dazu wurde den Tieren während der Medikationsstudien bzw. bei ihrer Schlachtung Blut entnommen. Aus dem Blut der Hennen wurde Plasma gewonnen (siehe Kap. 10.8) und bei minus 80°C eingefroren.

Die individuellen Schwankungen der Rückstandsgehalte in den Plasmaproben von Henne zu Henne sind sehr groß (Tab. 45 bis 49). Daher liegt der Schwerpunkt dieses Abschnittes des Kapitels 6 nicht auf den absoluten Analyseergebnissen, sondern auf die Berechnung der abgeleiteten berechneten Größen wie Epimerisierungsrate, N-Desmethylierungsrate und Isomerisierungsrate.

Ein Vergleich der Rückstandskonzentrationen in Plasmaproben von Henne zu Henne oder eine Korrelation der Rückstände zu den Rückständen in Eigelbproben ist aufgrund der Versuchsdurchführung nicht möglich. Auch eine Aussage über die Resorptionsraten der einzelnen Tetracycline (OTC, TC, CTC) ist nicht möglich, da vor allem unklar ist, wann und in welcher Menge die Henne zuletzt das Medizinalfutter gefressen hat. Zu beachten ist außerdem, daß die verschiedenen Tetracycline unterschiedliche Halbwertszeiten haben [44].

In Plasmaproben wurden auch N-Desmethyl-Derivate ermittelt. Die Rückstandsprofile in Plasmaproben zeigten eine größere Ähnlichkeit mit den Rückstandsprofil in Eigelbproben als mit dem in Eiklarproben.

Die Rückstandskonzentrationen an N-Desmethyl-Derivaten waren in Plasmaproben zwar fast immer oberhalb der Nachweisgrenze, allerdings selten oberhalb der Bestimmungsgrenze. Die Identifizierung der N-Desmethyl-derivate in Plasmaproben erfolgte daher nur über die Retentionszeiten der N-Desmethyl-Derivate aus Eigelbproben, da die geringen Rückstandsgehalte in Plasmaproben keine weiteren Untersuchungen ermöglichten wie z.B. Aufnahme von UV-Spektren. Mittels verbesserter Analytik (niedriger Bestimmungsgrenze) wird sicherlich in Zukunft die Existenz der postulierten N-Desmethyl-Tetracycline auch in Plasmaproben bestätigt werden können.

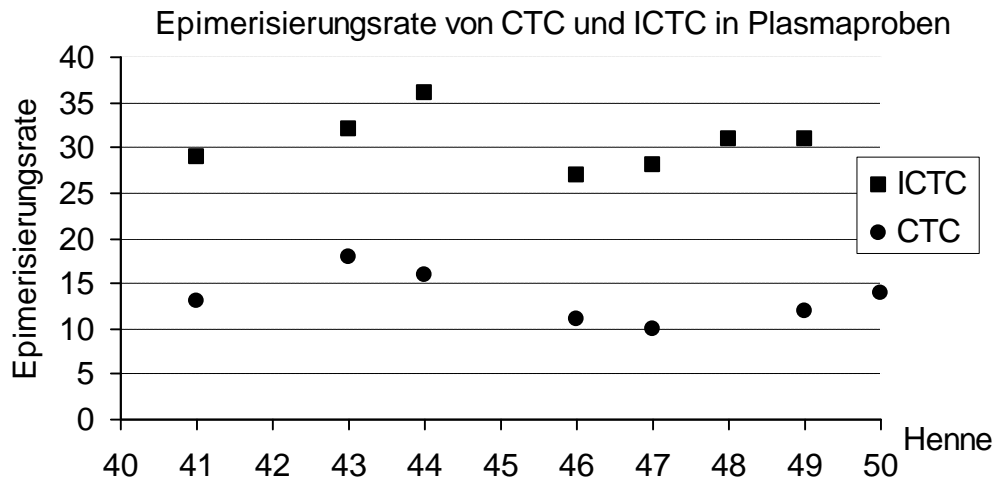


### 6.3.1.1 Chlortetracyclin

Im Plasmaproben wurden nach Medikation mit CTC Rückstände von CTC, e-CTC, e-ICTC, ICTC und N-DM-ICTC nachgewiesen (Tab. 45 und 46).

Nach Medikation von CTC liegen im Plasma der Henne im Mittel ca. 30-40 % als ICTC und seinem Epimer und 60-70 % als CTC und seinem Epimer vor (Tab. 45, 46). Die Isomerisierungsrate d.h. der Anteil an ICTC und e-ICTC an der Summe aus CTC-, e-CTC-, ICTC- und e-ICTC-Rückständen ist damit geringer als beim Eigelb.

Bei pharmakokinetischen Untersuchungen von Plasmaproben sollte aufgrund dieser Ergebnisse daher auch auf die Anwesenheit von ICTC geprüft werden.



**Abb. 46:** Epimerisierungsrate für CTC bei den Hennen C 41 bis C50, nach 14 tätiger Medikation mit 800 mg/kg OTC, 750 mg/kg TC und 1300 mg/kg CTC.

Auffällige Ergebnisse stellten sich heraus, als die Plasmaproben mit Eiklarproben qualitativ verglichen wurden. In Plasmaproben ist mit 9 bis 14 % e-CTC quantitativ bestimmbar, die Epimerisierungsrate von ICTC im Plasma lag mit durchschnittlich 30 % oberhalb der Epimerisierungsrate im Eiklar, siehe Abb. 46. Andererseits lagen die Epimerisierungsraten in Plasmaproben noch unterhalb der Werte für Eigelbproben.

Die Rückstandskonzentration des N-DM-ICTC in Plasmaproben lag zwischen der Bestimmungs- und Nachweisgrenze.

Henne Plas- ma	<b>S</b> (CTC + e-CTC + ICTC + e-ICTC)	CTC µg/kg	e-CTC µg/kg	%-e-CTC an <b>S</b> (e-CTC + CTC)	ICTC µg/kg	e-ICTC µg/kg	N-DM- ICTC µg/kg	%-e-ICTC an <b>S</b> (ICTC + e-ICTC)	%- <b>S</b> (ICTC + e-ICTC) an <b>S</b> (e-CTC + CTC + e-ICTC + ICTC)	%-N-DM-ICTC an <b>S</b> (CTC + e-CTC + ICTC + e-ICTC)
C41	624	349	54	13	157	64	< BG	29	35	-
C43	606	236	52	18	215	103	< BG	32	53	-
C44	1391	722	141	16	372	156	< BG	36	33	-
C45	> 130	78	< BG	-	52	< BG	< NG	-	-	-
C46	1137	600	77	11	338	122	< BG	27	40	-
C47	> 514	379	< BG	-	97	38	< NG	28	-	-
C48	> 381	146	< BG	-	163	72	< BG	31	-	-
C49	> 513	317	44	-	134	62	< NG	31	-	-
C50	> 378	266	38	14	74	< BG	< NG	-	-	-

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze

**Tab. 45: Hennen C41 bis C50 : Medikationsstudie 4 mit 1300 mg/kg an CTC, (neben anderen Tetracyclinen, Tab. 22) die Plasmaproben stammten alle vom 15.4.98. (19. Medikationstag)**

Henne Plas- ma	<b>S</b> (CTC+ CTC + ICTC + e-ICTC) µg/kg	CTC µg/kg	e-CTC µg/kg	%-e-CTC an <b>S</b> (e-CTC + CTC)	ICTC µg/kg	e-ICTC µg/kg	N-DM- ICTC µg/kg	%-e-ICTC an <b>S</b> (ICTC + e-ICTC)	%- <b>S</b> (ICTC + e-ICTC) an <b>S</b> (e-CTC + CTC + e-ICTC + ICTC)	%-N-DM-ICTC an <b>S</b> (CTC + e-CTC + ICTC + e-ICTC)
B 30	1008	716	57	7	170	65	< BG	28	23	-
B 31	1010	633	63	9	226	88	< NG	28	31	-
B 32	> 532	362	< BG	-	117	53	< BG	31	-	-
B 33	747	482	51	10	147	67	< BG	31	29	-
B 34	186	126	< NG	-	40	20	< NG	33	-	-
E 35	184	< NG	< NG	-	131	53	< BG	29	-	-
E 36	> 558	348	< BG	-	137	73	< BG	35	-	-
E 112	> 85	< NG	< NG	-	85	< BG	-	-	-	-
E 111	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.	-	-	-
E 113	< NG	< NG	< NG	-	< NG	< NG	-	-	-	-

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze, n.b. = nicht bestimmt

**Tab. 46: Henne B30 bis B36 : Medikationsstudie 6 mit 750 mg/kg an CTC;  
Henne E 112 und E113 : Medikationsstudie 9 mit 3000 mg/kg,  
die Plasmaproben stammten alle vom 15.8.98.**

## 6.3.1.2 Tetracyclin

In Plasmaproben wurden Rückstände von Tetracyclin, seinem Epimer (Abb. 47) und N-Desmethyltetracyclin bestimmt.

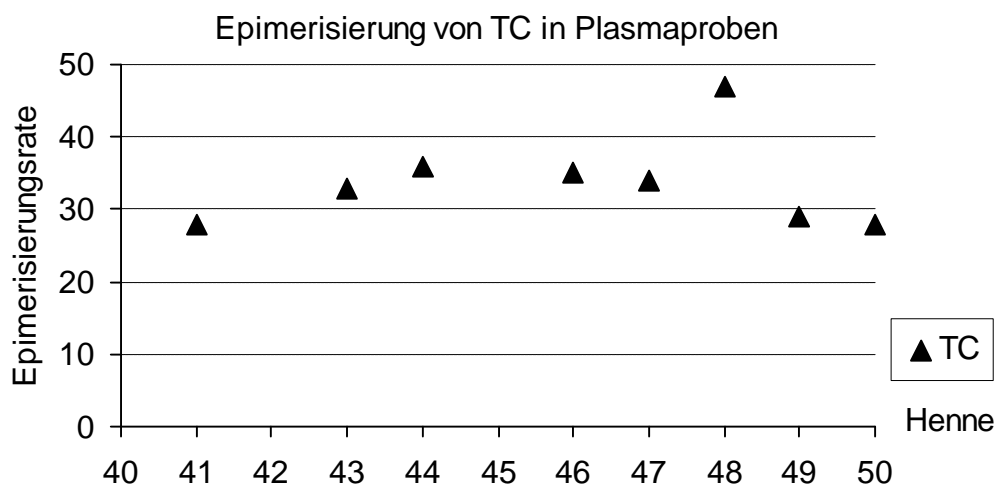


Abb. 47: Epimerisierungsrate für TC bei den Hennen C 41 bis C 50, (siehe Tab. 47)

Die Epimerisierungsrate von Tetracyclin im Plasma lag mit 28 bis 47 % oberhalb der Epimerisierungsrate in Eiklarproben und unterhalb der Werte für Eigelbproben.

Die ermittelten N-Desmethylierungsraten lagen zwischen 13 und 22 %, siehe Tab. 47 und 48 .

Henne Plasma	Gesamt- TC und N-DM- TC µg/kg	TC µg/kg	e-TC µg/kg	N-DM-TC µg/kg	%-e-TC an S(e-TC + TC)	%-N-DM-TC an S(e-TC + TC + N-DM-TC)
C41	279	165	66	48	28	17
C43	> 125	84	41	< BG	33	-
C44	624	346	200	78	36	22
C45	> 47	47	< BG	< NG	-	-
C46	401	258	93	50	35	12
C47	> 214	141	73	< BG	34	-
C48	139	73	66	< BG	47	-
C49	192	135	57	< BG	29	-
C50	> 229	166	63	< BG	28	-

n.b. = nicht bestimmt, NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze

Tab. 47: Henne C41 bis C50 der Medikationsstudie 4 mit 750 mg/kg an TC  
Die Plasmaproben wurden am 15.4.98 (19. Medikationstag) gewonnen.

Henne Plasma	<b>S</b> (e-TC + TC + N-DM-TC) $\mu\text{g}/\text{kg}$	TC $\mu\text{g}/\text{kg}$	e-TC $\mu\text{g}/\text{kg}$	N-DM-TC $\mu\text{g}/\text{kg}$	% e-TC an <b>S</b> (e-TC + TC)	%-N-DM-TC an <b>S</b> (TC + e-TC + N-DM-TC)
B21	224	133	91	< BG	41	-
B22	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.		n.b.
B23	470	265	158	47	37	10
B24	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.
B25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.
B26	447	275	120	52	30	12
B27	259	214	45	< BG	17	-
B28	359	252	107	< BG	30	-
B29	203	112	48	43	30	21
B30	636	438	142	56	25	9

n.b. = nicht bestimmt, NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze

**Tab. 48: Hennen B21 bis 30 : Medikationsstudie 3 mit 750 mg/kg an TC.**  
*Die Plasmaproben wurden am 15.4.98 (19. Medikationstag) gewonnen.*

Henne Plasma	<b>S</b> (e-TC + TC + N-DM-TC) $\mu\text{g}/\text{kg}$	TC $\mu\text{g}/\text{kg}$	e-TC $\mu\text{g}/\text{kg}$	N-DM-TC $\mu\text{g}/\text{kg}$	% e-TC an <b>S</b> (e-TC + TC)	%-N-DM-TC an <b>S</b> (TC + e-TC + N-DM-TC)
F 101	258	105	153	< BG	59	-
F 102	279	147	132	< BG	47	-
F 103	129	66	63	< NG	49	-
C59	192	133	59	< BG	31	-
C60	< BG	< BG	< BG	< NG	-	-

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze

**Tab. 49: Henne F101 bis F103 : Medikationsstudie 10 mit 3000 mg/kg TC. Henne C59 bis C60 : Medikationsstudie 7 : 750 mg/kg an TC.**  
*Die Plasmaproben stammten vom 15.8.98 (17. Medikationstag).*

## 6.3.1.3 Oxytetracyclin

In Plasmaproben wurden nach Medikation mit Oxytetracyclin Rückstände an OTC, e-OTC und N-DM-OTC (Tab. 50, 51) bestimmt. Viele Rückstandsdaten des OTC liegen zwischen der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze.

Henne Plasma	OTC $\mu\text{g}/\text{kg}$	e-OTC $\mu\text{g}/\text{kg}$	N-DM-OTC $\mu\text{g}/\text{kg}$	%-e-OTC an <b>S</b> (OTC + e-OTC)
C41	452	< BG	< NG	-
C43	338	< BG	< BG	-
C44	931	49	< BG	5
C45	152	< NG	< NG	-
C46	554	< BG	< BG	-
C47	281	< BG	< NG	-
C48	143	< NG	< BG	-
C49	303	< BG	< BG	-
C50	334	< BG	< BG	-

n.b. = nicht bestimmt, NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze

**Tab. 50: Henne C41 bis C50 : Medikationsstudie 4 mit 800 mg/kg OTC.**

*Die Plasmaproben wurden am 15.4.98 (19. Medikationstag) gewonnen.*

Henne Plasma	<b>S</b> (OTC + e-OTC) $\mu\text{g}/\text{kg}$	OTC $\mu\text{g}/\text{kg}$	e-OTC $\mu\text{g}/\text{kg}$	N-DM-OTC $\mu\text{g}/\text{kg}$	%-e-OTC an <b>S</b> (e-OTC + OTC)	%-N-DM-OTC an <b>S</b> (OTC + e-OTC + N-DM-OTC)
A1	659	617	42	< BG	6	-
A2	690	650	40	38	6	5
A3	764	721	43	< BG	6	-
A4	570	570	< BG	< BG	-	-
A5	1075	1026	49	37	4	3
A6	909	859	50	36	5	4
D86	334	298	36	< NG	11	-
D87	324	253	71	< NG	22	-
D88	< BG	< BG	< NG	< NG	-	-

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze

**Tab. 51: Henne A1 bis A6 : Medikationsstudie 5 mit 750 mg/kg an OTC.**

*Henne D86 bis D88 : Medikationsstudie 8 mit 3000 mg/kg OTC.*

*Die Plasmaproben stammen vom 15.8.98 (17. Medikationstag)*

Im Gegensatz zum Eiklar ist e-OTC in Plasmaproben nachweisbar. Die Epimerisierungsrate liegt mit 4 % bis 22 % aber deutlich unter der Epimerisierungsrate in Eigelbproben. Die ermittelte N-Desmethylierungsrate liegt bei 3 % bis 5 %.

### 6.3.2 Untersuchungen der Eidotter im Eierstock

Bei einer Schlachtung am 15.04.98 wurden aus den Eierstöcken dreier Hennen mit der Bezeichnung C49, C45 und C47 (Medikationsstudie 4) Eidotter entnommen. Die Eidotter wurden auf die Anwesenheit von Tetracyclinrückständen analysiert, da die Hennen bis zum Schlachttermin Medizinalfutter erhalten hatten. Die Rückstandsdaten sollten einen Hinweis darüber geben, ob die Metaboliten erst im Ei oder bereits vorher z.B. im Organismus (z.B. Leber) der Henne gebildet worden sind. Bei einem geringeren Anteil an Epimere im Eidotter des Eierstocks als in fertigen Eidottern von gelegten Eiern der gleichen Hennen könnte man davon ausgehen, daß die Epimerenbildung erst im Ei selber stattfindet.

Die Hennen der Medikationsstudie 4 wurden bis zu ihrem Schlacht-Termin mit einem Medizinalfutter gefüttert, welches 800 mg/kg OTC, 750 mg/kg TC und 1300 mg/kg CTC enthielt.

Die Tab. 52 enthält die Analysendaten. Je größer das Dottergewicht ist, desto ähnlicher könnte die berechneten Größen Epimerisierungsrate und Isomerisierungsrate im Vergleich zu den Raten im gelegten Ei sein. Ein fertig ausgebildetes Eidotter eines Eies hat ein Gewicht von 17,5 g.

Henne	Dottergewicht [g]	TC	e-TC	CTC	e-CTC	ICTC	e-ICTC
C49	2,2	421	411	363	289	176	224
C49	8,3	380	373	269	205	196	241
C49	15	324	334	167	136	188	154
C45	13,3	313	309	179	151	166	221
C45	15	257	272	113	93	125	160
C47	6,7	310	293	258	167	183	138
C47	9,8	416	392	283	198	275	337
C47	12,7	388	375	218	167	276	352

Die N-Desmethylderivate von TC und ICTC sind nicht aufgeführt.

**Tab. 52: Rückstandskonzentrationen der Eierstock-Dotter-Untersuchungen in µg/kg.**

Tab. 52 gibt die Rückstandskonzentrationen und Tab. 53 die Epimerisierungsarten für jeweils drei Eierstockdotter der Hennen C49, C45 und C47 wieder. Aufgrund der Coelution des N-DM-TC mit e-OTC und OTC wurde auf die Auswertung von OTC verzichtet. Die N-Desmethyl-Derivate von OTC, TC und ICTC waren nachweisbar.

Henne	Dottergewicht g	% Anteil e-TC an S(e-TC + TC)	% Anteil e-CTC an S(e-CTC + CTC)	% Anteil e-ICTC an S(e-ICTC + ICTC)	% Anteil der S(ICTC + e-ICTC) an S(e-ICTC + ICTC + e-CTC + CTC)
C49	2,2	49	43	55	38
C49	8,3	49	44	56	48
C49	15	51	45	55	53
C49	Eigelb*	50	45	55	57
C45	13,3	49	46	57	54
C45	15	51	45	56	58
C45	Eigelb*	46	45	56	66
C47	6,7	49	39	54	43
C47	9,8	48	41	55	56
C47	12,7	48	43	56	62
C47	Eigelb*	48	41	55	64

\* Rückstandsdaten eines gelegten Eies der gleichen Henne

**Tab. 53: Epimerisierungsraten in Eierstock-Dottern der drei Hennen C49, C45 und C47 im Vergleich mit Eigelbproben von gelegten Eiern der gleichen Henne.**

Die Auswertung und der Vergleich der Rückstandsdaten in Eidotterproben des Eierstocks mit den Rückstandsdaten in Eigelbproben ergaben nahezu identische Epimerisierungsraten. Der Bildungsort der Epimeren ist nicht erkennbar.

Bei allen 3 Hennen nimmt der Isomerisierungsrate mit dem Alter der Eierstock-Dotter (zunehmendes Dottergewicht) zu. Die Isomerisierungsrate, d.h. der prozentuale Anteil des ICTC und seines 4-Epimers an der Summe von CTC, e-CTC, e-ICTC und ICTC nähert sich dem Anteil bei gelegten Eiern an. Die Isomerisierungsrate des CTC scheint daher mit dem Alter des Dotters zu zunehmen.



## 6.4 Untersuchungen zur spektroskopischen Absicherung

Die Untersuchungen zur spektroskopischen Absicherung wurden mit den Detektionsarten 310 nm UV pH 2,2; 360 nm UV pH 2,2; Fluoreszenzdetektion bei 350/420 nm pH 12,0; und LC-MS-MS durchgeführt. In Proben mit gewachsenen Rückständen wurden neben den drei Muttersubstanzen CTC, TC und OTC weitere zum Teil bislang unbekannte Substanzen ermittelt. Diese Substanzen zeigten sich in den Chromatogrammen als zusätzliche Peaks neben den Peaks für die drei Tetracycline (CTC, TC und OTC). In den Chromatogrammen von Futterproben, Blankeiproben oder in dotierten Proben waren dagegen die zusätzlichen Peaks nicht beobachtet worden.

Aufgrund dieser Hinweise kann ein Metabolismus der drei Tetracycline im Organismus der Henne postuliert werden.

### 6.4.1. Chlortetracyclin

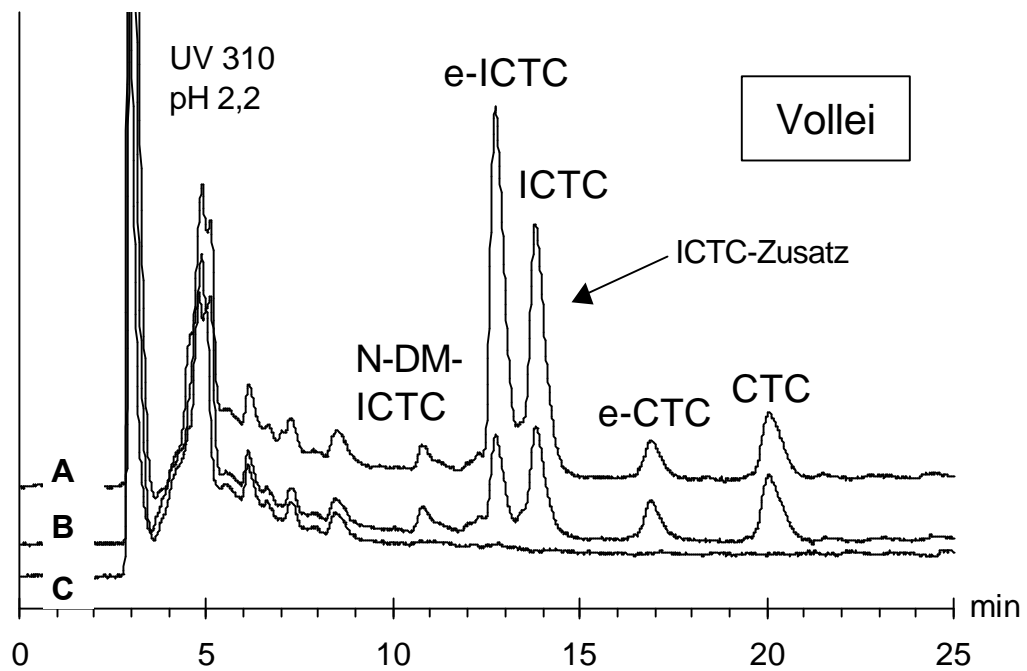
Im folgenden werden die unterschiedlichen Versuche erläutert, die Hinweise auf die Existenz und Identität der Metaboliten des CTC geben. Bei diesen Untersuchungen wurde ein weiterer bislang unbekannter Metabolit des CTC über die massenspektrometrischen Daten als N-Desmethyl-Isochlortetracyclin interpretiert. N-Desmethyl-Chlortetracyclin wurde dagegen nicht nachgewiesen.

- **Co-Chromatogramm mit ICTC und e-ICTC**

Einer Volleiprobe mit gewachsenen Rückständen (der Medikationsstudie 1) wurde ein Gemisch aus ICTC und e-ICTC, im Verhältnis von 40 zu 60, zugesetzt.

Abb. 48 zeigt das Chromatogramm B (mittleres Chromatogramm) einer Volleiprobe mit gewachsenen Rückständen an CTC, sowie eines Co-Chromatogramms A (oberes Chromatogramm) der gleichen Volleiprobe, der eine Lösung mit e-ICTC und ICTC zugesetzt wurde. Die Volleiprobe stammte vom 4. Tag eines Medikationsversuches, bei dem ein Futter mit einem Gehalt von 1200 mg/kg CTC ad libitum verfüttert wurde. Die Rückstandsgehalte im Ei sind im Kap. 4.7 (Vergleich UV- und Fluoreszenz-Detektion) aufgelistet.

Die erkennbaren identischen Retentionszeiten, Abb. 48, sind als erster Hinweis zu betrachten, daß es bei der unbekannt Substanz um ICTC und e-ICTC handeln könnte.

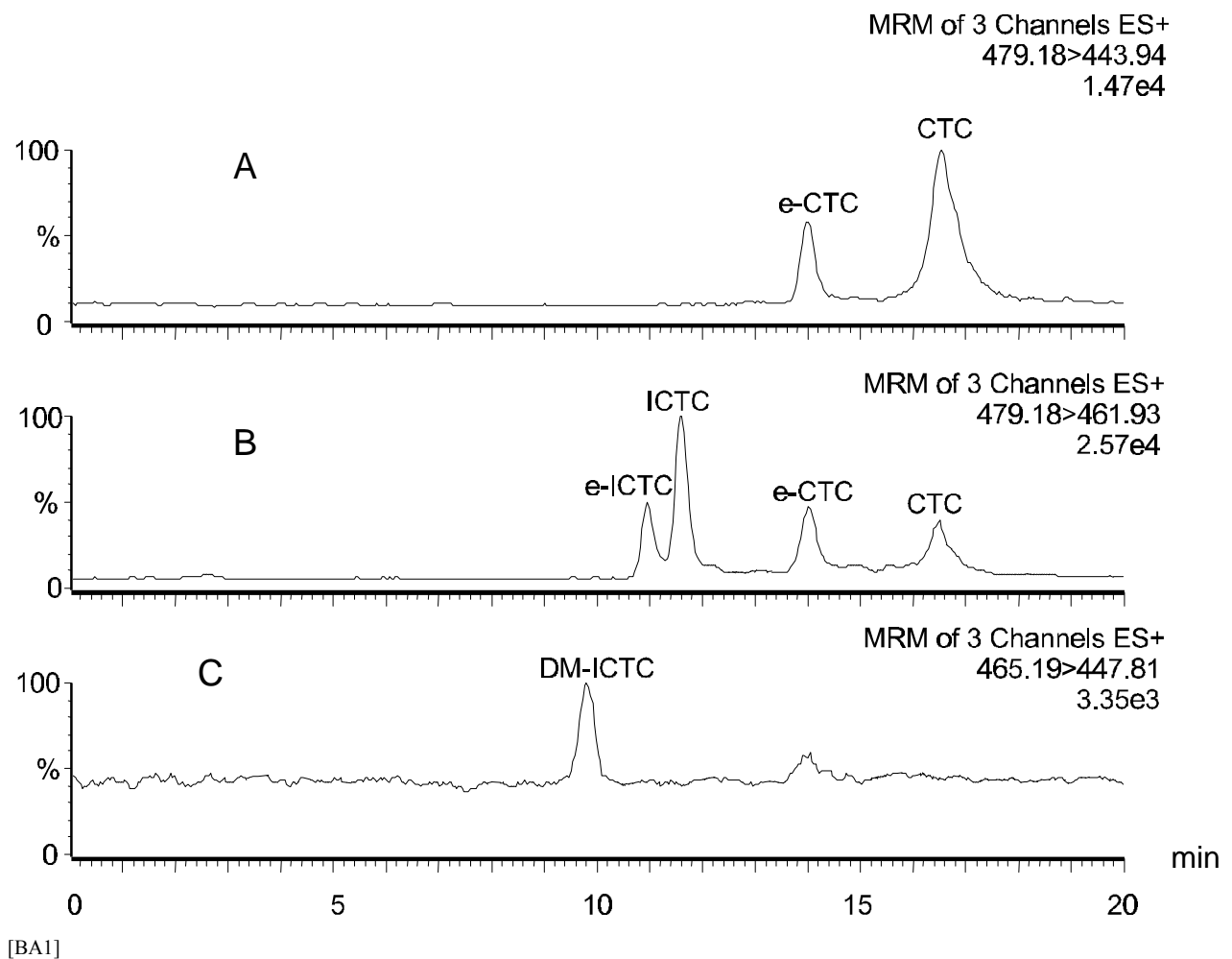


**Abb. 48:** *Chromatogramm A: Zusatz eines Standards mit e-ICTC und ICTC zu einer Volleiprobe der Medikationsstudie 1, Chromatogramm B: Volleiprobe der Medikationsstudie 1, Chromatogramm C: Vollei-Blank*

- **CTC-, e-CTC-, ICTC-, e-ICTC- und N-DM-ICTC-Rückstände in Plasma-, Vollei- und Eigelbproben**

Die in Kap. 4.7 beschriebene modifizierte Fluoreszenz-Methode nach Bryan et al. [20] erlaubt die selektive Bestimmung von ICTC und e-ICTC neben den drei Tetracyclinen CTC, TC und OTC. Mit Hilfe des kommerziell erhältlichen ICTC-Standards wurden in Eiprobe von Hennen, die aus Medikationsstudien mit CTC stammten, das *in vivo* gebildete ICTC und e-ICTC bestimmt. In den Chromatogrammen mit Fluoreszenz-Detektion wurde ein weiterer fluoreszierender Peak beobachtet, der vor dem e-ICTC eluierte. Dieser Peak tritt in den Chromatogrammen von Plasma- (Abb. 50) und Volleiprobe (Abb. 49) und Eigelbproben mit gewachsenen Rückständen an CTC auf. Auch bei 310 nm und 360 nm UV zeigt die unbekannte Substanz das gleiche Absorptions-Verhalten wie das ICTC. Da diese Substanz in Proben zu finden war, die aus Medikationsstudien mit CTC stammten, sollte überprüft werden, ob es neben CTC, e-CTC, e-ICTC und ICTC in Eigelbproben noch eine weitere Substanz gibt, die aufgrund des gleichen Fluoreszenz-Verhaltens bei 350/420 nm und pH 12,0 und gleicher UV-Eigenschaften bei 310 und 360 nm pH 2,2 mit dem ICTC strukturell verwandt sein sollte.

Der neue Metabolit des CTC sollte polarer sein, da er vor dem bekannten Metaboliten e-ICTC und ICTC eluierte. Dies könnte durch die Einführung einer Hydroxygruppe oder durch eine N-Desmethylierung an der Dimethylaminogruppe möglich werden, wie es bereits von Nelis und De Leenheer [45], sowie von Böcker et al. [46], für das Minocyclin und von Böcker [39-40], sowie von Böcker und Estler [41], für das Doxycyclin beschrieben wurde. Durch diese strukturellen Änderungen würde sich nur die Masse und durch die modifizierte Struktur die Retentionszeit, aber kaum die Fluoreszenz- und die UV-Eigenschaften gegenüber dem ICTC ändern.



**Abb. 49: Spur A : Massenverlust 35 bei CTC und e-CTC**

**Spur B : Massenverlust 17 bei ICTC, e-ICTC, CTC und e-CTC**

**Spur C : Massenverlust 17 bei N-DM-ICTC**

**Das Chromatogramm einer Blank-Volleprobe zeigte bei den Folgeionen  $m/z$  444,  $m/z$  462 und  $m/z$  448 keine Signale.**

Abb. 49 zeigt die Massenspur C mit einem Peak für das N-DM-ICTC. Im Vergleich zum ICTC bildet die neue Substanz ein um 14 Masseneinheiten verringertes

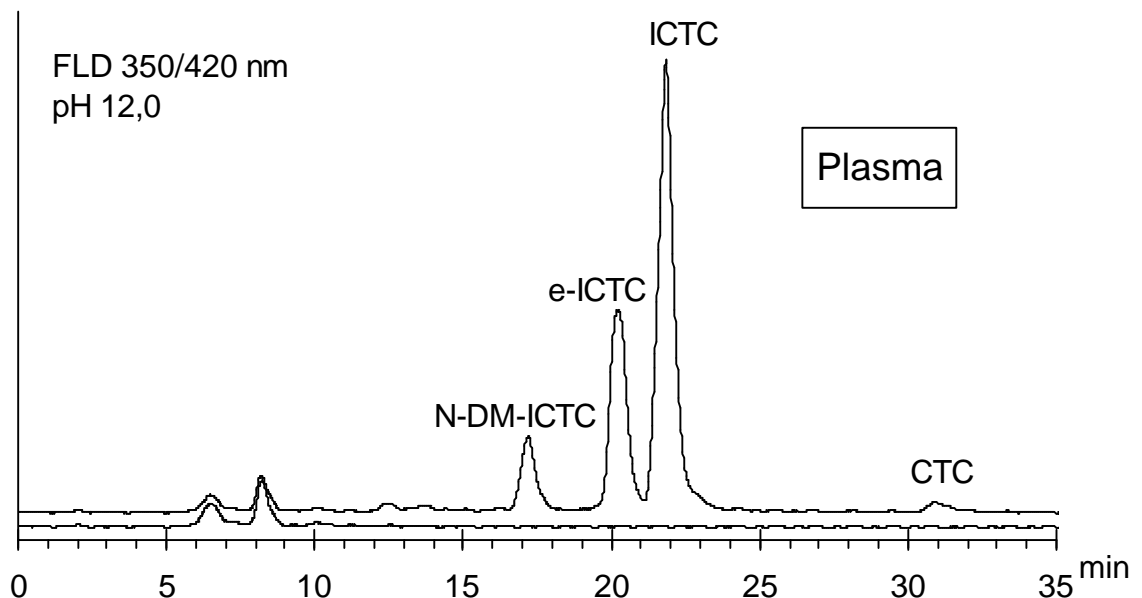
Vorläuferion, das analog zum ICTC ein um 17 Masseneinheiten kleineres Folgeion gebildet hat.

Der im Vergleich mit dem ICTC analoge Massenübergang deutet auf eine Struktur analogie (Iso-Form) der neuen Substanz hin. Aufgrund des zum ICTC analogen Verhaltens bei der Fluoreszenz- und MS-Detektion kann daher postuliert werden, daß die Ringstruktur dieses CTC-Metaboliten der Ringstruktur des ICTC gleicht und eine Lactonstruktur besitzt. Die LC-MS-MS-Methode zur Durchführung dieser Untersuchungen wird Kap. 10.3 beschrieben.

Das CTC wird metabolisiert, wobei die Bildung von e-CTC, ICTC, e-ICTC, sowie von N-DM-ICTC beobachtet wurde.

- **Plasmaproben**

Plasmaproben von Hennen, die vorher 14 Tage lang mit einem Medizinalfutter mit der Konzentration 800 mg/kg OTC, 750 mg/kg TC und 1200 mg/kg CTC gefüttert worden waren, wurden gemäß der Standardarbeitsanweisung (Kap. 10.2) mittels UV bei 360 nm und Fluoreszenz-Detektion untersucht. Unter Fluoreszenz-Bedingungen erhält man ein den Eigelbproben analoges chromatographisches Bild (Abb. 50), nur die Epimerisierung des ICTC war bei Plasmaproben geringer als in Eigelbproben.



**Abb. 50:** *Chromatogramm einer Plasmaprobe der Henne C41 vom 15.4.98 mit gewachsenen Rückständen an ICTC, e-ICTC und N-DM-ICTC. Das untere Chromatogramm zeigt ein Plasma-Blank.*

- **Eiklarproben**  
Eiklarproben, die aus Medikationsstudien mit CTC stammten, enthielten nur e-ICTC und ICTC und oft nur Spuren an CTC.
- **Untersuchung auf N-DM-CTC**  
Mit den Detektionsverfahren (UV 360 nm und LC-MS-MS: Massenübergang 465 zu 430) wurden bei allen Matrices keine Hinweise für die Existenz von N-DM-CTC erhalten.

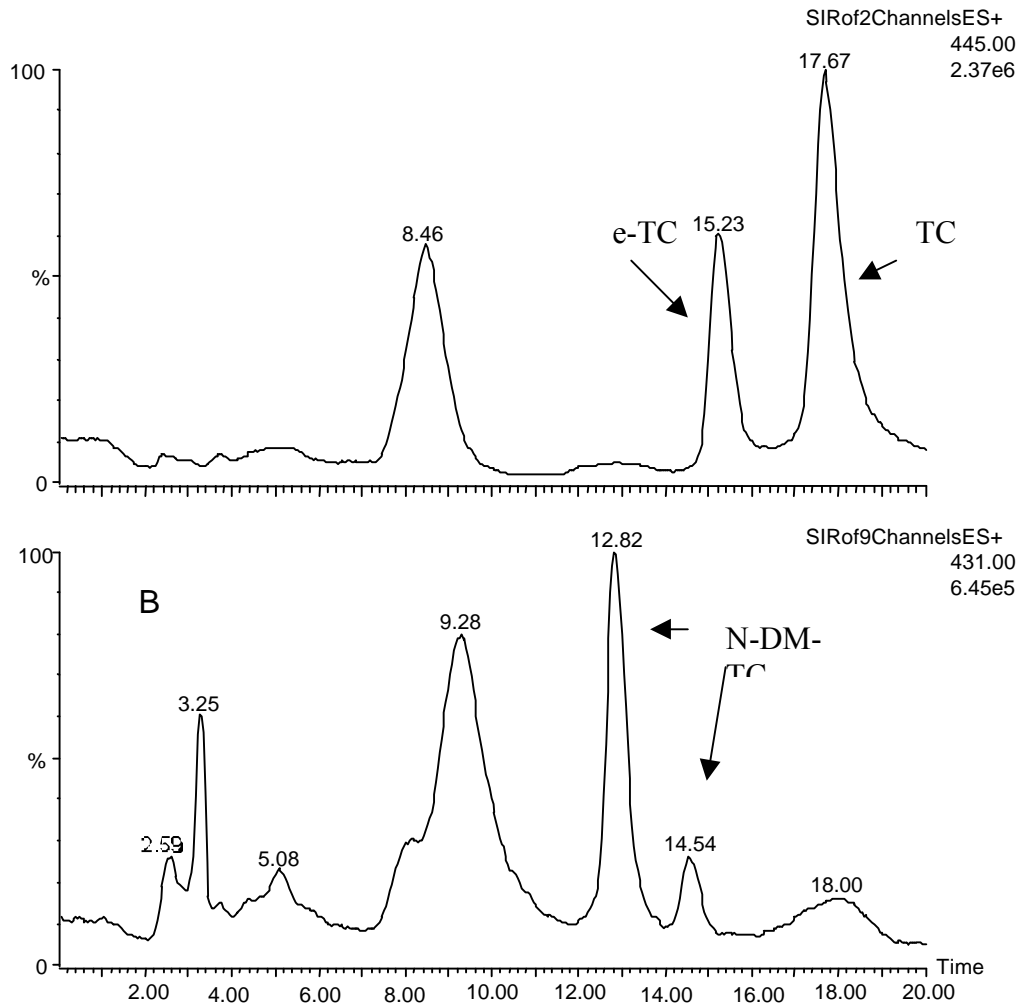
### 6.4.2 Tetracyclin

Zur spektroskopischen Absicherung von TC, e-TC und den postulierten N-Desmethylderivaten (N-DM-TC und e-N-DM-TC) wurden UV-spektroskopische und massenspektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Im Full-Scan-Mode des MS wurden keine auswertbaren Massenspektren erhalten, da die Eigelb-Matrix hier die unbekannt Substanzen überlagerte. Beim Single Ion Recording (SIR) kann gegenüber dem Full Scan eine erhöhte Nachweisstärke genutzt werden, da die Dwelltime (Dauer bei der eine bestimmte Masse vom Quadropul durchgelassen wird) größer ist als im Scan-Modus über mehrere Massen. Das MS detektiert nun nur Substanzen mit einer bestimmten Masse m/z. Das MS1 und das MS2 lassen im SIR-Modus die gleichen Massen durch. Bei dieser Vorgehensweise muß die Masse der unbekannt Substanz vorher bekannt sein. Im Ergebnis kann so nur eine postulierte Masse bestätigt werden.

Die Abb. 51 zeigt ein SIR-Chromatogramm einer Eigelbprobe mit Rückständen an e-TC, TC und N-DM-TC aus einer Medikationsstudie bei den Hennen mit einem Futter gefüttert wurden, welches 3000 mg/kg TC enthielt.

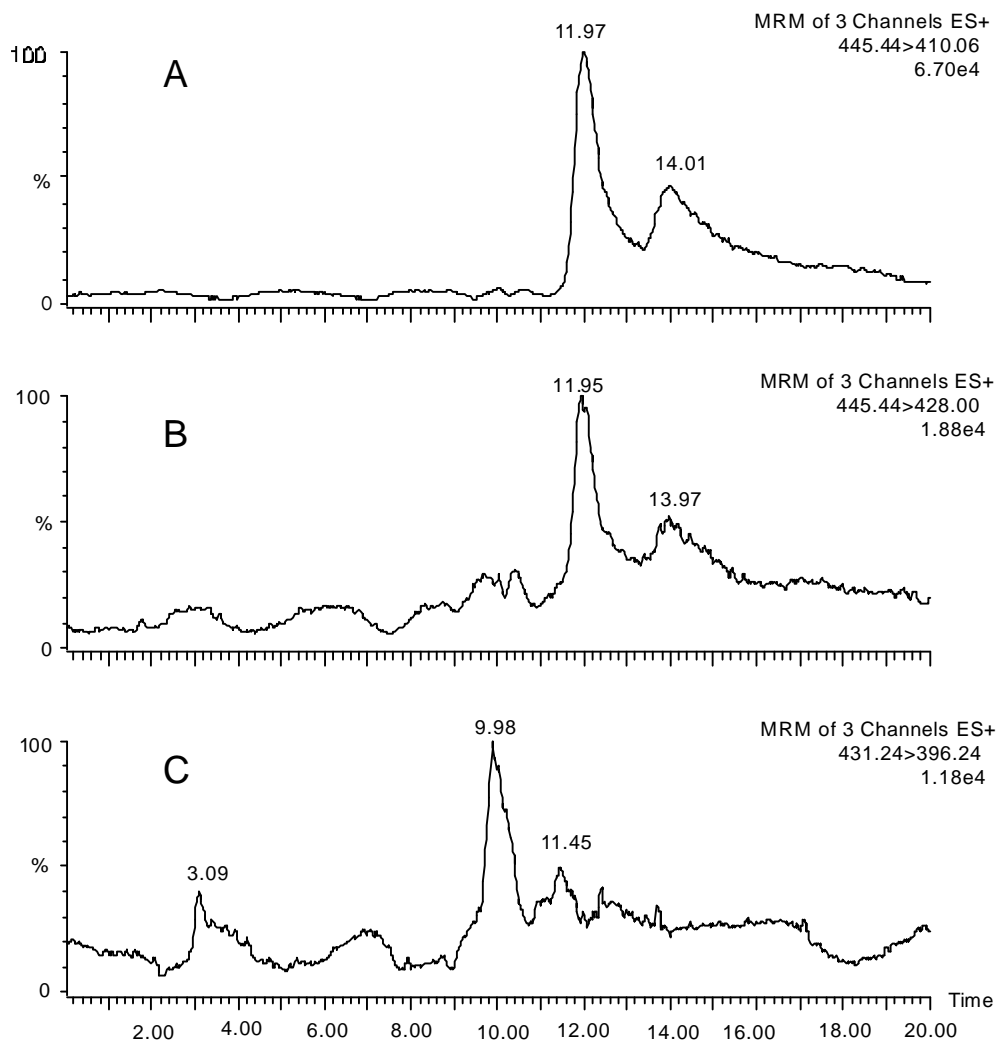
Das Chromatogramm zeigt bei der Masse 431 und bei der Retentionszeit 12.82 und 14.54 Minuten Signale für die zwei postulierten N-Desmethyltetracycline (N-DM-TC und e-N-DM-TC) und bei den Retentionszeiten 15.23 und 17.67 Minuten Signale für das e-TC und das TC. Da eine genaue Zuordnung beider N-DM-TC-Peaks als postuliertes N-DM-TC und e-N-DM-TC in den Chromatogrammen unmöglich ist, werden beide Signale als N-DM-TC bezeichnet.

Die Bestimmung wird durch Matrixbestandteile, die 10 Minuten vorher eluieren, gestört. Dadurch verliert das Chromatogramm an Aussagekraft. Die Chromatogramme rückstands-freier Blankproben zeigten im Bereich zwischen 12 und 18 Minuten keine Störsignale. Allerdings waren die Matrixsignale der Blankproben nicht reproduzierbar.



**Abb. 51: SIR-Chromatogramm einer Eigelbprobe mit gewachsenen Rückständen**  
**Spur A : Masse 445 für e-TC und TC**  
**Spur B : Masse 331 für e-N-DM-TC und N-DM-TC.**

Um den Hinweis auf die Anwesenheit des N-Desmethyltetracyclins abzusichern wurde auch ein MS-MS-Chromatogramm im Multiple Reaction Mode aufgenommen. Hierbei wird das MS1 auf die Ausgangsmasse eingestellt und das MS2 wird auf die in der Kollisionszelle fragmentierten Tochterionen eingestellt.

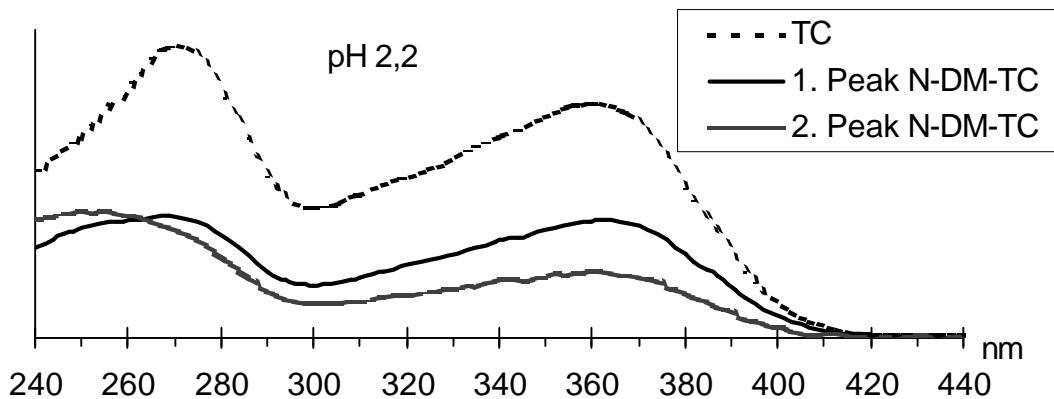


**Abb. 52: MRM-Chromatogramm einer Eigelbprobe mit gewachsenen Rückständen**  
**Spur A: Massenverlust 35 für TC und e-TC**  
**Spur B: Massenverlust 17 für TC, e-TC, ITC (Isotetracyclin)**  
**Spur C: Massenverlust 35 für e-N-DM-TC und N-DM-TC**

Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 52 dargestellt. Bei einer Retentionszeit von 9.98 und 11.45 Minuten sind in äußerst geringer Konzentration die postulierten N-Desmethyltetracycline (N-DM-TC und e-N-DM-TC) und bei 11.97 und 14.01 Minuten die Tetracycline (e-TC und TC) an Hand der in der Kollisionszelle gebildeten Tochterionen zu erkennen. Die unterschiedlichen Retentionszeiten in den Abb. 51 und 52 sind damit zu begründen, daß hier an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichen Parametern gemessen wurde und bei Abb. 52 eine höhere Flußrate verwendet werden mußte, um ein Chromatogramm mit Peaks zu erhalten.

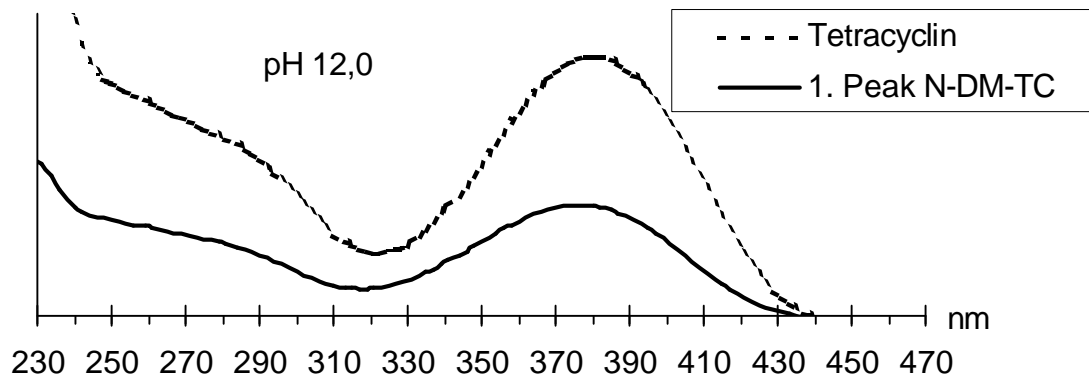
Aufgrund der Abspaltung von 35 Masseneinheiten, die für eine Wasser und Ammoniakabspaltung stehen, und die beim N-DM-TC sowie bei e-TC und TC beobachtet wurden, kann eine strukturelle Analogie im Ring C postuliert werden.

Der Ring C kann entweder wie bei den Isotetracyclinen einen 5-Ring mit Lactonstruktur oder wie bei den drei Tetracyclinen (OTC, TC und CTC) einen geschlossenen 6-Ring besitzen. Eine Isomerisierung d.h. eine Änderung der Tetracyclinringstruktur im Ring C kann anhand des UV-Spektrums bei pH 2,2 und pH 12,0 überprüft werden. Da das N-Desmethyltetracyclin in Form von zwei Peaks chromatographisch getrennt wird, wird zur Retentionszeit der beiden Peaks jeweils ein UV-Spektrum aufgenommen.



**Abb. 53:** DAD-Spektren von N-DM-TC und TC bei pH 2,2.

Beide Spektren des postulierten N-Desmethyltetracyclins stimmen mit dem Spektrum des Tetracyclins bei pH 2,2 (Abb. 53) und pH 12,0 (Abb. 54) gut überein.



**Abb. 54:** DAD-Spektren von N-Desmethyltetracyclin und Tetracyclin bei pH 12,0.

**Der 2. Peak N-DM-TC fehlt, da hierzu die Konzentration an N-DM-TC in den Eigelbproben zu gering war, um ein aussagekräftiges UV-Spektrum zu erhalten.**

Da das ITC bei 342 nm bei pH 12,0 ein Absorptionsmaximum und bei pH 2,2 nur eine äußerst geringe UV-Absorption zeigt, kann für die postulierten N-Desmethylderivate, die bei den pH-Werten 2,2 und 12,0 UV-Spektren mit großer Ähnlichkeit zu dem UV-Spektrum von TC aufweisen, eine Isomerisierung und damit eine Lactonstruktur ausgeschlossen werden.



Aufgrund der niedrigen Konzentrationen an TC und e-TC in Eiklarproben waren massen- und UV-spektroskopische Untersuchungen bei Eiklarproben nicht erfolgreich. Die Zuordnung der Peaks im Chromatogramm erfolgte durch Co-Chromatographie mit TC und e-TC und über die Retentionszeit von TC und e-TC. In den Chromatogrammen von Eiklarproben konnte kein Peak dem postulierten N-DM-TC oder e-N-DM-TC zugeordnet werden.

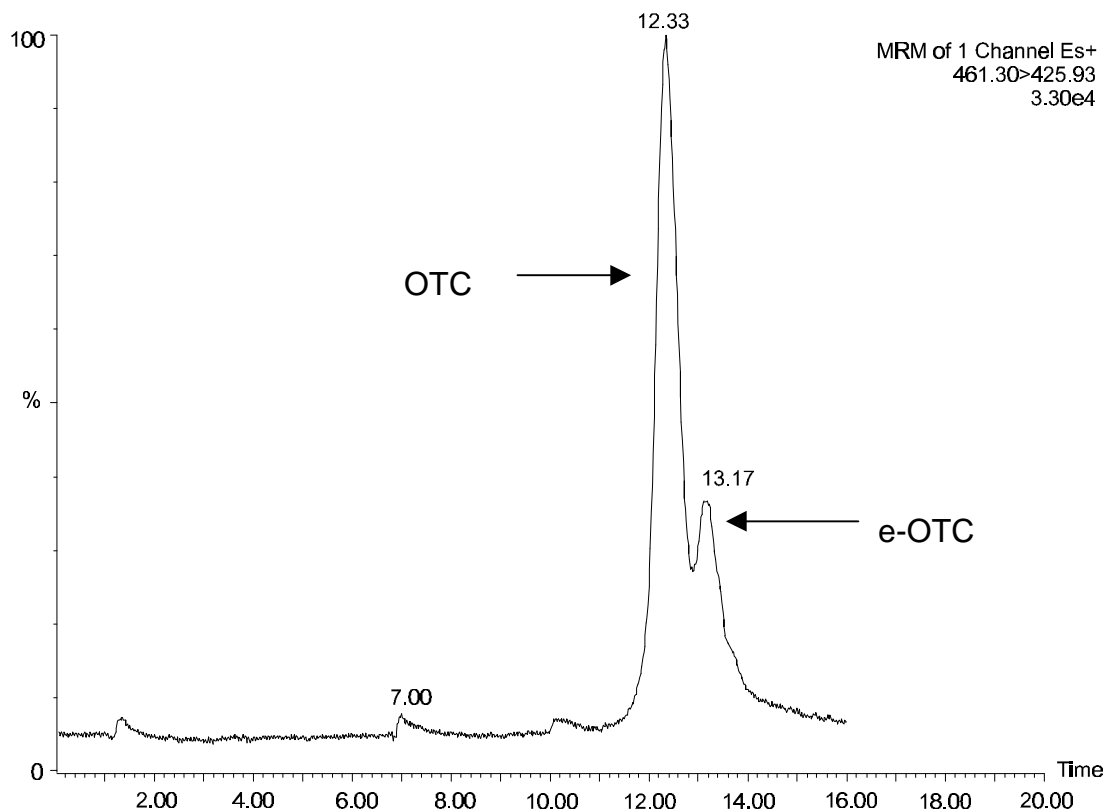
Aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen an e-TC und N-DM-TC im Plasma waren massen- und UV-spektroskopische Untersuchungen bei Plasmaproben zur Absicherung der Peakzuordnung nicht erfolgreich. In den Chromatogrammen von Plasmaproben wurde aufgrund der Retentionszeit, die mit der von N-DM-TC in Eigelbproben identisch war, nur ein Peak dem postulierten N-DM-TC zugeordnet. Dieser Peak entspricht in den Chromatogrammen von Eigelbproben dem 2. Peak für das N-DM-TC. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß in Plasmaproben nur postuliertes N-DM-TC und kein postuliertes e-N-DM-TC anwesend ist, falls das e-N-DM-TC vor dem N-DM-TC eluiert.

Die Absicherung der Peakzuordnung des Peaks für TC und e-TC in den Chromatogrammen von Plasmaproben erfolgte durch Co-Chromatographie mit den kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen TC und e-TC.

### 6.4.3 Oxytetracyclin

Von besonderem Interesse war der Nachweis von e-OTC, da in der Tetracyclin-Literatur aufgrund einer postulierten Wasserbrückenbindung der Hydroxygruppe am C-5 Atom mit der Dimethyl-Aminogruppe [15, 191] eine Epimerisierung des OTC ausgeschlossen wurde.

Mit den gewählten chromatographischen Bedingungen wurde die Trennung von OTC von seinem 4-Epimer bei Eigelbproben, die aus einer Medikationsstudie mit OTC stammten, erreicht (Abb. 55).

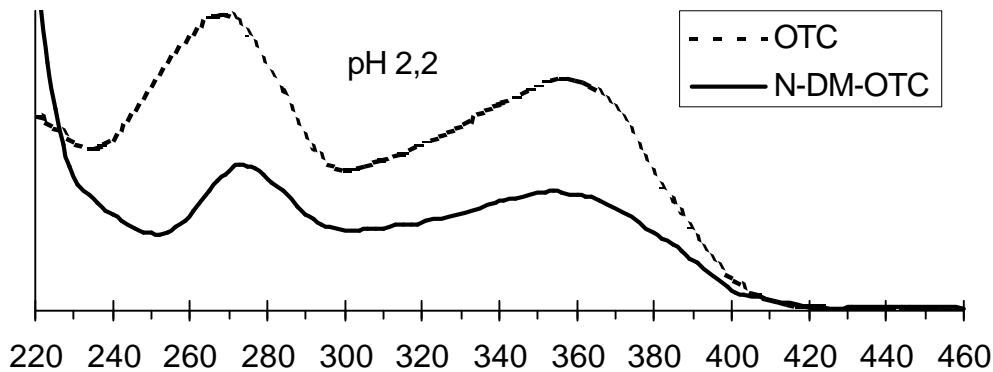


**Abb. 55: Multiple Reaction Mode-Chromatogramm einer Eigelbprobe mit Rückständen an OTC und e-OTC : Der Massenverlust 35 ist für OTC und e-OTC charakteristisch. Das Blank-Chromatogramm einer Eigelbprobe (hier nicht dargestellt) zeigte keine Peaks für das Folgeion mit der Masse  $m/z$  426.**

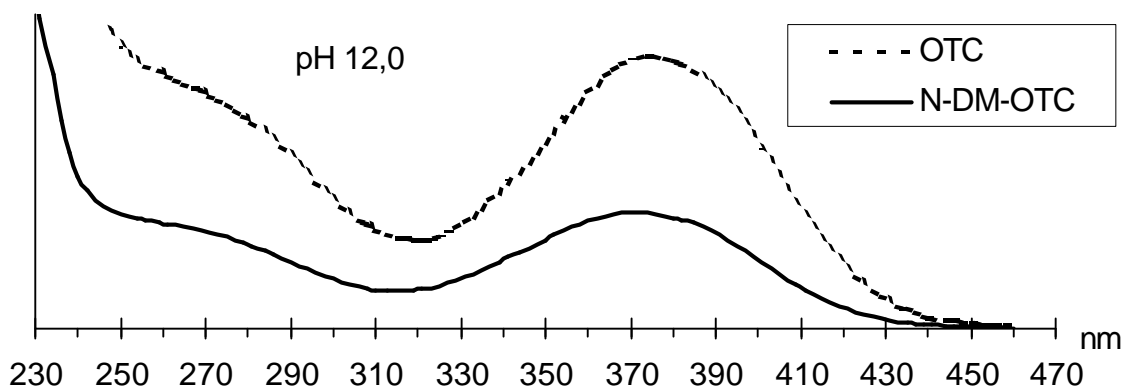
Mittels LC-MS/MS wurde kein N-DM-OTC detektiert. Die Gründe konnten nicht geklärt werden. Anhand der massenspektroskopischen Bestimmung des e-OTC kann angenommen werden, daß die Rückstandskonzentrationen zu niedrig waren, um einen positiven Nachweis zu erhalten. Die Empfindlichkeit des MS-MS reichte gerade aus, um e-OTC zu detektieren, welches in deutlich höherer Konzentration als das postulierte N-DM-OTC in Eigelbproben vorhanden war.

Durch den massenspektroskopischen Nicht-Nachweis des postulierten N-Desmethyl-Metaboliten des OTC kann die Existenz desselben allerdings nicht ausgeschlossen werden. Um aussagekräftige Hinweise mittels Massenspektroskopie zu erhalten, müßte die Probenaufarbeitung oder die LC-MS-MS Detektion empfindlicher durchgeführt werden. Weitergehende Untersuchungen, die eventuell zum Erfolg geführt hätten, waren nicht möglich, da die Messungen einen bestimmten zeitlichen und auch ökonomischen Rahmen nicht überschreiten sollten.

Analog zur UV-spektroskopischen Absicherung des N-DM-TC wurden auch UV-Spektren von N-DM-OTC (in Eigelbproben) bei pH 2,2 und pH 12,0 aufgenommen. Die Durchführung war dieselbe wie beim N-DM-TC.



**Abb. 56:** DAD-Spektren von *N*-Desmethyloxytetracyclin und Oxytetracyclin bei pH 2,2.



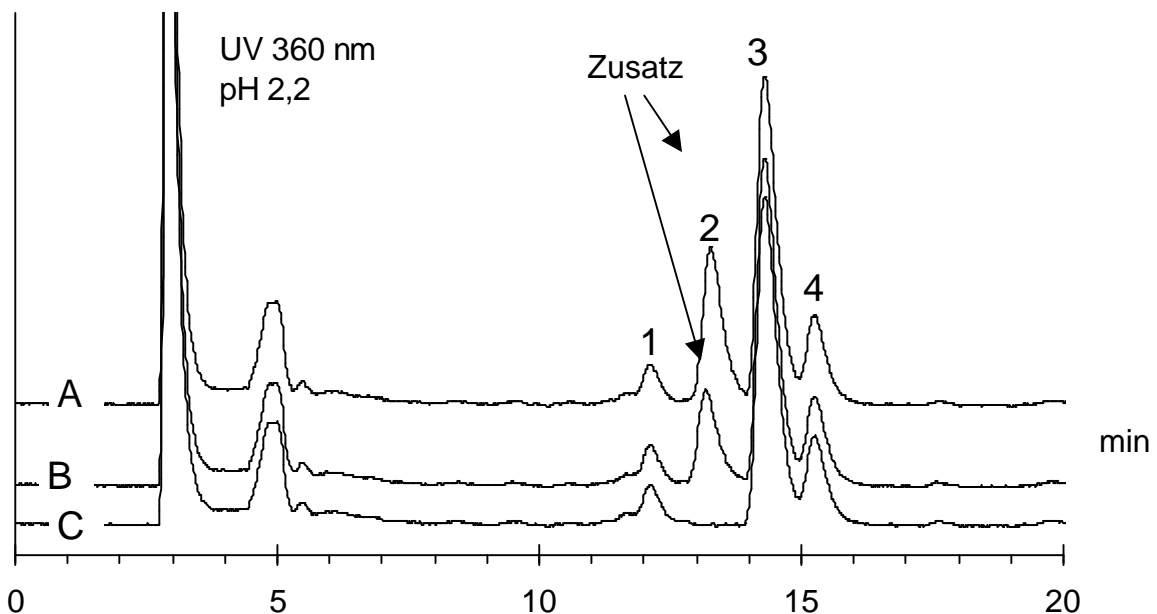
**Abb. 57:** UV-Spektrum von *N*-Desmethyloxytetracyclin und Oxytetracyclin bei pH 12,0.

Die unbekannte Substanz gleicht in ihrem UV-Verhalten dem OTC (Abb. 56 und 57). Dem postulierten N-DM-OTC kann somit eine dem OTC analoge Ringstruktur zugeordnet werden.

$\alpha$ - und  $\beta$ -apo-OTC haben bei pH 2,2 ein UV-Maximum bei 376 nm und können daher auch bei 360 nm pH 2,2 detektiert werden und so mit dem postulierten N-DM-OTC verwechselt werden. Das Gleichgewicht des Epimerenpaares von  $\alpha$ - und  $\beta$ -apo-OTC liegt auf der Seite des  $\alpha$ -apo-OTC, während das  $\beta$ -apo-OTC mit OTC coeluiert und von diesem auch mittels LC-MS-MS nicht unterschieden werden kann. OTC kann bei der Ionisation (vor Eintritt in das MS1) ein mit dem Apo-OTC verwechselbares Ion bilden. Dieses Ion kann ebenfalls ein Folgeion bilden, das die gleiche Masse wie das Folgeion des Apo-OTC besitzt. Eine Detektion von Apo-OTC neben OTC ist also mittels MS-MS nur nach chromatographischer Trennung möglich.

Eine Anwesenheit von  $\alpha$ -apo-OTC würde gleichzeitig auch Hinweise auf die Bildung von Anhydroverbindungen des TC und des CTC geben, da das  $\alpha$ -apo-OTC eine Anhydroverbindung des OTC ist.

Um eine Coelution der Apo-Oxytetracycline mit dem postulierten N-DM-OTC auszuschließen wurde ein Co-Chromatogramm durchgeführt. Hierbei wurde einer Eigelbprobe mit gewachsenen Rückständen an OTC das  $\alpha$ -apo-OTC in zwei verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Untersuchungen wurden mit Eigelbproben und nicht mit Eiklarproben durchgeführt, da in Eiklarproben im relevanten Retentionsbereich keine Signale zu sehen sind, die auf N-DM-OTC oder  $\alpha$ -apo-OTC hinweisen.



**Abb. 58:** Eigelbprobe der Henne D 88 vom 12.8.98, gewachsene Rückstände an OTC  
**FLM I:** 1 = N-DM-OTC, 2 =  $\alpha$ -apo-OTC, 3 = OTC, 4 = e-OTC  
**Chromatogramm A:** Eigelbprobe D88 mit Zusatz an  $\alpha$ -apo-OTC  
**Chromatogramm B:** Eigelbprobe D88 mit Zusatz an  $\alpha$ -apo-OTC  
**Chromatogramm C:** Eigelbprobe D88 ohne Zusatz an  $\alpha$ -apo-OTC

Beim Fließmittel II (mit 0,005 mol/l Oxalsäure) besteht keine Coelution des postulierten N-DM-OTC mit  $\alpha$ -apo-OTC (Abb. 58). Es gibt auch keinen Hinweis, daß die entsprechende apo-Verbindung in Eigelbproben vorhanden ist. Diese Beobachtung steht mit der Beobachtung im Einklang, daß keine Anhydroverbindungen des TC und des CTC bei 425 nm pH 2,2 in Eiprüben nachgewiesen wurden.

## 6.5 Auffinden weiterer Metaboliten in Eigelb- und Eiklarproben mit einer veränderten Probenaufarbeitung

Bei den Medikationsstudien 8, 9 und 10 (Übersicht S. 102, Tab. 22) wurden Hühner mit einer (hohen) Konzentration (3000 mg/kg) an jeweils nur einem der drei Tetracycline gefüttert, um die Anwesenheit von Isotetracyclinen, Tetracyclinen, Anhydrotetracyclinen und weiteren unbekanntem Metaboliten, die mittels UV- und Fluoreszenz-Detektion detektierbar sind, zu untersuchen.

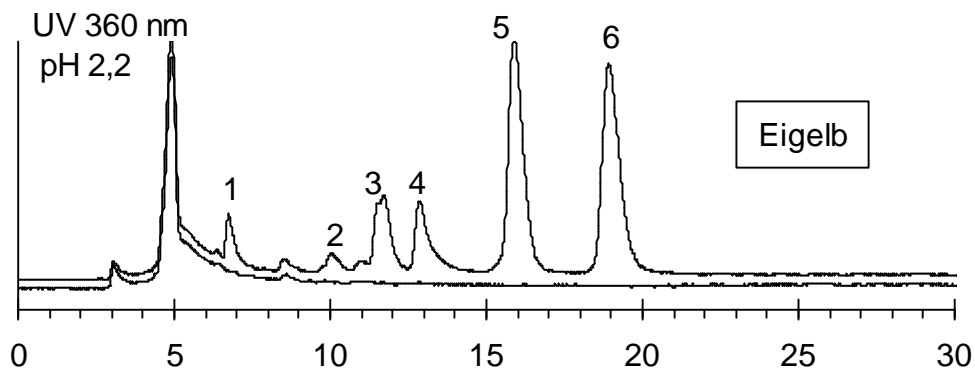
Dazu wurde die Probenaufarbeitung erweitert, die im folgenden als „**veränderte Probenaufarbeitung**“ bezeichnet wird.

Die Donorkammer wurde dreimal pro Analyse vollständig gefüllt. Insgesamt wurde ein Volumen von 7,5 ml Dialysat gesammelt, wovon 7,0 ml an einer Festphasenkartusche angereichert wurden. Die Analysenzeit erhöht sich dadurch um 30 Minuten auf insgesamt 120 Minuten. Es wurden gegenüber dem validierten Verfahren 2,85-fach höhere Signalhöhen pro Analyt erreicht.

Diese modifizierte Probenaufarbeitung wurde nicht validiert, da die Untersuchungen qualitative Ergebnisse zum Ziel hatten. Die Abbildungen der folgenden Unterkapitel zeigen daher Peaks in den Chromatogrammen, die bei dem validierten Verfahren unterhalb der Nachweisgrenze liegen würden.

### 6.5.1 Auffinden weiterer Metaboliten in Eigelbproben

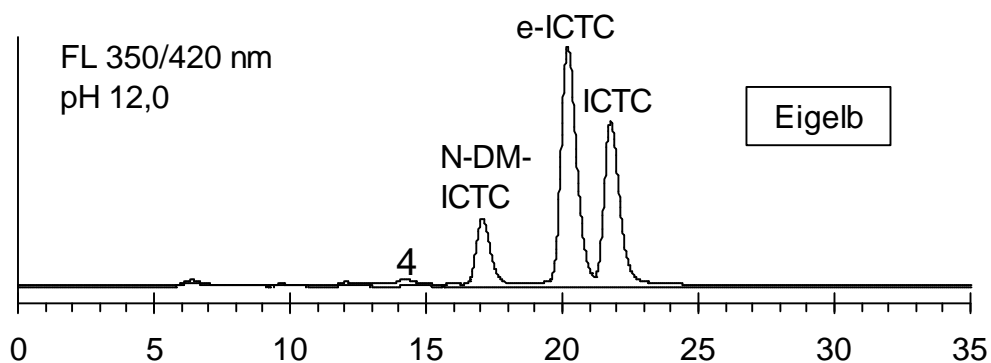
In Eigelbproben wurden nach Medikation mit CTC mittels der validierten Fluoreszenz-Methode, bei der die Donorkammer nur einmal gefüllt wurde, N-DM-ICTC, e-ICTC und ICTC nachgewiesen (Abb. 60). Mittels LC-MS-MS wurde nach Medikation mit CTC eine geringe Konzentration an TC neben ICTC nachgewiesen. Das nachgewiesene TC stammte hierbei aus dem in den Medikationsstudien verwendeten CTC der Firma Sigma Aldrich, welches TC als Nebenbestandteil enthielt. Mit der veränderten Probenaufarbeitung wurden in den Chromatogrammen der Abb. 59 und 61 weitere unbekannte Peaks sichtbar, die auf die Medikation mit CTC zurückzuführen waren. Im Vergleich der drei Tetracycline scheint CTC bzw. ICTC deutlich instabiler zu sein als die anderen Tetracycline OTC und TC. Als Fließmittel wurde Fließmittel I mit 0,1 mol/l Oxalsäure und Acetonitril 50 + 50, v + v eingesetzt.



**Abb. 59:** *Eigelprobe mit Rückständen an CTC nach Medikation mit 3000 mg/kg CTC im Futter : 1 = unbekannt, 2 = N-DM-TC und N-DM-ICTC, 3 = e-TC und e-ICTC 4 = ICTC und TC, 5 = e-CTC, 6 = CTC*

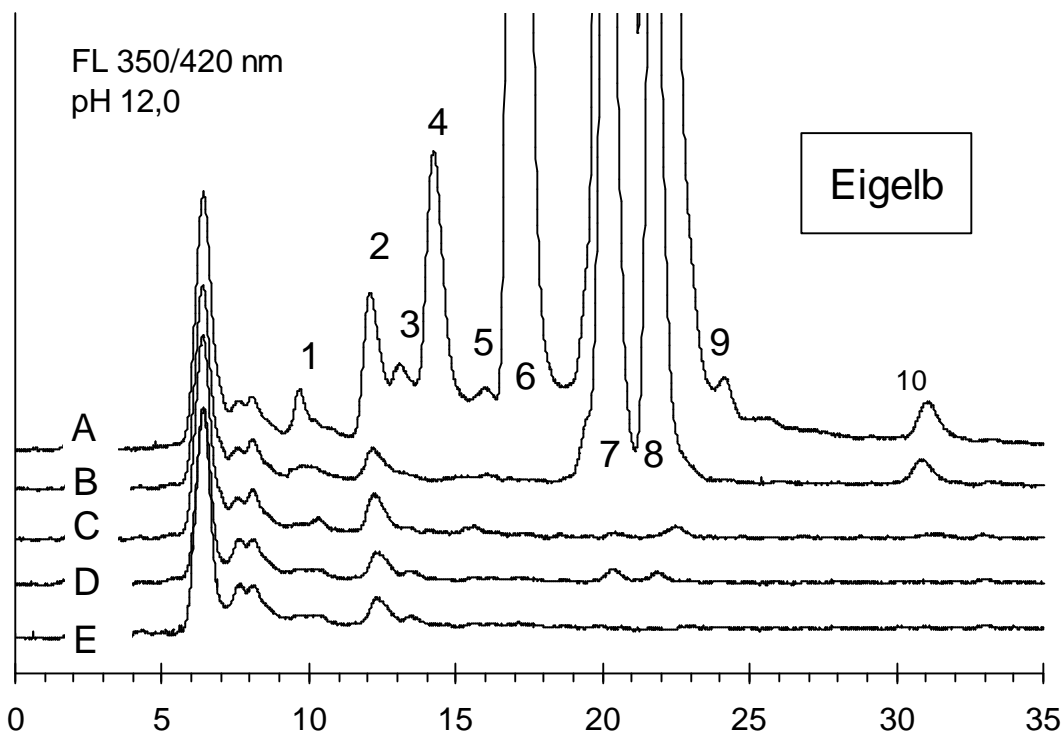
*Methode : veränderte Probenaufarbeitung s.o.*

Nach Medikation mit CTC können weitere unbekannte Minor-Metaboliten nachgewiesen werden. (Abb. 59, 60, 61).

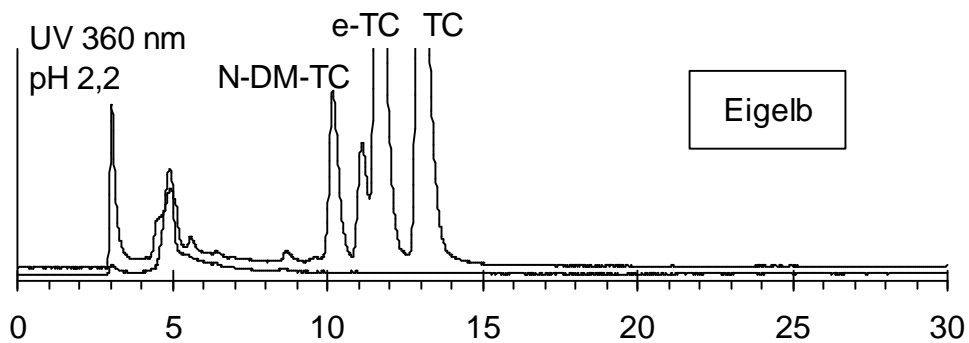


**Abb. 60:** *Eigelprobe mit Rückständen an CTC-Metaboliten: 134 µg/kg NDM-ICTC, 460 µg/kg e-ICTC, 334 µg/kg ICTC, 4 = unbekannt und eine rückstandsfreie Eigelprobe, chromatographiert mit Fließmittel II*

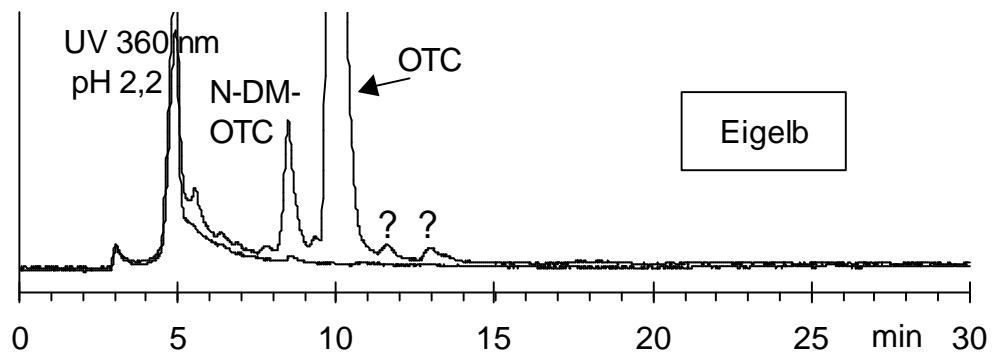
*Methode: validierte Probenaufarbeitung mit einmaligem Füllen der Donorkammer*



**Abb. 61:** *A* : Rückstände an CTC- Metaboliten nach Fütterung mit CTC  
 Gleiche Probe wie Abb. 60, Peak 1-5 und 9-10 = unbekannt, 6 = N-DM-ICTC,  
 7 = e-ICTC, 8 = ICTC  
*B*: Eigelbprobe dotiert mit 600 µg/kg CTC und gelagert bei 37°C für 25 Std.,  
*C*: Rückstände an OTC,  
*D*: Rückstände an TC,  
*E*: rückstandsfreie Kontrollprobe;  
 die Proben *A*, *C*, *D* stammen aus einer Medikationsstudie mit 3000 mg Wirkstoff pro kg Futter.



**Abb. 62:** Eigelbprobe mit Rückständen an TC nach Medikation mit 3000 mg/kg TC im Futter. Methode: veränderte Probenaufarbeitung s.o., FLM 1



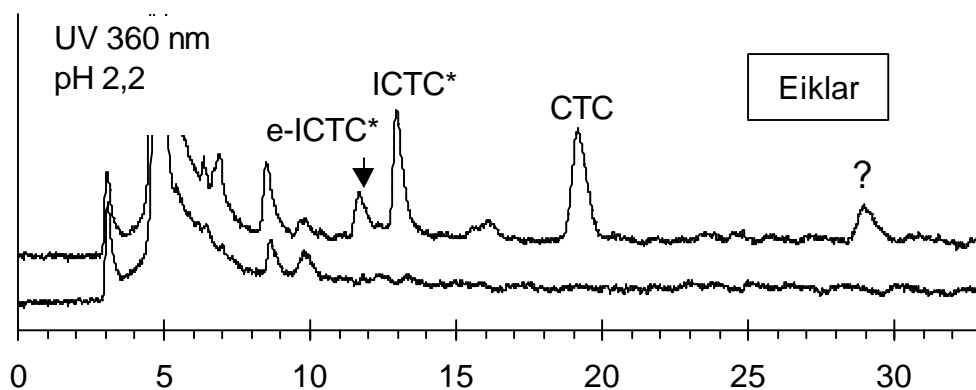
**Abb. 63:** Eigelbprobe mit Rückständen an OTC nach Medikation mit 3000 mg/kg OTC im Futter. Methode : veränderte Probenaufarbeitung s.o., FLM 1 : keine Trennung von OTC und e-OTC.

Auch nach Medikation von TC bzw. OTC wurden in Eigelbproben die entsprechenden Epimere bzw. N-Desmethyl-Derivate nachgewiesen (Abb. 62 und 63).

Im Vergleich mit den beiden Tetracyclinen TC und OTC scheint das CTC besonders leicht in mehrere unbekannte Substanzen umgewandelt zu werden.

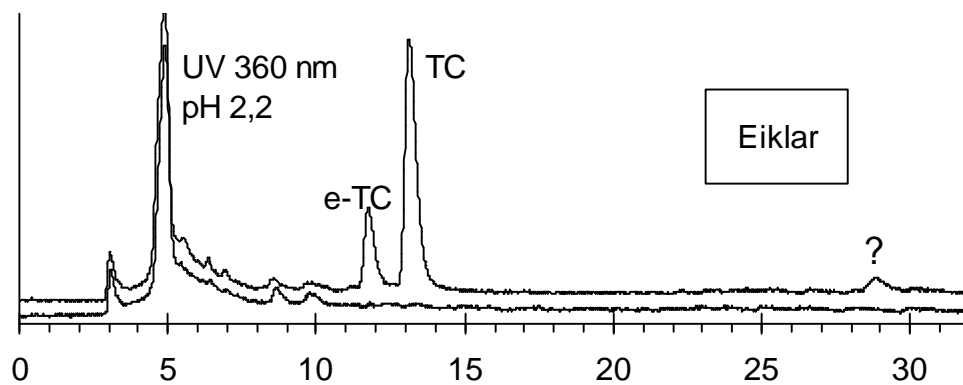
### 6.5.2 Auffinden weiterer Metaboliten in Eiklarproben

In Eiklarproben wurden nach Medikation mit den drei Tetracyclinen weitere noch unbekannte Metaboliten des CTC, TC und OTC gefunden. Die entsprechenden Peaks in den Chromatogrammen wurden mit einem „?“ gekennzeichnet

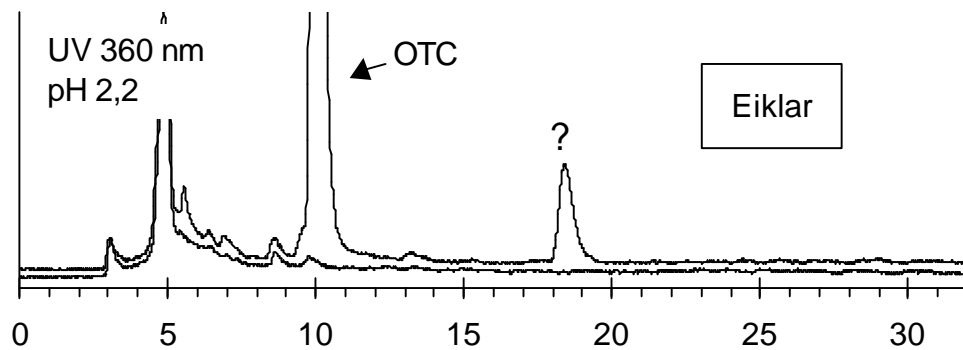


**Abb. 64:** Eiklarprobe mit Rückständen an CTC nach Medikation mit 3000 mg/kg CTC im Futter; bei ICTC\* kann es sich auch um TC handeln. Methode : veränderte Probenaufarbeitung s.o.





**Abb. 65: Eiklarprobe mit Rückständen an TC nach Medikation mit 3000 mg/kg TC im Futter. Methode : veränderte Probenaufarbeitung s.o.**



**Abb. 66: Eiklarprobe mit Rückständen an OTC nach Medikation mit 3000 mg/kg OTC im Futter. Methode : veränderte Probenaufarbeitung s.o.**

Die Abb. 64, 65 und 66 zeigen in den Chromatogrammen von Eiklarproben und Blankeiklarproben die Anwesenheit eines weiteren Metaboliten, der bei 360 nm UV pH 2,2 detektiert werden kann. Eine massenselektive Detektion der neuen unbekannt Substanz war erfolglos, da sie eine unbekannt Masse besitzt und die MS-Untersuchungen zeitlich begrenzt waren.

Die Untersuchungen der Eiklarproben zeigten folgende Ergebnisse :

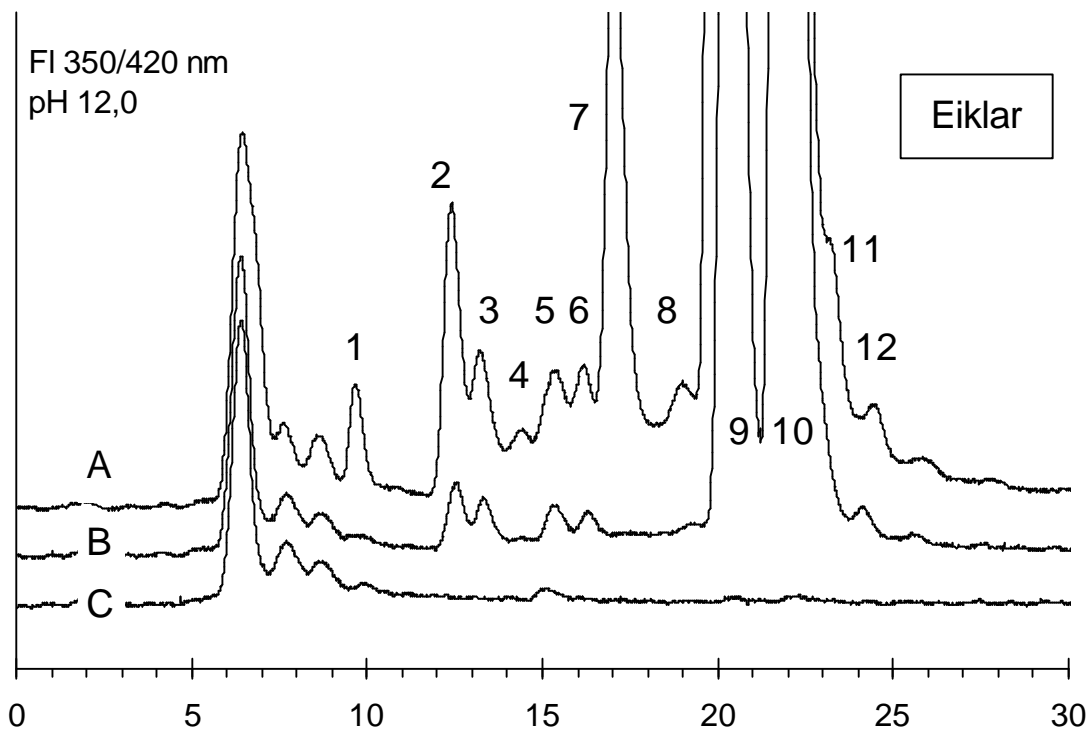
- bei TC und OTC : keine Fluoreszenz bei 350/420 nm pH 12,0 : kein Hinweis auf die Anwesenheit von ITC oder IOTC
- keine N-Desmethyl-derivate des OTC, TC, CTC oder ICTC
- bei TC und CTC : keine Absorption bei 425 nm : kein Hinweis auf die Anwesenheit von Anhydrotetracyclin und Anhydrochlortetracyclin

Unter dem in Abb. 64 dargestellten Peak für e-ICTC und ICTC befindet sich in der Eiklarprobe auch TC und e-TC. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei der

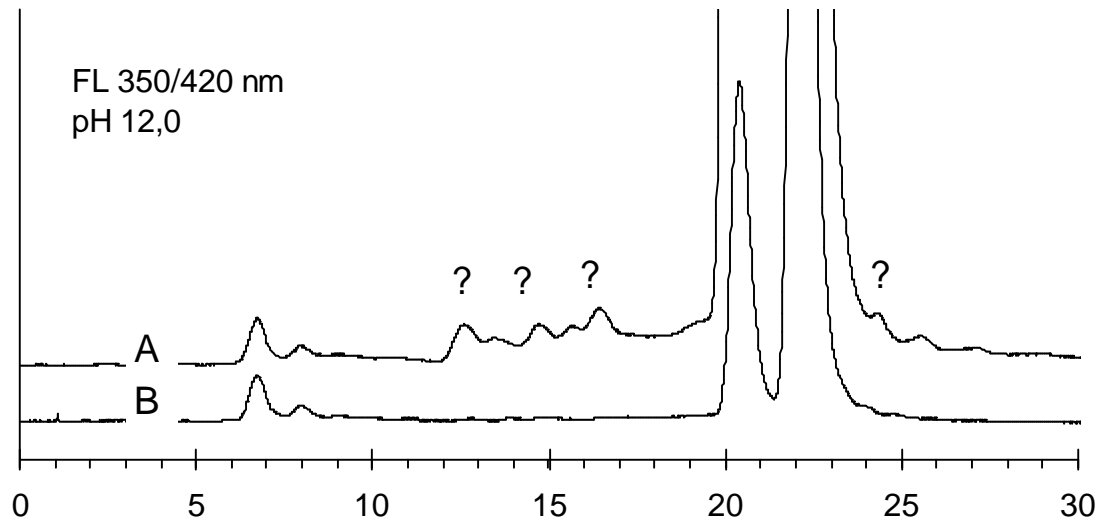
veränderten Probenaufarbeitung und den hohen ICTC-Konzentrationen in der Eiklarprobe unter diesen Bedingungen im UV bei 360 nm pH 2,2 auch ICTC detektiert wird. Bei dem gewählten Fließmittel I ist eine Trennung des ICTC vom TC nicht möglich. Mittels der validierten Methode, bei der die Donorkammer nur einmal gefüllt wird, wurde in dieser Eiklarprobe 442  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e-ICTC und 1235  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ICTC nachgewiesen.

Die folgende Abb. 67 zeigt, daß in Eiklarproben das CTC in andere Substanzen umgewandelt wird. Nachdem Eiklar mit CTC (400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) dotiert wurde und bei 37°C für 25 Stunden in einem verschlossenen PE-Röhrchen gelagert wurde, ließen sich ebenfalls einige unbekannte Stoffe ermitteln (Abb. 67, Chromatogramm B).

Im Vergleich mit den beiden Tetracyclinen TC und OTC scheint das CTC (Abb. 67, Chromatogramme A und B) besonders leicht in mehrere unbekannte Substanzen umgewandelt zu werden.



**Abb. 67: Eiklarproben : A : Rückstände an CTC- Metaboliten nach Medikation mit CTC, 1 bis 6 = unbekannt, 7 = N-DM-ICTC, 8, 11 und 12 = unbekannt 9 = e-ICTC, 10 = ICTC**  
**B : Eiklarprobe dotiert mit 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  CTC und gelagert bei 37°C für 25 Std.,**  
**C : rückstandsfreie Blankeiklarprobe.; Proben B und C wurden bei 37°C in einem verschlossenen PE-Gefäß 25 Stunden gelagert**  
**Chromatogramme A-C : veränderte Probenaufarbeitung**



**Abb. 68: Wässriger matrixfreier ICTC-Standard, analysiert nach vollständiger Probenaufarbeitung,  
A : 6 Monate alt, gelöst in 0,01 mol/l Oxalsäure, gelagert bei 6°C im Kühlschrank,  
B : frisch angesetzter ICTC Standard**

Abb. 68 zeigt ein Chromatogramm einer 6 Monate alten ICTC-Standard-Lösung, die im Kühlschrank bei 6°C gelagert wurde und zum Vergleich ein Chromatogramm einer frisch angesetzten Standardlösung. Aus den Chromatogrammen folgt als mögliche Ursache für die Vielzahl an unbekanntem Substanzen eine Instabilität des ICTC, wie sie von Bryan et al. [20] und Blanchflower et al. [132] beschrieben wurde. Hierbei entstanden aus dem CTC Substanzen, die chromatographisch von ihrer Ausgangssubstanz abgetrennt werden konnten. Aus dem Vergleich der Chromatogramme einer dotierten Eigelb- und Eiklarprobe (Abb.61, Chrommatogramm B; Abb. 67 Chromatogramm B), die bei 37°C für 25 Stunden gelagert wurde, kann postuliert werden, daß auch die Temperatur, die Matrix oder der pH-Wert der Matrix einen ungünstigen Einfluß auf die Stabilität des CTC und des ICTC ausüben kann.

Zusammenfassend kann man sagen, daß in Eiklarproben mit gewachsenen Rückständen noch unbekannte Metaboliten des OTC, TC und des CTC vorhanden sind. Das CTC und sein Hauptmetabolit das ICTC sind deutlich instabiler als die beiden anderen Tetracycline OTC und TC. Es existieren eine Vielzahl von Substanzen in gewachsenen Eiklar- und Eigelbproben, die auf die Medikation mit CTC zurückzuführen sind. Da die Meßzeit am MS-MS begrenzt war, bleibt hier das vorläufige Ergebnis, daß noch weitere Metaboliten existieren oder existieren können. Bei diesen Metaboliten wird es sich allerdings um Minormetaboliten handeln, deren Nachweis und Identifizierung nur mit aufwendiger instrumenteller Analytik möglich sein wird.

### 6.5.3 Enzymatische Hydrolyse von Konjugaten

Aufgrund der Struktur der drei klassischen Tetracycline OTC, TC und CTC kann die Bildung von Konjugaten, mit Glucuronsäure oder aktivierter Schwefelsäure, an einer der Hydroxylgruppen nicht ausgeschlossen werden. Vergleichbare Untersuchungen wurden von Nelis und De Leenheer [45] zum Metabolismus von Minocyclin beim Menschen und von Cooper et al. [192] für OTC bei Rindern durchgeführt. Über eine Konjugatbildung der drei Tetracycline bei Hühnereiern liegen bislang keine Untersuchungen vor.

Im Vergleich mit nicht-hydrolysierten Proben werden enzymatisch-hydrolysierte Proben auf eine Zunahme an Analyten geprüft. Diese indirekte Nachweismethode verzichtet auf den Einsatz von Wirkstoff-Konjugaten, die nicht verfügbar sind. Die Nachweismethode stützt sich auf die Präzision der Methode stets gleiche Flächenwerte bei gleichen Analytkonzentrationen zu bestimmen. Nach der Hydrolyse von Konjugaten (bei Proben mit gewachsenen Rückständen) erhöht sich die Wirkstoffkonzentration, was als positiver indirekter Nachweis für anwesende Konjugate anzusehen ist. Aus den Chromatogrammen ist durch einen erhöhten Matrixpeak abzulesen, daß das Enzym in der Probenmatrix seine hydrolytische Aktivität behalten hat. Unklar bei diesem Test auf Konjugate bleibt allerdings die Frage, wie groß die Spezifität des Enzyms in der Eimatrix für Tetracyclinkonjugate ist, und ob vor allem die Tetracyclinkonjugate in einer ausreichenden Konzentration in der Probelösung vorhanden sind, um zum einen als Substrat in der Proteinmatrix erkannt und umgesetzt zu werden, und ob die eventuell hydrolysierten Konjugate eine Konzentration erreichen, die detektiert werden kann. Trotz dieser Nachteile hat dieser indirekter Nachweis Eingang in die Metabolismusforschung gefunden [193].

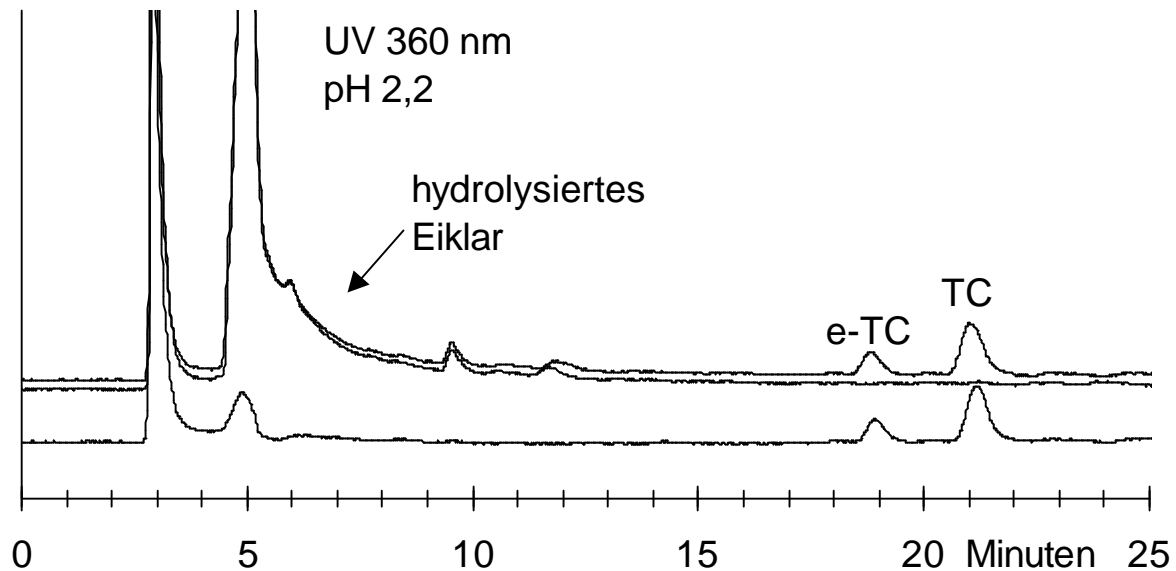
Die entsprechend der Standardarbeitsanweisung verdünnten Eiklar- und Eigelbproben mit gewachsenen Rückständen hatten einen pH-Wert von 6,0. Der für die Umsetzung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase (z.B. Boehringer Nr. 127698) aus *Helix pomatia* optimale pH-Wert von 5 ließ sich hier nicht verwirklichen, da bei diesem pH-Wert Ei-Matrixbestandteile denaturieren und einen Niederschlag bilden. Da aber die enzymatisch hydrolysierten Eiprobe quantitativ untersucht und die Ergebnisse mit nicht hydrolysiertem Eiprobe quantitativ verglichen werden sollten, wurde auf einen möglichen Zentrifugationsschritt zur Abtrennung von Ei-Matrix verzichtet. Bei diesem in der Literatur beschriebenen pH-Wert-Optimum von 5 handelt es sich um den Mittelwert von pH-Optima der aus *Helix Pomatia* gewonnenen Enzyme. Das pH-Optimum der  $\beta$ -Glucuronidase aus *Helix pomatia* beträgt pH 4,1 und für die Arylsulfatase aus *Helix pomatia* pH 6,2 [194].

In einem Vergleichsexperiment wurde die biologische Aktivität des Enzymgemisches aus *Helix pomatia* mit p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronid bei pH 6, dem pH-Wert der verdünnten Eilösung, getestet. Nach 30 Minuten wurde die Testlösung mit einer Lauge auf pH 10 eingestellt. Die Farbe der Lösung entsprach hierbei einer alkalischen gelben

p-Nitrophenollösung bei pH 10, die zum Vergleich angesetzt worden war. Zum Vergleich wurde auch eine alkalische p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronid-Lösung bei pH 10 angesetzt. Diese Lösung zeigte keine gelbe Färbung an. Aus den Vergleichsuntersuchungen wurde geschlossen, daß eine Enzymaktivität der  $\beta$ -Glucuronidase aus *Helix pomatia* auch bei pH 6,0, dem pH-Wert der Eilösung, vorliegt.

Folgendermaßen wurde der **Versuch durchgeführt**: Es wurde dialysebereite verdünnte Eiklar- und Eigelbprobelösungen von Eiern hergestellt, die aus den Medikationsstudien 8,9 und 10 (Tab. 22) stammten und gewachsene Rückstände aufwiesen. Von 30 g verdünnter Eiklarlösung und von 40 g verdünnter Eigelblösung wurden jeweils ca. 10 g als Vergleichsprobe direkt eingefroren. Zu den restlichen ca. 20 g Eiklar- und 30 g Eigelblösung wurden nun jeweils 50 mg Enzymlösung gegeben und für 20 Minuten auf der Schüttelmaschine gut geschüttelt. Zu einer rückstandsfreien Eiklar- und Eigelblösung wurde ebenfalls die gleiche Menge an Enzym hinzugegeben und geschüttelt. Diese Lösungen wurden in verschlossenen PE-Röhrchen (Fa. Greiner) in einem auf 37°C geheizten Trockenschrank mit Schüttelvorrichtung für 25 Stunden belassen. Die Reaktion wurde beendet, indem die Lösungen in einem Eisbad abgekühlt wurde. Anschließend wurden die Vergleichsproben aufgetaut und mit den auf 37°C und mit Enzymlösung hydrolysierten Eiprobe im Wechsel untersucht.

Im Vergleich mit den nicht-hydrolysierten Eiprobe, die jeweils vom gleichen Ei stammten, wurde in den Proben (mit gewachsenen Rückständen) durch die enzymatische Hydrolyse keine Zunahme an Tetracyclinen und ihren Metaboliten festgestellt. Untersucht wurden Eiklar- und Eigelbproben, die aus den Medikationsstudien 8, 9 und 10 stammten, bei denen jeweils 3000 mg/kg jeweils pro Tetracyclin an die Legehennen verfüttert wurden. Die Rückstandsgehalte hydrolysierter und nicht-hydrolysierter Eiprobe waren im Rahmen des Meßfehlers identisch, so daß sich mittels dieser indirekten Methode keine Hinweise für hydrolysierte Konjugate ergaben.



**Abb. 69: Chromatogramm einer Eiklarprobe mit gewachsenen Rückständen an TC ohne enzymatische Hydrolyse, 25 Stunden bei 37°C (unteres Chromatogramm) und nach der enzymatischen Hydrolyse (oberes Chromatogramm), in der Mitte ein Chromatogramm einer Eiklarprobe ohne Rückstände nach der enzymatischen Hydrolyse 25 Stunden bei 37°C. Die Eiklarprobe enthält e-TC (< BG) und 60 µg/kg TC.**

Abb. 69 zeigt das Chromatogramm einer Eiklarprobe mit gewachsenen Rückständen an TC vor und nach der enzymatischen Hydrolyse und einer Eiklarprobe ohne gewachsene Rückstände nach der enzymatischen Hydrolyse. Es ist gut zu erkennen, daß durch die enzymatische Hydrolyse auch andere Matrixbestandteile hydrolysiert wurden, die durch die Dialysemembran gelangten und an der Anreicherungssäule unspezifisch angereichert wurden. Eine Zunahme der Rückstände an e-TC und TC im oberen Chromatogramm (nach Hydrolyse) der Abb. 69 gegenüber dem unteren Chromatogramm der Abb. 69 (ohne Hydrolyse) durch die enzymatische Hydrolyse ist nicht zu erkennen. Auch bei den anderen zwei Tetracyclinen OTC und CTC sowie bei dem ICTC ergaben sich bei Eiklarproben keine Hinweise für eine hydrolytische Freisetzung von gebundenen Rückständen.

Auch bei den Chromatogrammen von Eigelbproben vor und nach enzymatischer Hydrolyse ergaben sich keine Hinweise, die auf eine hydrolytische Freisetzung von Tetracyclinen aus Konjugaten mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure schließen lassen. Das Ergebnis, daß bei keinem der drei Tetracycline eine Konjugatbildung mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure in Eiklar- und Eigelbproben vorliegt, steht im Einklang mit den Ergebnissen von Cooper et al. [192] und Nelis und De Leenheer [45], die sie für OTC bei Kälbernieren und Minocyclin bei Humanurin erhalten haben.

### 6.5.4 Isotetracyclin und Isooxytetracyclin als potentielle Rückstände nach Medikation mit TC und OTC

ICTC war als Hauptmetabolit des CTC [21, 58] in großem Umfang in den biologischen Proben anwesend. Folglich könnte aus TC oder OTC ebenfalls im großem Umfang Isotetracyclin (ITC) oder Isooxytetracyclin (IOTC) gebildet werden und als Rückstand nachweisbar sein. ITC bzw. IOTC sollte analog zum ICTC, welches vor seiner Muttersubstanz CTC eluiert, auch vor seiner Muttersubstanz TC eluieren.

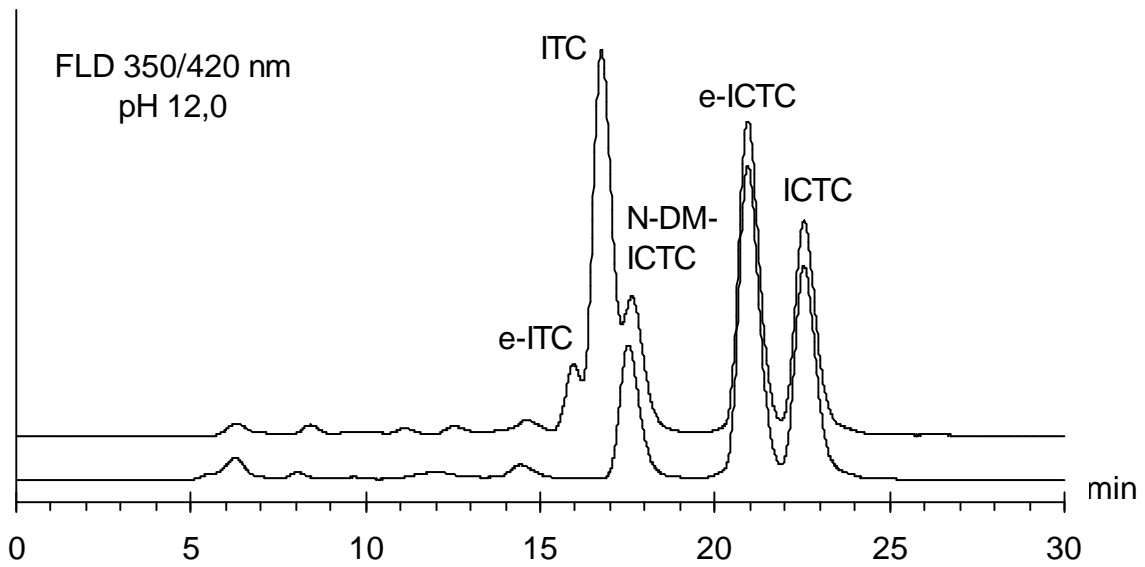
Zum Nachweis von IOTC und ITC wurde ein Volleibblank mit diesen selbsthergestellten Standards dotiert. Beide Isotetracycline (IOTC und ITC) können neben ICTC mittels Fluoreszenz-Detektion bestimmt werden. Die Chromatogramme von Proben mit gewachsenen Rückständen nach Medikation mit OTC, TC und CTC zeigten allerdings nie Peaks für IOTC und ITC. Im Falle des ITC bestand noch die Möglichkeit, daß ITC mit N-DM-ICTC coeluiert und deshalb eventuell doch ITC in einigen Proben anwesend sein könnte.

Um diese theoretischen Überlegungen zu überprüfen, wurde eine Volleiprobe, die gewachsene Rückstände an allen drei Tetracyclinen enthielt, mittels Fluoreszenz-Detektion mit Zusatz an ITC und ohne Zusatz an ITC untersucht. Durch die Co-Chromatographie mit ITC sollte geprüft werden, ob die Bestimmung des N-DM-ICTC mittels Fluoreszenz-Detektion durch möglicherweise anwesendes ITC beeinflußt oder gestört wird.

Der nicht käuflich erhältliche ITC-Standard wurde mittels UV-Spektren bei pH 2,2 und pH 12,0 (DAD) und mittels LC-MS-MS charakterisiert und seine Reinheit mittels UV bei 310 nm untersucht. Die Ergebnisse sind in Kap. 10.5 angegeben.

Die Eigelbprobe stammte vom 10. Medikationstag der Henne C42 der Medikationsstudie 4, bei der besonders hohe Rückstandskonzentrationen der drei Tetracycline im Ei festgestellt worden waren. Das Futter hatte eine Zusammensetzung von 800 mg/kg OTC, 750 mg/kg TC und 1300 mg/kg CTC.

Abb. 70 zeigt, daß ITC kurz vor dem N-DM-ICTC eluiert wird und damit auch in Anwesenheit des N-DM-ICTC nachgewiesen werden kann, sofern es in biologischen Proben anwesend ist. Die Probe mit den gewachsenen Rückständen an OTC, TC und CTC zeigte keinen Hinweis auf die Anwesenheit von ITC. Auch in LC-MS-MS Chromatogrammen mit gewachsenen Rückständen wurden keine Peaks für das ITC erhalten.



**Abb. 70:** Chromatogramm (unteres) einer Eigelbprobe mit gewachsenen Rückständen an OTC, TC und CTC. Die Fluoreszenz-Detektion bei 350/420 nm erfasst die Isotetracycline. Im oberen Chromatogramm wurde derselben Probe ICTC zugesetzt. Als Fließmittel wurde das Fließmittel II verwendet.



## 7. In-Vitro Untersuchungen zur Stabilität der Tetracycline

### 7.1 Epimerisierung und Isomerisierung bei 37°C als simulierte physiologische Bedingung

In einem Versuch wurde ermittelt, inwieweit die Epimerisierung von OTC, TC, CTC und die Isomerisierung von CTC, sowie die Bildung der N-Desmethylderivate durch die Matrix (bzw. pH-Wert der Matrix) und durch die Körpertemperatur der Henne beeinflusst werden. Liegt keine In-vitro-Bildung vor, so können enzymatische *in vivo* Vorgänge zur Bildung der Umwandlungsprodukte und der N-Desmethylderivate diskutiert werden.

Um eine Temperaturabhängigkeit der Epimerisierung zu ermitteln, wurden rückstandsfreies Eiklar und Eigelb, sowie die Probenverdünnungslösung (PVL) mit den drei Tetracyclinen OTC, TC und CTC dotiert. Die drei Tetracycline enthielten hierbei entsprechend der Reinheit der Standardsubstanz nur geringe Anteile an Epimeren. Die Dauer von 25 Stunden wurde gewählt, weil die Bildung des Eiklars um den ovulierten Eidotter ca. 25 Stunden vor der Eiablage [68] beginnt. Die Ergebnisse sind in Tab. 54 zusammengefaßt.

	Matrix	pH	% e-OTC an S(OTC + e-OTC)	% e-TC an S(e-TC + TC)	% e-CTC an S(e-CTC + CTC)	% e-ICTC an S(ICTC + e-ICTC)
<i>in vivo</i>	Plasma	7,4	> 5	> 25	10 bis 20	> 25
<i>in vitro</i>	Eiklar	7,5	< 5	24	< NG	25
<i>in vivo</i>		> 7	< 5	25	< NG	25
<i>in vitro</i>	PVL	5,85	< 5	40	36	61
<i>in vitro</i>	Eigelb	5,9	< 5	33	28	57
<i>in vivo</i>		6	23	55	45	60

bei *in vitro* Versuchen: n = 2

**Tab. 54: Epimerisierungsraten bei einem *in vitro* Experiment (25 h, 37°C) im Vergleich zu Epimerisierungsraten (Mittelwerte) aus Medikationsstudien**

Die Epimerisierung wird durch die Temperatur 37°C und niedrigeren pH-Wert gefördert (Tab. 54). Besonders auffällig ist, daß bei der Matrix Eiklar relativ kleine Epimerisierungsraten der drei Tetracycline (OTC, TC, CTC) und des ICTC vorliegen.

Die Epimerisierungsrate lag bei Plasmaproben zwischen der Epimerisierungsrate in Eiklar- und Eigelbproben. Die niedrige Epimerisierungsrate in Eiklarproben im Vergleich zu Plasmaproben kann mit den hier vorliegenden Daten nicht schlüssig erklärt werden, da Plasma und Eiklar einen ähnlichen pH-Wert besitzen. Durch einen zusätzlichen *in vitro* Versuch, bei dem man dotiertes Plasma bei 37°C für 25 Stunden erwärmt, könnte man zusätzliche Hinweise auf eine Matrixabhängigkeit der Epimerisierungsrate erhalten. Der Matrix-Einfluß könnte theoretisch darin bestehen, daß die Matrix durch Proteinbindung eine Epimerisierung oder Isomerisierung der drei Tetracycline in unterschiedlichen Ausmaß verzögert oder verhindert.

In Eiklarproben von Eiern, die aus Medikationsstudien stammten, war eine nahezu vollständige Isomerisierung (99 – 100 %) des CTC zum ICTC zu beobachten.

Aus Tab. 55 geht hervor, daß die Isomerisierung auch unter *in-vitro*-Bedingungen im vergleichbarem Umfang stattfindet.

	Matrix	pH	% <b>S</b> ( e-ICTC + ICTC) an <b>S</b> (e-CTC + CTC + ICTC + e-ICTC)
<i>in vivo</i>	Plasma	7,4	23- 53
<i>in vitro</i>	Eiklar	7,5	100
<i>in vivo</i>		> 7	100
<i>in vitro</i>	PVL	5,85	28
<i>in vitro</i>	Eigelb	5,9	29
<i>in vivo</i>		6	52- 74 %

bei *in vitro* : n = 2

**Tab. 55: Isomerisierungssrate von CTC bei *in vitro* Experiment (25 h, 37°C) im Vergleich zu Rückstandsdaten aus Medikationsstudien**

Bei dem *In-vitro*-Experiment wurde in Analogie zu den Proben mit gewachsenen Rückständen kein IOTC und kein ITC, jedoch ICTC bestimmt. Aufgrund dieser Beobachtung kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß CTC leichter isomerisiert als die beiden anderen Tetracycline und daß die Isomerisierung des CTC wahrscheinlich ein nicht-enzymatischer Vorgang ist.

Es wurden keine N-Desmethylderivate (von OTC, TC, ICTC) bei den *In-vitro*-Versuchen gebildet. Die Bildung der N-Desmethylderivate kann daher im Einklang mit der Literatur [39-41] durch enzymatische „*in vivo*“ Vorgänge (z.B. in der Leber der Hennen) erklärt werden.

## 7.2 Lagerstabilität von Tetracyclinen in lyophilisiertem Vollei

Bis zum jetzigen Zeitpunkt stehen für Tetracycline keine Referenzmaterialien zur Verfügung. Es sollte daher die Eignung von lyophilisierten Volleiprobe für die spätere Herstellung von Referenzmaterialien (RM) geprüft werden. Besondere Anforderungen [195] werden an die Stabilität und auch Homogenität dieser Materialien gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher in einer Lagerstudie (30 Monate) die Stabilität der Analyten und der Einfluß der Matrix auf die Analytik überprüft. Hierzu wurde entsprechend der Arbeitsvorschrift (Kap. 10.2) homogenisiertes und dotiertes Volleimaterial in 50 ml Greinerröhrchen gefüllt und gefriergetrocknet. Greinerröhrchen sind einfach an die Gefriertrocknungsanlage anzuschließen. Die Wahl des Füllgewichtes von ca. 15 g (genaues Gewicht wurde auf dem PE-Röhrchen mit einem Edding-Schreiber notiert), ergab sich aus der Trocknungskapazität der Gefriertrocknungsanlage, die den Inhalt von 12 Röhrchen gefüllt mit 15 g Volleimaterial in 22 Stunden trocknen konnte. Die lyophilisierten Volleiprobe wurden nochmal gewogen, um den Trocknungsgrad zu dokumentieren und bei Raumtemperatur in verschlossenen 50 ml PE-Röhrchen (Fa. Greiner, Solingen) in einem Unterschrank gelagert.

Die Dotierung erfolgte unter den Bedingungen wie sie auch in der Arbeitsvorschrift dokumentiert ist und zur Erstellung von Kalibriergeraden wiederholt durchgeführt wurde. Da zum Zeitpunkt Null der Lagerstudie nur die Muttersubstanzen zur Dotierung verwendet wurden, kann das gelagerte lyophilisierte Probenmaterial mit frisch dotierten Volleimaterial verglichen werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt dieses Lagerversuches, war die Frage, inwieweit qualitative Veränderungen d.h. eine Epimerisierung, Isomerisierung, N-Desmethylierung oder andere stoffliche Änderungen der zugesetzten Analyten eingetreten sind.

Die Ergebnisse sind in Tab. 56 zusammengefaßt.:

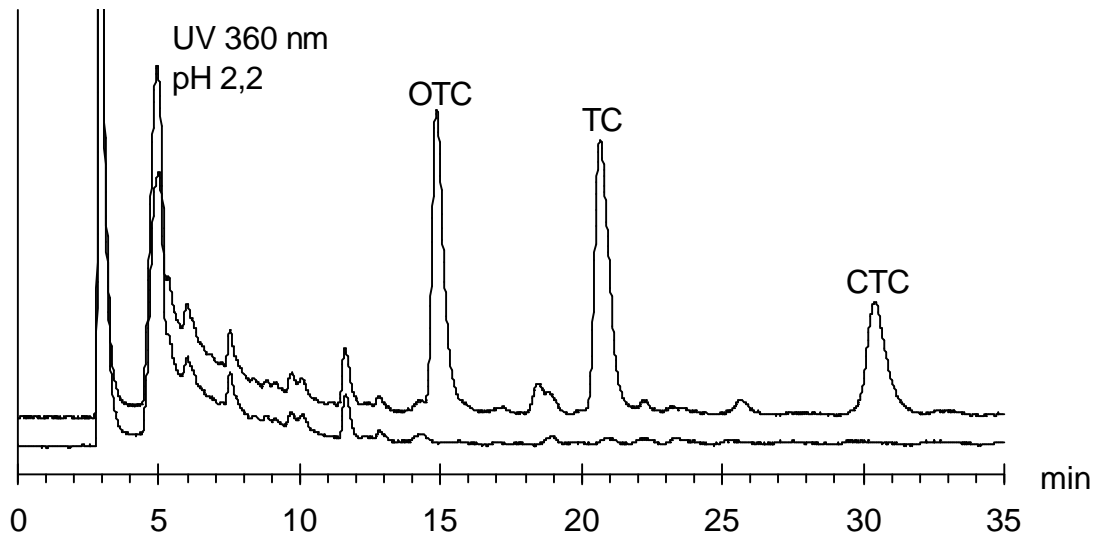
Analyt	Gehalt nach 30 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur*, Dotierung mit OTC, TC und CTC		
	n = 2		
	Dotierung 200 µg/kg	Dotierung 300 µg/kg	Dotierung 400 µg/kg
OTC	202 ± 10	306 ± 12	409 ± 16
e-OTC	< NG	< NG	< NG
e-TC	< BG	< BG	< BG
TC	183 ± 7	272 ± 11	371 ± 15
e-CTC	< BG	< BG	< BG
CTC	175 ± 8	275 ± 12	374 ± 15
e-ICTC	< NG	< NG	< NG
ICTC	< NG	< BG	< BG

\* Gehalt der gelagerten Volleiprobe bestimmt nach Kalibrierung mit frisch dotierten Volleiprobe

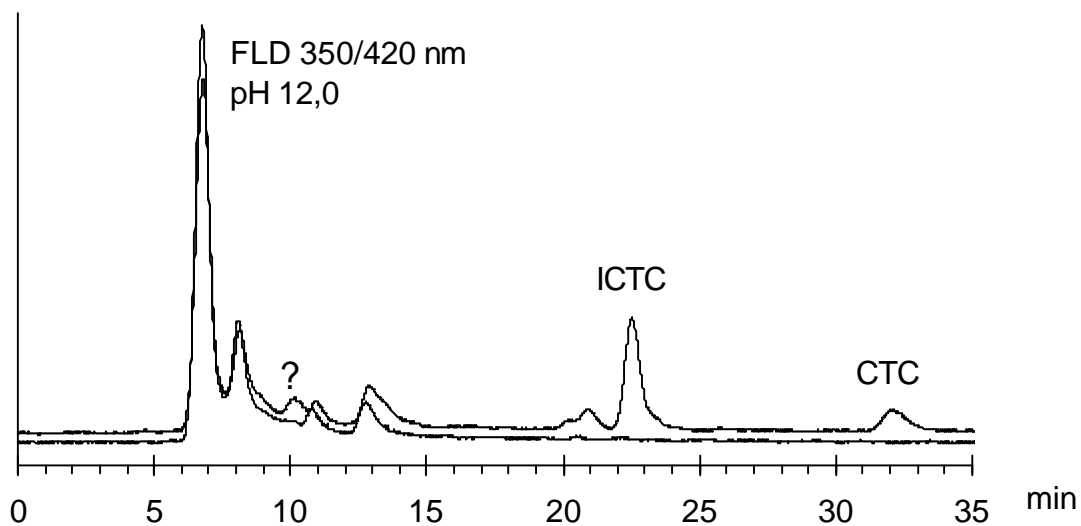
**Tab. 56: Gehalte der Tetracycline in lyophilisierten Volleiprobe nach einer 30 monatigen Lagerung bei Raumtemperatur in verschlossenen PE-Röhrchen. ( $\pm$  - Werte = Standardabweichung um den Mittelwert)**

In Abb. 71 und 72 sind Chromatogramme einer Blankprobe und einer Volleiprobe dotiert mit je 400 µg/kg OTC, TC und CTC übereinandergelegt. Die Detektion erfolgte bei UV 360 nm pH 2,2 und Fluoreszenz-Detektion 350/420 nm pH 12,0. In dem Fluoreszenz-Chromatogramm (Abb. 72) ist zu erkennen, daß eine geringe Menge an ICTC (4 % bezogen auf die Ausgangskonzentration) entstanden ist. Eine dotierte Volleiprobe, die 2 Monate eingefroren war, zeigte dagegen keine Bildung von ICTC. Es bleibt trotz dieses Vergleichs unklar, ob die geringe Menge an ICTC ausschließlich auf den Lagerungsvorgang zurückzuführen ist. Andere gleichzeitig wirkende Einflüsse wie die Dauer der Gefriertrocknung, der Restwassergehalt im lyophilisierten Volleimaterial, der pH-Wert bei der Rekonstitution mit Wasser und die Dauer der Lagerung könnten einen Beitrag zur Bildung des ICTC leisten.

Die Epimere von TC und CTC wurden nur zu einem geringen Anteil (< BG) gebildet. ITC oder IOTC wurden nicht gebildet. Die N-Desmethyl-derivate von OTC, TC und ICTC wurden ebenfalls nicht nachgewiesen. Die Untersuchungen zeigen auch, daß die analytische Methode und die chemische Stabilität der Tetracycline nicht dazu beitragen, Analyseergebnisse herbeizuführen, die irrtümlicherweise als *in vivo* Metabolismus interpretiert werden könnten.



**Abb. 71:** Chromatogramm einer dotierten lyophilisierten Volleiprobe.  
Die Dotierung war 400 µg/kg jeweils mit OTC, TC und CTC pro kg Vollei.



**Abb. 72:** Chromatogramm einer jeweils mit 400 µg/kg OTC, TC und CTC dotierten lyophilisierten Volleiprobe.

Aufgrund der äußerst geringen Bildung von Umwandlungsprodukten über einen 30 monatigen Lagerungszeitraum könnte man mit der neu entwickelten Methode Untersuchungen zur Gewinnung von Referenzmaterial als lyophilisiertes Volleimaterial mit gewachsenen Rückständen erfolgreich durchführen. Rechtliche Entwicklungen z.B. die Einbeziehung von ICTC und e-ICTC in dem EU-MRL-Wert sollten allerdings abgewartet werden.

## 8 Diskussion

Zur veterinärmedizinischen Behandlung von Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, sind Antibiotika u.a. auch Tetracycline zugelassen. Zum Schutz des Verbrauchers wurden für die Arzneimittel, die bei lebensmittelliefernden Tieren eingesetzt werden dürfen und die als Rückstände in den entsprechenden Lebensmitteln bestimmt werden können, von der EU-Kommission Rückstandshöchstmengen bezogen auf das jeweilige Arzneimittel und Lebensmittel festgesetzt [1].

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Rückstandsanalytik von Tetracyclin-Antibiotika in Hühnereiern. Es wurde ein HPLC-Verfahren entwickelt, welches erstmals Tetracyclin-Rückstände sowohl in Vollei- als auch in Eiklar- und Eigelbproben getrennt automatisiert bestimmen kann.

Dieses neue Verfahren wurde zur Analyse von Proben aus Medikationsstudien eingesetzt. Hierbei wurden neue Erkenntnisse zur Bildung der Metaboliten sowie ihrer Verteilung in Eigelb, Eiklar und Plasma gewonnen. Ferner wurde geprüft, inwieweit die Fluoreszenz der Eierschale, die nach Anregung mit langwelligem Licht bei Proben aus Medikationsstudien zu beobachten war, als Nachweis auf Tetracyclin-Rückstände bzw. für eine Einhaltung der Wartezeit nach Medikation geeignet ist.

### 8.1 Tetracyclin-Analytik mittels on-line Dialyse

Neuere Untersuchungen zeigten, daß neben den Tetracyclinen in biologischen Proben auch Epimere der drei Tetracycline OTC, TC und CTC [76], sowie das ICTC und e-ICTC als Hauptmetaboliten des CTC nachgewiesen wurden [58]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Im Gegensatz zu den bislang benutzten mikrobiologischen Verfahren können mit der hier dargestellten HPLC-Methode Aussagen zum Metabolismus von Tetracyclinen auch in Eigelb- und Eiklarproben gemacht werden. Bisher publizierte Rückstandsdaten, die mit HPLC-Verfahren bestimmt wurden, beschränken sich auf die Analyse von Volleiproben [21, 58, 75].

Bei den ersten Medikationsstudien wurden Substanzen gefunden, die vorläufig als N-Desmethylderivate des OTC, TC und des ICTC identifiziert worden sind. Mit verschiedenen Detektionsarten konnte gezeigt werden, daß einige Substanzen coeluierten bzw. unter gleichen chromatographischen Bedingungen eine nahezu identische Retentionszeit aufwiesen. Die Isoderivate des CTC coeluierten teilweise mit e-TC und TC, sowie das postulierte N-DM-TC mit e-OTC.

Um dieser Problematik zu begegnen, mußte man entweder das chromatographische Verfahren oder die Detektion selbst verändern. Bei pH 12 und 350/420 nm Fluoreszenz-Detektion lassen sich selektiv die Isotetracycline und bei pH 2,2, UV 360 nm nur die Tetracycline selektiv bestimmen. Beide Detektionsverfahren (zuerst UV-, dann Fluoreszenz-Detektion) können auch hintereinander durchgeführt werden, sofern der UV-Detektor eine durchstabile Meßzelle besitzt. Die Bestimmung von TC und e-TC bei UV360 nm pH 2,2 wurde durch coelulierendes ICTC und e-ICTC nicht beeinflusst.

Bei Eigelbproben war allerdings wegen der Coelution von e-OTC mit N-DM-TC eine analytische Bestimmung von e-OTC neben N-DM-TC mittels UV-Detektion nicht möglich. Dieses Problem kann aber in Zukunft durch eine massenspektroskopische Detektion, die auch sehr niedrige Konzentrationen erfassen kann, gelöst werden.

Die Kombination aus UV- und Fluoreszenz-Detektion wurde bislang in der Tetracyclinanalytik noch nicht beschrieben und bietet die Möglichkeit, ohne die kostenintensivere MS-MS-Detektion die Isotetracycline (IOTC, ITC, ICTC) neben den Tetracyclinen (OTC, TC, CTC) zu bestimmen. Bei analytischen Methoden zur Lebensmittelüberwachung sollte auch darauf geachtet werden, daß nicht nur die Muttersubstanzen, sondern auch die Epimere der drei Tetracycline sowie das ICTC und e-ICTC sicher nachgewiesen und bestimmt werden können. Die hier beschriebene Methode zeigt analytische Lösungen, die Metaboliten der drei Tetracycline mittels UV-, Fluoreszenz- oder MS-MS-Detektion zu erfassen.

Mit dem entwickelten Verfahren wurde mittels UV-Detektion je nach Analyt eine Nachweisgrenze von 11 bis 15 µg/kg und eine Bestimmungsgrenze von 34 bis 45 µg/kg bei der Matrix Vollei erreicht. Der EU-MRL-Wert für Vollei liegt bei 200 µg/kg jeweils für ein Tetracyclin (OTC, TC, CTC) und sein 4-Epimer. Berücksichtigt man, daß bei einer Epimerisierungsrate von 50 % bereits 100 µg/kg TC und 100 µg/kg e-TC in ihrer Summe den EU-MRL-Wert von 200 µg/kg ergeben, so liegt der analytisch relevante halbe EU-MRL-Wert bei einer 50 %-Epimerisierungsrate schon bereits bei 50 µg/kg für TC und e-TC. In Zukunft sollte also auch darauf geachtet werden, daß eine analytische Tetracyclin-Methode auch mit 50 µg/kg pro Analyt validiert wird.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Matrices Eiklar, Eigelb und Plasma existieren keine MRL-Werte. Die Dotierungen zur Aufstellung der Kalibriergeraden bei den verschiedenen Matrices orientierte sich daher an den Rückstandsgehalten in den unterschiedlichen Matrices. Aufgrund der höheren Verdünnung der Eigelbproben ist die Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei Eigelbproben etwas höher als die der anderen Matrices.

Die Regelkarten (Anhang 12.3) zeigen die Reproduzierbarkeit der Methode über einen längeren Zeitraum. Vergleichsanalysen mit dem externen Labor (DANI, Belfast) ergaben nahezu identische Resultate (Tab. 16, 17 und 18). Beim Vergleich von Analyseergebnissen unterschiedlicher Labors oder Methoden ist darauf zu achten, daß stets die Summe aus

Epimer und Muttersubstanz gebildet wird. Im Falle des CTC sollte stets die Summe aus CTC, e-CTC, ICTC und e-ICTC gebildet werden.

Die Wahl der großen Dialysezelle zeigte Vorteile und Nachteile. Durch die Wahl einer großen Dialysezelle konnte absolut eine besonders hohe Analytmenge angereichert werden, so daß die Kombination UV-Detektion und on-line Dialyse möglich wurde. Bei einer kleineren Dialysezelle und der Anwendung der UV-Detektion würde der halbe MRL-Wert von 50 µg/kg (jeweils für Muttersubstanz und 4-Epimer bei einer Epimerisierungsrate von 50 %) deutlich unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Eine größere Dialysezelle erfordert andererseits auch größere Volumina, die durch die Donor- und Akzeptorkammer gefördert werden. Aufgrund der empfindlichen Membran können bei den unterschiedlichen Dialysezellgrößen nur nahezu gleiche Volumenstromgeschwindigkeiten (Volumen pro Zeit) verwendet werden. Das Füllen einer größeren Dialysezelle nimmt daher mehr Zeit in Anspruch als das Füllen einer kleineren Dialysezelle.

Die Verwendung einer großen Dialysezelle hatte zwar den Vorteil, die UV-Detektion nutzen zu können, führte aber andererseits zu längeren Analysenzeiten pro Probe.

Zwischen den einzelnen Analysen wurde der Probenaufarbeitungsbereich automatisch (entsprechend der Programmierung Anhang 12.5) vom ASTED-System gereinigt. Hierdurch wurde auch erreicht, daß jede Analyse unter nahezu identischen Bedingungen verlief. Bei einem großem Dialysezellvolumen ergibt sich eine relativ lange Reinigungszeit. Die Reinigungszeit wurde durch den Einsatz einer zusätzlichen Spüllösung (mit Triton X-100) verringert. Der Einsatz der Spüllösung zur Reinigung der Akzeptorkammer ist außerdem notwendig, um mit-dialysierte Matrixbestandteile aus der Akzeptorkammer zu entfernen. Dazu wurde der Probenaufarbeitungsbereich modifiziert, indem ein zusätzliches vom ASTED-System ansteuerbares Niederdruckschaltventil zwischen Spüllösung und Akzeptorkammerlösung (Abb. 10) in das System integriert wurde. Sehr fett- und proteinhaltige Matrices wie Eigelb konnten analysiert werden, ohne eine vorhergehende Zentrifugation durchzuführen wie dies bei der Methode von van Leeuwen und Van Gend erforderlich war [150]. Um die Analyse von Eigelbproben zu ermöglichen, wurde auch die Probenverdünnung gegenüber den anderen Matrices (Vollei, Eiklar und Plasma) erhöht. Diese im Vergleich mit anderen on-line Dialyse-Verfahren [151, 153, 150] hohe Probenverdünnung von 25 g Eigelb pro 100 g Probelösung konnte verwirklicht werden, da durch die Wahl einer großen Dialysezelle auch eine ausreichend hohe Nachweis- und Bestimmungsgrenze erreicht werden konnte. Maxwell et al. [161] hingegen beschreiben, daß die Analyse von Ei-proben mit dem ASTED System nicht ohne vorhergehende off-line Probenaufarbeitung (Proteinfällung und Entfettung) möglich sei.



In der Praxis werden bei on-line Dialyse-Verfahren Wiederfindungen von maximal 60 % erreicht [158]. Die relativ geringe absolute Wiederfindung wird durch die hohe Präzision der automatisierten Probenaufarbeitung ausgeglichen. Die Kalibrierung kann ohne erheblichen Mehraufwand mit dotierten Proben durchgeführt werden. Dotierte Proben und Proben mit unbekanntem Rückstandsgehalt (Proben mit gewachsenen Rückständen) können so unter identischen Bedingungen analysiert werden.

## 8.2 Analytischer Nachweis des Metabolismus

### 8.2.1 Nachweis der Epimerisierung und Isomerisierung

Ein analytischer Nachweis der Epimere und der N-Desmethylderivate ist spektroskopischen Methoden vorbehalten und aufgrund der geringen Konzentrationen in den biologischen Proben zur Zeit nicht realisierbar. Um dennoch Hinweise für die Existenz einer *in vivo* Bildung der Epimere und der N-Desmethylderivate zu erhalten, wurden Futterproben, rückstandsfreie Matrix-Blankproben sowie dotierte Proben untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen und die Schlußfolgerungen daraus werden im folgenden zusammengefaßt :

Die Chromatogramme der Futterproben zeigten keine Peaks, die auf eine Anwesenheit der postulierten Metaboliten in den Futterproben schließen ließ.

Die Chromatogramme der Blankproben der Matrices Eigelb, Eiklar, Plasma zeigten keine Peaks zu den Retentionszeiten der Analyten.

Die Chromatogramme von dotierten Eigelb-, Eiklar- und Plasmaproben zeigten nur Peaks für die zugesetzten Substanzen, d.h. OTC, TC und CTC.

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich folgende Schlußfolgerungen :

Die analytische Methode trägt selber nicht zur Bildung der Epimere, der N-Desmethylderivate und des ICTC aus CTC bei. Die Epimere und die N-Desmethylderivate in Proben mit gewachsenen Rückständen waren deshalb keine analytischen Artefakte, sondern Rückstände, die auf die Medikation mit einem oder mehreren Wirkstoffen zurückzuführen waren.

Die Epimere traten in Eigelb- und Eiklarproben der Medikationsstudien stets in einem konstanten Verhältnis zur Muttersubstanz auf, unabhängig von den täglich sich ändernden absoluten Rückstandskonzentrationen. Auch dies deutet auf eine *in vivo* Bildung der Epimere und der N-Desmethylderivate hin.

Mittels Massenspektroskopie (MS-MS) und Standards wurde ferner die Anwesenheit der Epimere von TC, OTC, CTC und e-ICTC in biologischen Proben der Medikationsstudien überprüft und nachgewiesen.

Bei einem Versuch, bei dem mit TC, OTC und CTC dotierte Eigelb- und Eiklarproben bei 37°C 25 Stunden lang erwärmt wurden, bildeten sich aus den zwei Tetracyclinen TC und

CTC die zwei Epimere e-TC und e-CTC sowie das ICTC und das e-ICTC. Folglich können die Epimere von TC und CTC sowie ICTC und e-ICTC auf nicht-enzymatischem Wege gebildet werden. Die Bildung von e-OTC wurde in dem in-vitro Versuch nicht beobachtet, während man in Plasma- und in Eigelbproben das e-OTC bestimmen konnte.

In Eigelbproben mit gewachsenen Rückständen und in den Eierstock-Dottern (mit gewachsenen Rückständen) wurden nahezu gleiche Epimerisierungsraten bestimmt. Eine Epimerisierung erst im Ei selbst (d.h. genauer : im Eigelb) ist daher nicht wahrscheinlich.

Im Plasma liegt bereits ein relativ hoher Anteil an Epimeren von 35-45 % vor. Diese Epimerisierungsrate wird nur nach Einlagerung in das Eidotter größer. Die Tatsache, daß die Epimerisierungsrate im Eiklar geringer war als in Plasmaproben, stellt ein unerwartetes Ergebnis dar. Es liegen keine Versuchsergebnisse vor, die die Gemeinsamkeiten von Plasma- und Eigelbproben (gleiche Metaboliten und relativ hohe Epimerisierungsraten), sowie die Unterschiede zwischen Plasma- und Eiklarproben schlüssig erklären können. Eine wichtige Gemeinsamkeit von Plasma- und Eigelb ist allerdings der Literatur [66, 67] zu entnehmen und besteht darin, daß die Proteine des Eigelbs in der Leber der Henne gebildet werden und über das die Blutbahn in die Eigelbe des Eierstocks eingelagert werden, während im Unterschied dazu die Proteine des Eiklars im Eileiter gebildet werden [66, 67].

Die Bildung der Epimere von TC, CTC und des ICTC kann wahrscheinlich auf chemischen Wege erfolgen und ist pH, Zeit- und Temperaturabhängig. Einen Einfluß von metabolisierenden Enzymen kann hierbei allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Epimere als Metaboliten bezeichnet. Die Epimere (von TC, CTC, ICTC) und das ICTC können als Umwandlungsprodukte und als Metaboliten bezeichnet werden, da sie *in vivo* und *in vitro* gebildet werden können. Ein Ergebnis des Vergleichs der in-vitro und in vivo Ergebnisse ist auch die Diskussionsfrage, ob man Stoffe, die man in einem in vitro Versuch erzeugen kann, als Metaboliten bezeichnen kann bzw. bezeichnen sollte.

Eine Ausnahme ist e-OTC. Nach 25-stündigem Erwärmen einer dotierten Probe bei 37°C konnte es nicht nachgewiesen werden. Hingegen wurde es massenspektroskopisch in Eigelbproben mit gewachsenen Rückständen nachgewiesen. Plasmaproben enthielten ebenfalls neben OTC das e-OTC. Dies kann auf eine enzymatische Bildung von e-OTC im Organismus der Henne hindeuten oder die Bildung von e-OTC erfordert eine höhere Temperatur, wie man sie z.B. in der Leber der Henne (bis 42°C) vermuten könnte.

Eine Tetracyclanalytik sollte – wie die in-vitro Versuche zeigten - in der Lage sein, alle Umwandlungsprodukte der Tetracycline zu bestimmen, insbesondere dann, wenn, wie im Falle des CTC, die Bildung von ICTC ein irreversibler Vorgang ist. Es empfiehlt sich daher, die Rückstände des CTC und des e-CTC nach einer Alkali-Behandlung analytisch mit evtl.

bereits vor der Alkali-Behandlung anwesenden ICTC und e-ICTC als ICTC und e-ICTC zu bestimmen. Diese analytische Vorgehensweise wurde bereits von Blanchflower et al. [170] realisiert.

Im Falle des OTC und TC empfiehlt es sich, wie bereits vom Gesetzgeber vorgeschrieben, stets die Summe von 4-Epimer und Muttersubstanz zu bestimmen, da je nach gewählter Probenaufarbeitung eine Epimerisierung nicht ausgeschlossen werden kann.

### 8.2.2 Nachweis der N-Desmethylierung

Mittels Massenspektroskopie konnte ermittelt werden, daß ein um die Masse 14 verringerter Metabolit des TC und ICTC gebildet wird. Da diese Substanzen eine andere Retentionszeit besitzen als die jeweilige Muttersubstanz handelt es sich um Substanzen, die als Rückstand in der Probe vorliegen. Die Metaboliten der drei Tetracycline in Eigelb- und Plasmaproben wurden vorläufig aufgrund ihres UV- bzw. Fluoreszenz-Verhaltens als N-DM-OTC, N-DM-TC bzw. N-DM-ICTC bezeichnet. Nach 25-stündiger Erwärmung von dotierten Eigelb- und Eiklarproben auf 37°C bildeten sich keine N-Desmethyl-Derivate des OTC, TC und ICTC. Folglich werden die N-Desmethyl-derivate *in vivo* d.h. im Organismus der Henne gebildet.

Die N-Desmethyl-derivate des TC, OTC und ICTC stehen stets in einem konstanten Verhältnis zur Summe aller Rückstände, die auf die Medikation mit der Muttersubstanz zurückzuführen sind. Aufgrund dieser konstanten Verhältnisse kann die Existenz eines enzymatischen Reaktionsweges postuliert werden. Dies wurde im Falle des Doxycyclins in der Literatur [39, 40, 41] beschrieben. Die entsprechenden metabolisierenden microsomalen Enzyme befinden sich in Leberzellen [44]. Die Leber wird als Bildungsort der N-Desmethyl-derivate im Organismus vermutet [39, 40, 41, 44].

Wegen des konstanten Verhältnis zur Summe aller Rückstände ist eine gesonderte Berücksichtigung der N-Desmethyl-derivate bei Eigelbproben nicht unbedingt nötig. Es muß allerdings nicht bei allen Matrices ein konstantes oder ein gleiches Verhältnis der N-Desmethyl-derivate zu der Summe aller Rückstände, die auf die Medikation mit der Muttersubstanz zurückzuführen sind, existieren, wie man es bei Eigelbproben ermitteln konnte.

### 8.2.3 Ermittlung weiterer Metaboliten

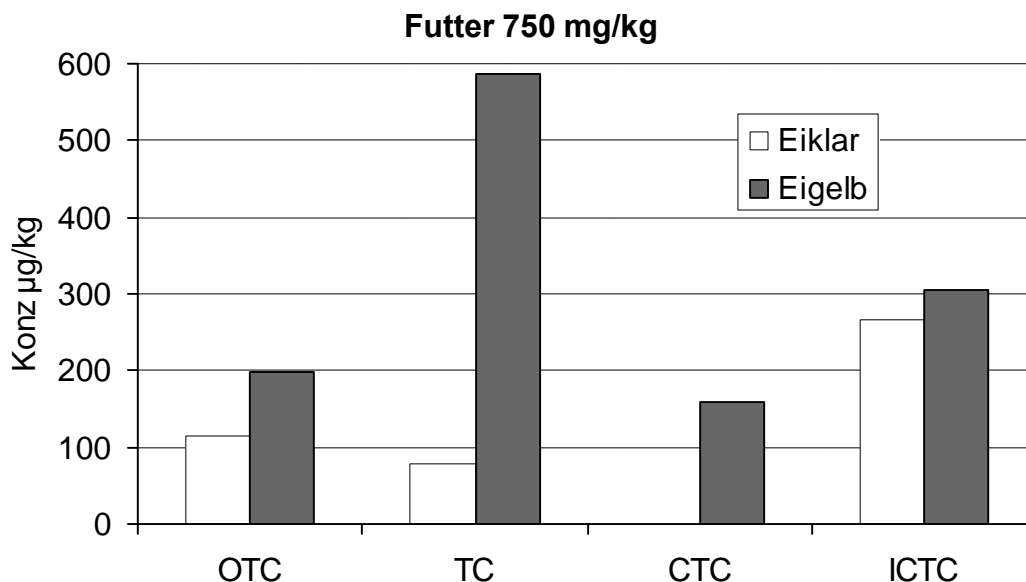
In Eiklarproben konnten neben den ermittelten Metaboliten Epimer, N-Desmethyl-derivat, ICTC und e-ICTC ein weiterer, bislang nicht identifizierter Metabolit des OTC, TC und CTC ermittelt werden. Die Anwesenheit weiterer Minor-Metaboliten, die im Rahmen dieser Arbeit

unerkannt blieben, kann nicht absolut ausgeschlossen werden. Diese können insbesondere aufgrund der beobachteten Instabilität von ICTC postuliert werden.

Die bereits von Blanchflower et al. [176] und [18, 19] beschriebene Keto-Enol-Tautomerie wurde bei allen Untersuchungen nicht beobachtet. Auch eine chromatographische Trennung der Keto-Enol-Tautomere als zusätzliche Peaks in den Chromatogrammen wurde nicht beobachtet. Inwieweit mit der in dieser Arbeit verwendeten RP-8 Säule die Keto-Enol-Tautomere von einander getrennt werden können, wurde allerdings auch nicht untersucht, da die tautomeren Formen bereits nach relativ kurzer Zeit von 1 bis 2 Stunden bei 20°C im Gleichgewicht stehen [18, 19]. Die verdünnten Eiprüben haben bis zu 24 Stunden bei 4°C im Autosamplerrack auf ihre Analyse gewartet, ohne daß sich hierdurch das Analysenergebnis für Proben, die nur mit der Muttersubstanz dotiert waren, änderte.

### 8.3 Vergleich der Rückstände von Eigelb, Eiklar und Vollei

Die drei Tetracycline OTC, TC und CTC unterscheiden sich in ihrem Rückstandsverhalten in Eigelb- und Eiklarproben deutlich. Die Konzentrationen an Tetracyclinen waren bei Eigelbproben deutlich höher als im Eiklarproben (Abb. 73, Tab. 55). Die Ergebnisse stimmen mit der Literatur [90, 91] überein.



**Abb. 73:** Vergleich der Verteilung der Rückstände auf Eiklar und Eigelb nach Medikation mit 750 mg/kg OTC oder TC oder CTC im Futter. Die Grafik beruht auf Mittelwerte der Medikationsversuche 3, 5, 6 und 7. (Tab. 25, 27, 29, 34, 36 und 39)

	<b>S(OTC + e-OTC)</b>	<b>S(TC + e-TC)</b>	<b>S(CTC + e-CTC)</b>	<b>S(ICTC + e-ICTC)</b>
<b>Eigelb</b>	197	588	158	306
<b>Eiklar</b>	114	78	< NG	266

*Tab.: 55 : Rückstandsdaten in µg/kg zu Abb. 73*

Die Rückstandsgehalte nehmen bei gleicher Medikation (gleicher Wirkstoffkonzentration mg/kg Futter) in Volleiern in der Reihenfolge von  $\Sigma(\text{OTC} + \text{e-OTC}) < \Sigma(\text{TC} + \text{e-TC}) < \Sigma(\text{CTC}, \text{e-CTC}, \text{ICTC}, \text{e-ICTC})$  zu. Die Rückstandskonzentrationen im Eigelb nehmen absolut zu oder nähern sich nur langsam einem Plateau-Wert an, während die Rückstandskonzentrationen im Eiklar schnell ein konstantes Niveau erreichen (Abb. 38, 40 und 42). Die Rückstände von OTC, TC, CTC und ICTC in Eigelbproben weisen eine größere Epimerisierungsrate auf als im Eiklar. OTC und ICTC bilden auch relativ hohe Rückstände im Eiklar, hingegen traten TC und CTC überwiegend im Eigelb auf (Abb. 73). Bei Volleiproben werden durch das Eiklar die Rückstandsgehalte überwiegend nur verdünnt, so daß sich bei TC und CTC in Vollei das Verhältnis Epimer zu Muttersubstanz nicht deutlich vom Verhältnis in Eigelbproben unterscheidet (Tab. 44). Für analytische Zwecke sind folglich wegen der höheren Rückstandskonzentrationen (von OTC, TC, CTC, ICTC) Eigelbproben gegenüber Volleiproben zu bevorzugen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Plasmaproben zeigen, daß man im Plasma neben den Muttersubstanzen auch 4-Epimere, N-Desmethylderivate und das ICTC als Metabolit des CTC nachweisen kann. Bei zukünftigen pharmakokinetischen Studien zur Elimination sollte daher auf die Anwesenheit von ICTC und e-ICTC geprüft werden.

## 8.4 Rückstände in der Eischale

Die individuellen Schwankungen der Plasmakonzentrationen von Henne zu Henne lassen sich mit der bereits in der Literatur [72, 73] gemachten Beobachtung erklären, daß Anteile der Tetracycline in die Eischale eingelagert werden. Bei besonders niedrigen Rückstandskonzentrationen im Plasma wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme wahrscheinlich gerade die Eischale gebildet.

Die Ablagerung von Tetracyclinen im Knochengewebe von Tieren [74, 196, 197, 198, 199] ist weithin bekannt und beschrieben worden. Die Tetracycline sind Chelatbildner und bilden hierbei mit den Calciumionen im Knochengewebe einen antibakteriell inaktiven Calcium-Tetracyclin-Chelatkomplex, der nach Anregung mit langwelligem UV-Licht fluoresziert [198]. Nach der Medikation mit einem Futter mit der Konzentration 3000 µg/kg OTC wurde

bei Tageslicht keine Verfärbung der Eierschale beobachtet, während mittels langwelligem UV-Licht eine deutliche Fluoreszenz beobachtet wurde. Dies steht mit der Literatur [72, 73] im Einklang.

Mit Hilfe einer UV-Lampe (Anregung mit langwelligen UV-Licht) kann man Eier, die aus Medikationsstudien mit den drei Tetracyclinen stammen, identifizieren. Die Fluoreszenz läßt allerdings keinen Rückschluß auf die Rückstandskonzentrationen im Eiinhalt zu. Der Nachweis einer fluoreszierenden Eischale in Eiern des Handels zeigt allerdings, daß die gesetzlich vorgeschriebene Wartezeit nicht eingehalten wurde.

## 8.5 Ausblick auf zukünftige Studien

Es stellt sich die Frage, inwieweit den Metaboliten der Tetracycline eine toxikologische Bedeutung zu kommt. Auch Kennedy et al. [58] haben für das ICTC und e-ICTC und Böcker [39] für das N-Desmethyl-Doxycyclin diese Frage unbeantwortet zur Diskussion gestellt.

Auch aus der vorliegenden Arbeit läßt sich keine toxikologische Relevanz der Metaboliten von OTC, TC und CTC ableiten. Diese Arbeit läßt aber den Schluß zu, daß auch bei früheren Medikationsstudien mit den drei Tetracyclinen, die im Zusammenhang mit der Zulassung der drei Tetracycline für Legehennen durchgeführt wurden, es sicherlich auch zur Bildung dieser Metaboliten (wie z.B. ICTC) gekommen sein müßte. Eine erneute toxikologische Bewertung dieser Medikationsstudien mit Blick auf die Ergebnisse dieser Arbeit wird daher sicherlich nicht zu einer toxikologischen Neubewertung der Tetracycline führen, die sich von der bisherigen Bewertung der Tetracycline unterscheidet.

Bei Zulassungen von Arzneimitteln für Tiere, die der Gewinnung von Lebensmittel dienen, sind gemäß § 23 Abs. 1 Nr. 1 AMG unter anderem auch Untersuchungen zur Bildung von Umwandlungsprodukten des Wirkstoffes und deren Verbleib anzuführen. Diese Untersuchungen dienen zur Beurteilung von Wartezeiten unter der Berücksichtigung festgesetzter Höchstmengen. Im folgenden bleibt abzuwarten, ob die hier vorgestellten Ergebnisse - insbesondere die Isomerisierung von CTC zu ICTC - dazuführen, die Zielanalyten zu überdenken, für die EU-MRL-Werte festgesetzt sind. Nach einer eventuellen Änderung oder Ergänzung der entsprechenden Zielanalyten kann die hier beschriebene HPLC-Methode analytische Lösungen für künftige Methoden aufzeigen, die den dann geänderten Anforderungen gerecht werden wollen.

Es sei auch darauf hingewiesen, daß das Doxycyclin mit Ausnahme von Legehennen auch bei einer Vielzahl von lebensmittelliefernden Tieren eingesetzt werden darf. Es ist daher

wahrscheinlich, daß auch ein N-Desmethylderivat des Doxycyclins von lebensmittel-liefernden Tieren in zur Zeit noch unbekanntem Umfang gebildet wird.

Die in-vitro-Studien zeigten auch, daß es sinnvoll sein kann, dotierte Matrix für bestimmte Zeiträume auf 37°C zu erwärmen. Durch diese Studien konnte das chromatographische Bild der Proben, die aus Medikationsstudien stammten, gut simuliert werden. Für zukünftige Methodenentwicklungen scheint es daher auch sinnvoll zu sein, entsprechende in-vitro Studien durchzuführen bevor Medikationsversuche mit Tieren geplant und durchgeführt werden. Hierbei kann die Praxis-Tauglichkeit einer Methode im Vorfeld getestet werden. Die unerwartete Bildung der N-Desmethylderivate sowie die Verteilung der Tetracycline im Eigelb und Eiklar zeigten andererseits auch, daß Medikationsstudien mit Tieren sinnvoll sind.

## 9 Zusammenfassung

Der Einsatz von Tetracyclinen in der Veterinärmedizin ist weit verbreitet. Die drei Tetracycline OTC, TC und CTC zählen zu der kleinen Gruppe der Antibiotika, die zur Behandlung von Legehennen in der Europäischen Gemeinschaft zugelassen sind. Mit dem Einsatz von Tetracyclinen bei der Geflügelhaltung kann daher gerechnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung, Validierung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit on-line Dialyse und mit on-line gekoppelter Festphasenextraktion zur simultanen Bestimmung von Tetracyclinen und ihrer Metaboliten in Vollei-, Eiklar-, Eigelb- und Plasmaproben beschrieben. Die wesentlichen Vorteile bestehen in der Multianalyse mehrerer Rückstände, die auf die Medikation mit einem der drei Tetracycline zurückzuführen sind, und der automatisierten Arbeitsweise, die eine sehr hohe Präzision ermöglichte. Als ein weiterer wichtiger Vorteil der Methode stellte sich auch heraus, daß das analytische Verfahren nicht zur Bildung der Epimeren von OTC, TC, CTC und ICTC, sowie zur Bildung von ICTC aus CTC beitrug. Das homogenisierte Probenmaterial wurde mit einem Citratpuffer auf pH 6,0 stabilisiert und verdünnt. Diese Probelösungen wurden mit einem automatisierten System mit einer sehr hohen Präzision und Richtigkeit bestimmt, wie mittels der Analyse verdeckter Proben und durch eine Vergleichsuntersuchung in einem externen Labor gezeigt wurde. Die verdünnten Proben wurden dialysiert und das erhaltene Dialysat an einer Festphasenkartusche angereichert. Nach diesem Anreicherungsschritt fand der Analyttransfer auf die analytische Säule statt und die Analyten wurden chromatographisch getrennt. Im Anschluß wurden die Analyten mit verschiedenen Detektionssystemen detektiert. Als Standarddetektionsarten zur Detektion der Tetracycline, sowie des N-DM-OTC und des N-DM-TC wurde die UV-Detektion bei 360 nm pH 2,2 gewählt. Zur Detektion der Isotetracycline wurde die für das ICTC optimierte Fluoreszenz-Detektion bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm und pH 12,0 gewählt. Die UV-Detektion und die Fluoreszenz-Detektion wurden validiert. Die mit dieser Methode erzielten absoluten Wiederfindungen betragen für die vier Hauptanalyten 51 bis 55 % für die vier Matrices Vollei, Eiklar, Eigelb und Plasma. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 11 und 20 µg/kg und die Bestimmungsgrenzen zwischen 31 und 59 µg/kg je nach Matrix. Hierbei genügte die Analytik der Matrix Vollei der Anforderung, auch bei einer Epimerisierungsrate von 50 % den halben MRL-Wert sicher quantifizieren zu können.

Durch Vergleichsuntersuchungen (bei gleicher Probenaufarbeitung) mit matrixfreien Standardlösungen errechnete sich eine relative Wiederfindung zwischen 95 % und 100 %. Die Matrix selbst behindert daher nicht die Extraktion der Tetracycline. Die vielfach für Tetracycline in der Literatur beschriebenen Analyt-Protein-Bindungen wurden durch die



Verwendung eines 0,3 molaren Citratpuffers und einer entsprechenden Verdünnung gespalten. Die Analyt-Protein-Spaltung kann mit einer Verschiebung des Gleichgewichts der reversiblen Analyt-Proteinbindung zugunsten des freien Analyten erklärt werden. Um den Matrixeinfluß auf die Wiederfindung zurückzudrängen, mußten die eiweiß- und fettreicheren Eigelbproben stärker verdünnt werden als die anderen Matrices.

Auf dem Versuchsgut des BgVV in Berlin wurden mehrere Medikationsstudien mit den drei Tetracyclinen bei Legehennen durchgeführt. Die Medikation der Hühner erfolgte mit einem Medizinalfutter, welches je nach Studie unterschiedliche Tetracycline in unterschiedlicher Konzentration enthielt. Die Eier- und die Plasmaproben wurden in Wuppertal analysiert.

Die zusätzlichen in den Chromatogrammen von gewachsenen Proben erhaltenden Peaks wurden aufgrund von MS-MS-Chromatogrammen und UV-Spektren bei pH 2,2 und pH 12,0 Metaboliten zugeordnet, die auf die Medikation mit einem bestimmten Tetracyclin (OTC, TC oder CTC) zurückzuführen waren.

Aufgrund von MS-MS Untersuchungen, Retentionszeiten (sofern Standards verfügbar waren), der UV-Spektren und einer selektiven Fluoreszenz-Detektion wurden die drei Tetracycline und ihre Epimere, die N-Desmethylderivate von TC und OTC, sowie die Isoderivate des CTC (das ICTC, e-ICTC und sein N-DM-ICTC) in gewachsenen Proben nachgewiesen. Die Epimerisierung der drei Tetracycline (ca. 50 % aller Rückstände des TC lagen als Epimer vor) wurde bei Eiern mit gewachsenen Rückständen bislang in der Tetracyclin-Literatur nicht beschrieben. Die Epimerisierung von OTC in gewachsenen Proben wurde in dieser Arbeit erstmalig mittels MS-MS und Standards nachgewiesen. Damit war die bisherige Annahme widerlegt, daß die Hydroxygruppe am C-5 Atom beim OTC eine Epimerisierung verhindert. Die N-Desmethyl-Derivate des OTC, TC und des N-DM-ICTC wurden als Metaboliten der drei Tetracycline erstmalig beschrieben. Durch *in vitro* Versuche wurde gezeigt, daß die N-Desmethylderivate nicht chemische Reaktionsprodukte der Tetracycline darstellen, sondern wahrscheinlich auf enzymatischen Weg gebildet werden. Die Epimerisierung kann dagegen mit einer chemischen Reaktion, die bei 37°C schnell das Gleichgewicht erreicht, erklärt werden, wobei allerdings im Falle des OTC auch enzymatische Vorgänge oder andere physiologische Bedingungen - z.B. höhere Temperatur (Leber 42°C) - nicht ausgeschlossen werden können.

In Eiklarproben wurden abweichend von Eigelbproben weitere noch unbekannte Analyten, insbesondere des OTC gefunden.

Auf die Anwesenheit von Phase-II-Metaboliten, insbesondere von Konjugaten mit Gluronsäure oder Schwefelsäure wurde durch Differenzbestimmung (vor und nach Hydrolyse) indirekt geprüft. Es wurden mit dieser indirekten Methode keine Hinweise auf Konjugate erhalten.

Für die Matrices Eiklar und Eigelb wurden für die drei Tetracycline und ICTC eine jeweils im zeitlichen Verlauf konstante, aber je nach Analyt unterschiedliche Epimerisierungsrate ermittelt. Für CTC wurde in der Regel ein Anteil an 4-Epimer (bezogen auf die Summe von 4-Epimer und Muttersubstanz) von 43 % in Eigelb und unter 5 % in Eiklar, für TC von 48 % in Eigelb und 25 % in Eiklar, für OTC von 23 % in Eigelb und unter 5 % in Eiklar. Der Hauptmetabolit des CTC, das ICTC liegt in der Regel im Eigelb zu 55 % als Epimer und im Eiklar zu 22 % als Epimer vor.

Eine schlüssige Erklärung für die unterschiedlichen Epimerisierungsraten je nach Tetracyclin und Matrix kann diese Arbeit nicht geben. Den Ergebnissen ist aber zu entnehmen, daß die Einstellung einer bestimmten Epimerisierungsrate durch die Faktoren Zeit, Matrix, pH-Wert und Temperatur beeinflußt wird. Eine höhere Temperatur, eine längere Reaktionszeit und ein saurer pH-Wert scheinen die Epimerisierungsraten zu erhöhen. Warum im Plasma höhere Epimerisierungsraten (von OTC, TC, ICTC) als in Eiklarproben beobachtet wurden, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht schlüssig beantwortet werden.

Die N-Desmethyl-derivate wurden nur im Eigelb-, Vollei- und Plasmaproben nachgewiesen, mit den höchsten Konzentrationen in Eigelbproben und mit im zeitlichen Verlauf konstanten N-Desmethylierungsraten : 8 % für N-DM-OTC, 19 % für N-DM-TC und 9 % für N-DM-ICTC jeweils bezogen auf die Summe aller Rückstände, die auf die Medikation mit der Muttersubstanz zurückzuführen waren.

Bei Plasmaproben wurde nach Medikation mit CTC *in vivo* gebildetes N-DM-ICTC, ICTC und e-ICTC bestimmt. Hierbei lagen die Rückstände nach Medikation mit CTC in der Regel zu einem Drittel als ICTC und e-ICTC und zu zwei Dritteln als CTC und e-CTC vor. Die Konzentration an N-DM-ICTC lag bei vielen Plasmaproben unterhalb der Bestimmungsgrenze. Bei zukünftigen Plasmaanalysen, die die Elimination von CTC beschreiben sollen, sollte auch auf ICTC und e-ICTC geprüft werden.

Ebenfalls in den Chromatogrammen von Plasmaproben waren bei UV-Detektion 360 nm pH 2,2 die N-Desmethylmetaboliten des OTC und TC zu sehen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Annahme unterstützt, daß die N-Desmethylierung durch ribosomale Enzyme in der Leber der Henne erfolgt und zusammen mit den Eigelbproteinen in die sich entwickelnden Eigelbe des Eierstocks eingelagert werden.

Die Eischale zeigte während der Medikationsstudien nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht eine deutliche Fluoreszenz. Durch Medikationsstudien wurde gezeigt, daß die Intensität der Fluoreszenz nach Medikation mit CTC intensiver war als bei Medikationsstudien mit TC oder OTC. Auch die im Medikationsversuch applizierte Wirkstoffkonzentration hatte einen Einfluß auf die Intensität der Fluoreszenz. Je höher die Wirkstoffkonzentration, desto höher war auch die Fluoreszenzintensität. Nur während der Medikation war die Eischale fluoreszierend, nach Medikationsende war dies nicht mehr der

Fall. Aus dieser Beobachtung kann für die amtliche Überwachung die Folgerung gezogen werden, daß bei fluoreszierenden Eiern aus dem Handel die Wartezeit nicht eingehalten wurde. Allerdings kann bei Eiern mit fluoreszierenden Eischalen der EU-MRL-Wert, der sich auf den eßbaren Anteil bezieht, noch nicht überschritten sein und andererseits bei nicht-fluoreszierenden Eiern, der Grenzwert im Vollei deutlich überschritten werden. Durch den Nachweis der Eischalenfluoreszenz kann eine instrumentell-analytische Rückstandsanalytik zur Bestimmung von Tetracyclinen nicht ersetzt werden.

Zur Kontrolle der These vom *in vivo* Metabolismus der drei Tetracycline (OTC, TC, CTC) wurden Eidotter aus dem Eierstock von drei geschlachteten Hennen entnommen und analysiert. Die Eidotter zeigten die gleichen Epimerisierungsraten der drei Tetracycline, wie sie bereits vorher in den gelegten Eiern derselben Hennen bestimmt worden waren. Es wurden auch alle Metaboliten nachgewiesen, die in den Dottern frisch gelegter Eier zu finden waren. Die Ergebnisse der Dotterproben aus dem Eierstock widersprechen nicht der These, daß ein *in vivo* Metabolismus der Tetracycline vorliegt.

Zur Kontrolle der These vom *in vivo* Metabolismus wurde auch das Hühnerfutter auf die Existenz möglicher Umwandlungsprodukte untersucht. Die erhaltenen Chromatogramme der Futteranalysen wurden qualitativ auf die Anwesenheit möglicher Umwandlungsprodukte geprüft. Da weder bei dotierten Matrixproben noch bei Futterproben keine Umwandlungsprodukte nachgewiesen wurden, wurde die These vom *in vivo* Metabolismus der Tetracycline unterstützt.

In einem Lagerversuch, der über den Zeitraum von 30 Monaten durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, daß die Tetracycline recht stabile Analyten darstellen und daß die entwickelte Methode in der Lage ist, auch lyophilisierte Volleipproben auf Tetracyclin-Rückstände analysieren zu können. Auch diese Untersuchungen zeigten, daß die analytische Methode nicht dazu beiträgt, analytische Artefakte zu bilden, die fälschlicherweise als *in vivo* Metabolismus interpretiert werden könnten.

## 10 Arbeitsvorschriften

### 10.1 Chemikalien und Hilfsmittel

#### 10.1.1 Allgemeine Chemikalien

Acetonitril (technisch, destilliert über  $K_2CO_3$ )  
Citronensäure – Monohydrat (Merck)  
Dinatriumhydrogenphosphat (Merck)  
Glycin (Sigma Aldrich)  
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)  
Natriumchlorid (Merck)  
Natriumhydroxid, Plätzchen (Merck)  
Methanol, technisch, destilliert über KOH  
Oxalsäure - Dihydrat (Merck)  
Triton-X-100 [Alkylphenylpolyethylenglykol] (Sigma Aldrich)  
Tridest Wasser = bidestilliertes VE-Wasser, zusätzlich destilliert über  $KMnO_4$

#### 10.1.2 Lösungen und Puffer

Probenverdünnungslösung : Citratpuffer

Herstellen der Probenverdünnungslösung :

63,05 g Citronensäure-Monohydrat in 500 ml tridest. Wasser lösen, danach 250 ml NaOH  $c = 3,0$  mol/l zugeben und schütteln. Den pH-Wert mit 3,0 mol/l NaOH-Lösung auf pH = 5,7 bis 5,8 einstellen. Anschließend mit tridest. Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Dilutor 0-Lösung : Phosphatpuffer  $c = 0,06$  mol/l, pH = 5,9 bis 6 bestehend aus :

Lösung A : 21,488 g/l  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$

Lösung B : 16,33 g/2l  $KH_2PO_4$

Mischung : 90 Lösung A + 10 Lösung B, v + v

Zusatz zur Mischung : Triton-X-100  $c = 1$  g/l

Akzeptorkammerlösung : 0,06 mol/l Citratpuffer bei pH = 5,85

Herstellen der Akzeptorkammerlösung :

12,61 g Citronensäure-Monohydrat in 500 ml tridest. Wasser lösen und 250 ml NaOH  $c = 0,6$  mol/l zugeben und schütteln. Den pH-Wert mit 0,06 mol/l NaOH-Lösung auf pH = 5,85 einstellen und mit tridest. Wasser auf 1 Liter einfüllen.

Spüllösung : Phosphatpuffer  $c = 0,3$  mol/l, pH = 5,9 bestehend aus :

Lösung A : 107,44 g/l  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$

Lösung B : 81,65 g/2l  $KH_2PO_4$

Mischung : 90 Lösung A + 10 Lösung B, v + v

Zur Mischung werden 13 g/l Triton X-100 gegeben

HPLC-Fließmittel I: Acetonitril, Oxalsäure  $c = 0,01$  mol/l, 50 + 50, v/v

HPLC-Fließmittel II: Acetonitril, Oxalsäure  $c = 0,005$  mol/l, 50 + 50, v/v

HPLC-Fließmittel für MS-MS: Acetonitril, Ameisensäure  $c = 5$  g/l, 40 + 60, v/v

Reinigung von Donor- und Akzeptorkammer off-line : Glycinpuffer bei pH = 10

$c = 0,15 \text{ mol/l}$

bestehend aus A : NaCl  $c = 8,76 \text{ g/l}$  Glycin  $c = 11,26 \text{ g/l}$  und B : NaOH =  $0,15 \text{ mol/l}$

Mischung : A + B, 60 + 40, v + v

Nachsäulenlösung für Fluoreszenz-Detektion :  $0,4 \text{ mol/l}$  Natronlauge-Glycin-Lösung :

Glycin  $30 \text{ g/l}$  ( $c = 0,4 \text{ mol/l}$ ) und  $60 \text{ g}$  Natriumhydroxidplättchen,

ggf. mit gesättigter NaOH-Lösung auf pH =  $12,0$  einstellen

Alle Lösungen sind im Kühlschrank bei  $4-6^\circ\text{C}$  zu lagern. Pufferlösungen, die länger als 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen, sind zu verwerfen.

### 10.1.3 Standardsubstanzen und Stammlösungen

#### Standardsubstanzen

Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma Aldrich
4-Epi-Tetracyclin-Hydrochlorid	Acros Organics, Schwerte
Oxytetracyclin-Hydrochlorid	Sigma Aldrich
Chlortetracyclin-Hydrochlorid	Sigma Aldrich
4-Epi-Chlortetracyclin-Hydrochlorid	Acros Organics, Schwerte
Isochlortetracyclin	Acros Organics, Schwerte
Anhydrotetracyclin	Acros Organics, Schwerte
4-epi-Anhydrotetracyclin	Acros Organics, Schwerte
Anhydrochlortetracyclin	Acros Organics, Schwerte
4-epi-Anhydrochlortetracyclin	Acros Organics, Schwerte
$\alpha$ - apo-Oxytetracyclin	Acros Organics, Schwerte
$\beta$ -apo-Oxytetracyclin	Acros Organics, Schwerte

#### Stammlösungen

Von jeder der Standardsubstanzen wird soviel eingewogen, daß  $1 \text{ ml}$  Wasser  $1 \text{ mg}$  freies Tetracyclin (bzw. Iso- oder Anhydrotetracyclin) enthält. Die Umrechnung des Hydrochlorids in freies Tetracyclin erfolgte unter Berücksichtigung der Reinheitsangaben des Herstellers. (Stammlösung  $\rho = 1 \text{ mg/ml}$  Massenkonzentration). Für die Erstellung von Kalibriergeraden wurden die vier Standardsubstanzen (OTC, TC, CTC und ICTC) getrennt eingewogen und in  $0,01 \text{ mol/l}$  Oxalsäurelösung gelöst.

Die vier Stammlösungen von OTC, TC, CTC, ICTC sind im Kühlschrank bei  $4^\circ\text{C}$  zwei Wochen haltbar. Die Verdünnungen erfolgen ebenfalls mit  $0,01 \text{ mol/l}$  Oxalsäurelösung. Es wird aus den drei Stammlösungen OTC, TC und CTC ein Mischstandard hergestellt, während die Isochlortetracyclin-Stammlösung nicht mit den anderen Tetracyclinen gemischt wird.

Zur Ermittlung der Retentionszeiten der Epimeren wurden die Epimeren (e-OTC, e-TC und e-CTC) der Firma Acros Organics entsprechend eingewogen. Für e-ICTC existiert zur Zeit keine Standardsubstanz.

Dazu werden folgende Mengen eingewogen:

Analyt	Molekulargewicht freies Tetracyclin [g/mol]	Molekulargewicht Hydrochlorid [g/mol]	mg Einwaage Salz auf 10 ml (r = 1 mg/ml) bei 100 % Reinheit
Tetracyclin	444,439	480,90	10,820 mg
4-epi-Tetracyclin	444,439	480,90	
Oxytetracyclin	460,439	496,9	10,791 mg
Chlortetracyclin	478,889	515,35	10,761 mg
4-epi-Chlortetracyclin	478,889	515,35	
Isochlortetracyclin	478,889	515,35	10,761 mg

Bei Chlortetracyclin wird die Herstellerangabe zur chemischen Reinheit von 80 % berücksichtigt und entsprechend mehr eingewogen. Die Reinheit des CTC-Standards wird in Anhang 12.1 beschrieben.

## 10.1.4 Laborgeräte

### Glasgeräte

- Pipetten 1 ml/ 2 ml / 3 ml/ 10 ml/ 15 ml/ 30 ml
- Meßkolben 10 ml/ 20 ml / 25 ml / 50 ml / 100 ml
- Bechergläser mit hohem Rand 150 ml, 250 ml
- verschließbare PE-Gefäße 100 ml, 150 ml, 250 ml, 2000 ml
- Glasrichter
- Polypropylen-Probenröhrchen mit Schraubverschluß (ohne Dichtungen), 50 ml (Greiner, Solingen)
- 4 ml Braunglasanalysenfläschchen, 11\* 30 mm (Abimed, Langenfeld)

### Technische Laborgeräte

Homogenisierstab Ultra-Turrax Typ 18/10 (IKA-Werk, Janke & Kunkel, Staufen)  
 Schüttelmaschine SM-25 (Bühler, Tübingen)  
 Vibrationsmischer für Reagenzgläser Ika-Vibro-Fix VF 2 (IKA-Werk, Janke & Kunkel, Staufen)  
 Membranfilter für wäßrige Lösungen (Celluloseacetat), Porengröße 0,45 µm, mit entsprechender Filtrationsapparatur  
 Ultraschallbad Sonorex RK (Bandelin, Berlin)

### 10.1.5 Probenaufarbeitungssystem

ASTED - Probenvorbereitungssystem durch Anreicherung von durch Dialyse getrennten Substanzen mit On-line Probenaufgabe auf HPLC-System (Gilson Abimed, Langenfeld)

ASTED = automated sequential trace enrichment of dialysates

ASTED- Probenwechsler, programmierbar und 8 kByte Anwendungsspeicher sowie integriertem, motorgetriebenem Rheodyne 7010 Ventil

ELV-7000 Kranich (Göttingen) motorgetriebenes Hochdruckschaltventil mit Rheodyne 7010 Ventil - gesteuert vom ASTED-System mit einer 5 ml Probenschleife

LMV 870 Kontron (Berlin) motorgetriebenes Niederdruckventil, gesteuert vom ASTED-System

zwei 370 µl ASTED Dialyse-Blöcke in Serie geschaltet aus KEL-F mit ASTED-Dialyse-Membranen aus Cuprophan (Celluloseacetat, 15 kD)

Vorsäulenkartuschenhalterung und Vorsäulenkartusche (20 \* 4 mm i.D.) mit 2 cm Kartuschen CS- Chromatographie Service, Langerwehe

zwei Dilutoren (Modell M 401) mit je einer 5,0 ml Spritze

nicht thermostatisierbarer Kunststoff-Probenhalter (Rack Code 34) für 36 St. 4 ml Analysenfläschchen

thermostatisierter Aluminiumprobenhalter mit Hohlraum für 36 St. 4 ml Analysenfläschchen, der über einen Kryostaten (RMT/RM6, Meßgeräte-Werk Lauda, Lauda-Königshofen) auf +5°C gekühlt wird.

### 10.1.6 Chromatographische Ausrüstung

#### Hochleistungsflüssigkeitschromatograph mit on-line gekoppelter Dialyse-und Festphasenextraktionseinheit

Autosampler M 211 (ASTED-System, Firma Gilson-ABIMED)

Injektor mit angeschlossenem Sechsfachschaltventil und 20 µl Probenschleife (Modell 7125, Rheodyne, Cotati, CA USA)

zwei HPLC-Kolbenpumpen (Modell M307, programmierbar, isokratisch, Gilson, ABIMED, Langenfeld)

eine HPLC-Pumpe Waters 510, (Milford, MA, USA)

UV-Detektor L 6000A (Merck Hitachi, Darmstadt)

Fluoreszenz-Detektor F-1050 (Merck Hitachi, Darmstadt)

SPD-6 Diodenarray-Detektor (Shimadzu, Duisburg)

Datenaufnahmesystem Apex, Autochrom Incorporated, (Milford, MA, USA)

#### Trenn- und Anreicherungsäule

Analytische Säule (Superspher RP-8 250 mm lang, 3 mm I.D., 4µm Korngröße), (Merck, Darmstadt)

Vorsäule RP-8 Material 5 µm Korngröße, 4\* 4 mm, (Merck, Darmstadt)

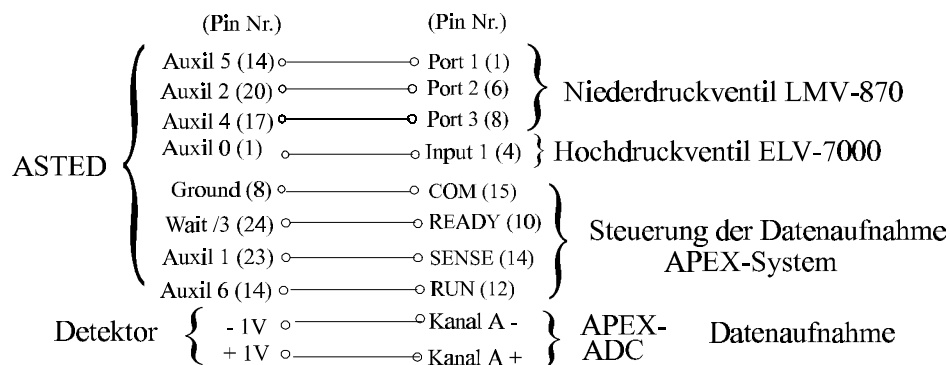
Anreicherungsäule des ASTED-Systems

TEC = trace enrichment column 2 cm lang, vernetztes Polystyrol, PLRP-S 50 - 70 µm Korngröße, 100 Å Porengröße, Polymer Laboratories, Shropshire, UK

Bezug : Polymer Laboratories, Postfach 361, 42724 Waltrop

Steuerung und Programmierung

Der schematische Aufbau des kompletten Chromatographiesystems ist in Kap. 4.1 Abb. 10 abgebildet. Im folgenden wird die Steuerung und Programmierung der einzelnen Geräte im Detail erläutert werden.



**Abb. 85: Schematische Darstellung der Signalübertragung im Chromatographiesystem**

## 10.2 Durchführung der Analysen

### 10.2.1 Untersuchung von Proben mit unbekanntem Analytgehalt

Die Untersuchung kann aus frischem homogenisiertem Vollei, Eiklar und Eigelb, sowie aus eingefrorenem Vollei, eingefrorenem Eiklar und eingefrorenem verdünnten Eigelb oder aus gefriergetrocknetem homogenisiertem Vollei erfolgen. Die Proben werden dialysiert und chromatographisch ausgewertet. Quantifiziert wird mit einer Kalibrierfunktion, erstellt aus dotierten Volleiproben, s.u. Dotierung zur Aufstellung einer Kalibriergerade.

### 10.2.2 Matrix-Standards zur Ermittlung einer Kalibrierfunktion

#### Herstellung von homogenisiertem Flüssig-Vollei

Die Eiinhalte von jeweils 3 Eiern werden in einem 250 ml Becherglas mit hohem Rand mit einem Ultra-Turrax möglichst schaumfrei homogenisiert. Dieser Vorgang wird 6 mal wiederholt. Die frisch homogenisierten Eiinhalte werden in einem verschließbaren 2-Liter PE-Gefäß gesammelt, vereinigt und geschüttelt. Zur Herstellung von Flüssigvollei-Standards werden 0,8 bis 1 kg homogenisiertes Flüssigvollei bzw. 18 Hühnereier benötigt.



### Untersuchung von undotierten Matrices

Bevor die Dotierung der homogenisierten Matrix mit Standardlösungen durchgeführt wird, wird undotierte Matrix mit Probenverdünnungslösung verdünnt und zur Dialyse vorbereitet (s.u. Vorbereitung zur Dialyse) und analysiert (s.u. Analyse mit Programmfile 90). Falls keine Matrixstörungen oder Tetracyclinrückstände im Blankprobenmaterial festgestellt worden sind, so ist die homogenisierte Matrix (Eigelb, Eiklar, Vollei, Plasma) zur Herstellung von dotierten Matrix-haltigen Standards geeignet.

### **10.2.3 Dotierung zur Aufstellung einer Kalibriergerade**

Jeweils 150 g Flüssigvollei oder Eiklar oder Eigelb werden genau in ein 250 ml PE-Gefäß eingewogen. Aus den drei Stammlösungen (OTC, TC und CTC 1 mg/ml) wird ein Mischstandard mit je 0,1 mg/ml in 0,01 mol/l Oxalsäurelösung hergestellt, indem in einen 10 ml Meßkolben von jeder Stammlösung 1 ml pipitiert und mit 0,01 mol/l Oxalsäurelösung auf 10 ml aufgefüllt wird. Anschließend werden gemäß folgendem Schema 5 Dotierungen vorgenommen. Beim ICTC erfolgte eine analoge Vorgehensweise.

	Mischstandard c = 0,1 mg/ml Muttersubstanz mit seinem ggf. als Artefakt entstandenem 4-Epimer	Menge an Matrix	Konzentration je Tetracyclin-Muttersubstanz bzw. ICTC
1	30 µl	150 g	20 µg/kg
2	150 µl	150 g	100 µg/kg
3	300 µl	150 g	200 µg/kg
4	450 µl	150 g	300 µg/kg
5	600 µl	150 g	400 µg/kg

Während der Einwirkzeit von 1,5 Stunden wurde das dotierte Probenmaterial auf eine Schüttelmaschine gestellt und bei Raumtemperatur intensiv in verschlossenen PE-Gefäßen durchgeschüttelt. Material, das nicht direkt analysiert werden sollte, wurde in kleinen Portionen à 10 g in PE-Röhrchen abgefüllt und eingefroren. Nach dem Auftauen oder bei direkt anschließender Analyse wurde das Probenmaterial mit PVL verdünnt und eine Minute geschüttelt. Die Verdünnung der Eigelbproben mußte bereits vor dem Einfrieren erfolgen, da nach dem Auftauen das unverdünnte Eigelb eine irreversible Viskositätszunahme erfährt [200].

Bei Plasmaproben erfolgte die Dotierung in kleineren Einheiten von 15 g, da nur geringe Mengen an undotiertem Plasma zur Verfügung stand. Die Dotierung bei 200, 400 und 600 µg/kg erfolgte mit 30, 45 und 60 µl der entsprechenden Mischstandards bzw. ICTC-Lösung.

### Vorbereitung zur Dialyse

Die dotierten Vollei-Standards werden im Kühlschrank aufbewahrt. Aus jedem PE-Gefäß werden anschließend jeweils  $10,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  in Polypropylengefäße (Greiner) überführt und mit  $20,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  der Probenverdünnungslösung versetzt. Diese Mischung wird nun mittels Vortex 0,5 min gemischt. Es werden nun 3,5 ml dieser Lösung in 4 ml-Autosamplervials überführt und in das Autosamplerrack gestellt. Das Autosamplerrack wird auf  $5^\circ\text{C}$  gekühlt. Wird die Kalibriergerade erst am folgenden Arbeitstag aufgenommen, werden die Vollei-Standards bei  $-18^\circ\text{C}$  eingefroren.

## **10.2.4 Probenvorbereitung**

### Hühnereier mit unbekanntem Gehalt an Tetracyclinen

Mittels Ultra Turrax werden die Eihalte möglichst schaumfrei homogenisiert. Danach wird die Probe zur Dialyse vorbereitet ( s.o.).

### Eiklar- und Plasmaproben

Eiklar- und Plasmaproben werden im gleichen Verhältnis wie Vollei mit Probenverdünnungslösung verdünnt und untersucht s.o. Bei Plasmaproben wurden entsprechend dem vorhandenen Probenmaterial kleinere Einwaagen : d.h. 1 g Plasma plus 2 g PVL gewählt.

### Eigelbproben

Das Eigelb erfordert eine andere Vorgehensweise.  $5,0 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$  Eigelb werden mit  $15,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  Probenverdünnungslösung verdünnt und 1 bis 2 Minuten geschüttelt bis eine homogene Lösung entstanden ist. Erst jetzt darf die Probe eingefroren werden bzw. steht für die automatisierte Analytik zur Verfügung.

### Trockenvolleipulver mit unbekanntem Gehalt an Tetracyclinen

Eine Portion von  $20,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  Trockenvolleipulver wird ein 150 ml PE-Gefäß eingewogen und mit  $60 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  tridest Wasser versetzt und geschüttelt. Das Gesamtgewicht beträgt nun  $80,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ . Der Wassergehalt von rekonstituiertem Vollei beträgt nun 75 % der Gesamtmasse. Frisches Vollei enthält nach dem Tabellenwerk von Souci, Fachmann, Kraut [201] einen Wassergehalt von 75 g/100g.

Das frisch rekonstituierte Trockeneipulver kann im Kühlschrank 1 Tag gelagert werden. Die Vorbereitung zur Dialyse s.o..

## 10.2.5 Online gekoppelte Dialyse mit dem ASTED-System

### 10.2.5.1 Dialyse von Ei-haltigen Standards und Eiprobe mit Programmfile 90

Ca. 3,5 ml des zur Dialyse vorbereiteten Materials (s.o.) werden in 4 ml Autosamplervials gegeben. Das Probenrack des Autosamplers wird auf 5°C gekühlt. Die Probenvials werden entweder verschlossen oder mit einer Aluminiumfolie bedeckt, damit kein Kondenswasser in die Vials gelangt.

Der Autosampler bietet Platz für 18 Proben, die jeweils nur einmal analysiert werden (keine Mehrfachbestimmung aus einem Vial). Das Autosamplerrack bietet außerdem Platz für 18 Spülvials. Spül- und Probenvials sind abwechselnd im Rack angeordnet. Das erste Vial ist immer ein Spülvial. Der Autosampler entnimmt 1,7 ml Probe aus dem Probenvial und gibt davon 1,3 ml in einem Puls in die Zuleitungen und in die Donorkammer des Dialyseblocks. Die Donorkammer wird hierbei überfüllt. Es wird ein Volumen von 740 µl dialysiert.

#### Ausgangsbedingungen :

Bevor die Analyse beginnt, müssen folgende Parameter erfüllt sein:

<b>Gerät</b>	<b>Status</b>
Rheodyneventil 1	Injekt
Rheodyneventil 2	Injekt
Niederdruckventil 1	Position 1
HPLC-Pumpe 1	Fluß 0,35 ml/min
HPLC-Pumpe 2	Fluß 1 ml/min
Detektor	360 nm
Kühlung für das Autosamplerrack	5°C
APEX-System	Aquisition-Methode geladen

<b>Lösung</b>	<b>Vorlage</b>
Dilutor-0-Lösung	1,5 l
Akzeptorkammerlösung	400 ml
Akzeptorkammerspül-lösung	150 ml
Donorkammerspüllösung	in Vials à 4 ml abgefüllt im Autosamplerrack
HPLC-Fließmittel	1 l
TEC-Waschlösung	2 l

Chromatographische Parameter:

Anreicherungsmaterial :	Polymer Laboratories PLRP-S 100 Å 50-70 µm
Vorsäule :	Merck RP-8 Vorsäulenkartusche 4*4 mm
Analytische Trennsäule :	Merck Superspher RP-8, 4µm, 3 mm i.D. * 250 mm
HPLC- Fließmittel :	0,01 mol/l Oxalsäure/Acetonitril, 50 + 50 , v/v
UV-Detektion :	360 nm für OTC, TC und CTC 310 nm für ICTC und CTC

**10.2.5.2 Bestimmung des Isochlortetracyclins mittels Fluoreszenzdetektion**Prinzip:

Eine selektive Bestimmung von *in vivo* gebildetem ICTC und e-ICTC ohne gleichzeitige Erfassung von CTC und anderen Tetracyclinen ist durch Fluoreszenzdetektion ( $\lambda_{\text{ex}}$  350 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm) möglich. Dazu wird nach der Trennsäule über ein T-Stück durch Zupumpen von Natronlauge-Glycin-Lösung das Eluat auf pH 12 eingestellt. Zwischen T-Stück und Detektor befindet sich eine Reaktionsschleife.

Durchführung

Die **Ausgangsbedingungen** und Chromatographischen Parameter (siehe 10.2.5.1) werden ergänzt um :

<u>Gerät</u>	<u>Status</u>
HPLC-Pumpe 3	Fluß 0,1 ml/min
Detektor	Fluoreszenz Anregung 350 nm, Emission 420 nm

<u>Lösung</u>	<u>Vorlage</u>
Nachsäulenlösung	0,4 mol/l Natronlauge-Glycin-Lösung (0,4 mol NaOH und 0,4 mol Glycin in einem Liter tridest. Wasser lösen, mit einigen Tropfen einer 1 M Natronlauge auf pH = 12 einstellen)

Bei der Fluoreszenz-Detektion verlängerten sich gegenüber der UV-Detektion bei 310 nm die Retentionszeiten des e-ICTC und des ICTC um 1,6 Minuten, da aufgrund der Reaktionsschleife der Weg zwischen Detektor und Säulenende länger war.

## 10.2.5.3 Parameter der automatisierten on-line Probenaufarbeitung

Parameter	Ausführendes Gerät	Lösung	Zahlenwert pro Analyse
Ansaugprobenvolumen	Dilutor 0	Probe	1,7 ml
Abgabevolumen	Dilutor 0	Probe	1,3 ml
Probedialysevolumen	Dialysekammer	Probe	0,74 ml
Luftblasevolumen zur Trennung von Dilutor-0-Lösung und Probe	Dilutor 0	Luft	50 µl
Anzahl der Donorkammerpulse	Dilutor 0	Probe	1
Dialysezeit	Dialysekammer	Probe	15,5 Minuten
Dialysatvolumen	Dilutor 1	Dialysat	5,5 ml
Anzahl der Akzeptorkammerpulse	Dilutor 1	Dialysat	4
Volumen der ersten drei Akzeptorkammerpulse	Dilutor 1	Dialysat	1,35 ml
Volumen des vierten Akzeptorkammerpulses	Dilutor 1	Dialysat	1,45 ml
Anreicherungs-volumen	5 ml Probenschleife und Pumpe 2	Dialysat	5 ml
Luftvolumen zur Trennung der Waschlösung vom Dialysat	Dilutor 1	Luft	600µl
Waschvolumen zur Reinigung der TEC	Pumpe 2	tridest. Wasser	3 ml
Volumen, das die Anreicherungs- und analytische Säule durchfließt	Pumpe 1	HPLC-Eluent	18,55 ml
Volumen zur Konditionierung der Anreicherungs-säule	Pumpe 2	tridest. Wasser	14 ml
Donorkammer-spülvolumen	Dilutor 0	Spüllösung	3,5 ml
Akzeptorkammer-spülvolumen	Dilutor 1	Spüllösung	4,0 ml
Volumen zur Reinigung der Donorkammer	Dilutor 1	Dil-0-Lösung	28,2 ml
Volumen zur Reinigung der Akzeptorkammer	Dilutor 0	Dil-1-Lösung	11,7 ml

Parameter	Ausführendes Gerät	Lösung	Zahlenwert pro Analyse
Flußrate	Pumpe 1	FLM I / FLM II	0,35 ml/min
Flußrate	Pumpe 2	Wasser	1,00 ml/min
Flußrate	Pumpe 3	Natronlauge-Glycin-Lösung	0,10 ml/min
Flußrate	Dilutor 0	Dilutor-0-Lösung	1,50 ml/min
Flußrate	Dilutor 0	Probe	0,72 ml/min
Flußrate	Dilutor 0	Luft	0,36 ml/min
Flußrate	Dilutor 1	Akzeptorkammerlösung	0,72 ml/min
Flußrate	Dilutor 1	Dialysat	0,36 ml/min
Flußrate	Dilutor 1	Luft	0,36 ml/min

#### 10.2.5.4 Analysendurchführung mit dem ASTED-System

##### Beginn einer Analysenserie mit dem ASTED-System

Das ASTED-System wird über das am Gerät befindliche Keypad (= Bedienungselement) gesteuert. Durch das Drücken der Taste „Edit File“ und der Eingabe „80“ und dem Drücken der Taste „Enter“, wird ein Abfragemodus gestartet. Nach dem Beantworten der Abfragen wird vom ASTED-Systems die Analysenserie abgearbeitet.

Abfrage	Eingabe + Enter
Cleanup	1
Sample Height	1
Tube Nr	1
	(Position des ersten Spülvials)
Number of Samples	Anzahl der Vials im Rack
	(Anzahl der Proben- und Spülvials)
Inject Manually	0
Mixing	0

Jede Eingabe wird mit Enter bestätigt, worauf automatisch die nächste Abfrage erfolgt. Bei unsinnigen Eingaben wird die Abfrage wiederholt. Bei einer fehlerhaften Eingabe besteht ferner die Möglichkeit zur Korrektur der Eingabe über die Taste „Clear“. Nachdem die letzte Eingabe mit Enter bestätigt wurde, beginnt das ASTED-System selbsttätig seine Arbeit.

Unterbrechung der Analysenserie

Durch Drücken der Taste „Pause“ kann die Analysenserie unterbrochen werden. Das ASTED unterbricht seine Tätigkeiten, gleichzeitig arbeiten aber beide Pumpen weiter. Auch die Datenaufnahme wird nicht unterbrochen. Durch Drücken der Taste „Start“ setzt das ASTED-System seine Tätigkeiten wieder dort fort, wo es im Programm unterbrochen wurde.

Vorzeitiges Beenden einer Analysenserie

Durch Drücken der Taste „Pause“ und anschließendem Drücken der Taste „Home“ kann die Analysenserie vorzeitig beendet werden.

**10.2.5.5 Wartung des ASTED-Systems**

<b>Parameter</b>	<b>Wartung und Pflege</b>
Anreicherungs- material	Die Anreicherungssäule wird nach 250 Anreicherungen durch eine neue ausgewechselt. Die Notwendigkeit eines vorzeitigen Austausches wird durch einen erhöhten Rückdruck von 10 bar und durch eine Peakverbreiterung im Chromatogramm angezeigt. Auch ein Reißen der Dialysemembran kann den vorzeitigen Austausch einer Anreicherungssäule erfordern.
Analytische Säule	Die analytische Säule wird nach ca. 4000 Analysenläufen (mit Cleanup = Probenaufarbeitung) ausgewechselt. Die Notwendigkeit eines vorzeitigen Austausches wird durch eine Peakverbreiterung und geringe Signalhöhen angezeigt. Bei starken Kontaminationen mit Eimatrix, z.B. durch Reißen einer Membran, ist ein intensiver Spülvorgang mit 400 ml tridest. Wasser, 400 ml Methanol, 400 ml Chloroform, 400 ml Isopropanol und 400 ml Wasser in umgekehrter Fließrichtung durchzuführen.
Vorsäule	Bei erhöhten Rückdrücken, Peakverformungen und bei starken Kontaminationen mit Matrix ist die Vorsäule durch eine neue auszutauschen.
UV-Lampe	Der Detektor arbeitet mit einer Longlife UV-Lampe (Merck) Herstellerangabe zur Lebensdauer: 1000 Betriebsstunden
Fluoreszenz- Lampe	Herstellerangabe zur Lebensdauer: 1000 Betriebsstunden (Merck)

<b>Parameter</b>	<b>Wartung und Pflege</b>
Dialysemembranen	Bei einem Anstieg der Matrixpeaks im Chromatogramm um das 4-fache und des Rückdrucks im gesamten analytischen System um 10 bar wird ein Austausch der Dialysemembranen erforderlich. Nach ca. 250 Bestimmungen wird die Dialysemembran durch eine neue ausgetauscht. Nach ca. 50 Bestimmungen (Eiprobe) ist die Dialysemembran mit der alkalischen Spüllösung nach 5.1.8 im offline Betrieb zu reinigen. Hierbei wird die Verbindung zwischen Dilutor 1 und Rheodyneventil 2 unterbrochen. Bevor eine neue Analyse stattfinden kann, muß der alkalische Puffer aus dem Dialyseblock entfernt werden. Die Reinigung des Dialyseblockes wird mit dem Programm 90 durchgeführt. Die Spülials werden dazu mit dem alkalischen Puffer 5.1.8 gefüllt und die Akzeptorkammerspüllösung 5.1.8 wird durch den alkalischen Puffer 5.1.8 ausgetauscht. Alle anderen Lösungen (z.B. Dilutor-0-Lösung) werden durch Wasser ausgetauscht.

### **10.3 Vorschrift für LC-MS/MS Bestimmung zur qualitativen Bestätigung und Identifizierung der drei Tetracycline und ihrer Metaboliten**

Die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden als Bestätigungsanalytik durchgeführt. Die Probenaufarbeitung, Dialyse und Anreicherung wurde mit dem ASTED-System durchgeführt. Hierzu wurde die Programmierung des ASTED-Systems geändert, um höhere Signalhöhen zu erhalten. Die Donorkammer wurde dreimal statt einmal gefüllt. Das angereicherte Dialysatvolumen betrug 7,0 ml, anstatt 5,0 ml und die Dialyse dauerte 24 Minuten anstelle von 15,5 Minuten. Hierdurch verlängerte sich die Gesamtanalysendauer, ermöglichte aber gleichzeitig auch die Erfassung von Minor-Metaboliten. Die Verbindung zwischen analytischer Trennsäule und Anreicherungssäule wurde unterbrochen, so daß nach der Elution der angereicherten Analyten diese in einem kleinen verschließbaren Braunglasvial aufgefangen wurden. Die Elution der Analyten von der Anreicherungssäule wurde mit HPLC-Fließmittel, welches 0,01 mol/l Oxalsäure und Acetonitril, 50 + 50, v+v enthält, durchgeführt und dauerte eine Minute. Es wurden 350 µl Eluat gesammelt. Danach wurde das Vial verschlossen und eingefroren. Das analythaltige Eluat wurde nicht weiter nachbehandelt. Durch diese Vorgehensweise war eine direkte Kopplung des ASTED-Systems mit dem LC-MS/MS System nicht nötig gewesen, welche sehr aufwendig gewesen wäre. Ein Probevolumen von 100 µl wurde direkt in das LC-MS/MS System injiziert.

Neben analythaltigen Proben wurden auch analytfreie Eier, die aus einem Kontrollversuch stammen, aufgearbeitet, um etwaige Störungen oder Signale, die nicht von den Tetracyclinen stammen, der Matrix zuordnen zu können.



Unter isokratischen Bedingungen wurde mit einem Fließmittel bestehend aus Acetonitril und 0.5 % Ameisensäure in Wasser (40 + 60, v+v) und einer Flußrate 0.4 ml/min chromatographiert. Als analytische Säule wurde eine Superspher RP-8, 4 µm, 25 x 3 mm i.D. verwendet. Das LC-MS/MS System war ein VG Quattro II (Micromass, UK) mit einem Electrospray als Ionenquelle. Das Instrument arbeitete im positiven Ionisations-Modus. Die Electrospray Bedingungen waren wie folgt: Temperatur der erhitzten Kapillare war 80°C, die „spray voltage“ war 3.5 kV und das sheath (base) Gas hatte eine Flußrate von 350 L/h N<sub>2</sub>. Das nebuliser (drying) gas war N<sub>2</sub> (Stickstoff) mit einer Flußrate von 13 L/h, mit Argon als Kollisionsgas wurde eine Dissoziation erzeugt, das Kollisionsgas hatte hierbei einen Druck von 3.5 bar.

MRM Daten (Multiple Reaction Monitoring) wurden aufgezeichnet mit einer „dwell time“ von 0.5 Sekunden und einer Scanbreite von 1 amu. Das MS1 wurde so eingestellt, daß nur die Vorläufermasse (Molmasse plus Wasserstoffion) durchgelassen wurde und in der Kollisionszelle fragmentiert wurde. Zur Aufnahme von MRM Daten wurde ein Folgeion ausgewählt und das MS2 wurde so eingestellt, daß nur die Folgeionenmasse durchgelassen wurde.

Analyt	MS1 m/z Vorläufer- ion [M+H] <sup>+</sup>	MS2 m/z Folgeion [M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> and [M+H-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,	Cone voltage	Collision Energy eV
N-DM-OTC	447	412 430	22	18
OTC	461	426 443	22	18
N-DM-TC	431	396 414	26	14
TC	445	410	19	17
	445	428	22	14
CTC	479	444	21	20
	479	462	27	18
N-DM-ICTC	465	448	25	17
ICTC	479	462	27	18

Die Ionen m/z korrespondieren jeweils zu [M+H]<sup>+</sup>, [M+H-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> and [M+H-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Die Iso-derivate des CTC bilden kein [M+H-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ion. Die Epimeren der drei Muttersubstanzen OTC, TC und CTC, zeigten die gleichen Folgeionen wie die Muttersubstanzen. Die 4-Epimeren wurden als Standards von Janssen Acrocs Organics

gekauft. Das e-ICTC wurde durch Epimerisierung von ICTC (als Standard erhältlich) gewonnen.

## **10.4 Untersuchungen der Futterproben**

### Extraktion aus dem Hühnerfutter

10,00 g Hühnerfutter werden in ein 1000 ml Meßkolben gegeben. Man suspendiert mit 500 ml einer 0,01 mol/l Oxalsäurelösung (in bidest. Wasser) und 50 ml Methanol (dest. über KOH) und schüttelt für 1,5 Stunden auf eine Schüttelmaschine. Danach werden ca. 8 ml in Zentrifugengläser gefüllt und 15 Minuten bei 10000 rpm (Tischzentrifuge Labor 4) zentrifugiert. Aus den Zentrifugengläser werden mit einer 5 ml Vollpipette genau 5 ml in ein 50 ml Meßkolben überführt. Dieser Meßkolben wird anschließend mit dem HPLC-Fließmittel (Acetonitril, 0,01 mol/l Oxalsäure, 50 + 50, v+v) bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Die klaren Lösungen werden direkt (über den Autosampler bzw. manuell) über eine 20µl Probenschleife injiziert.

### Bestimmung der Wiederfindung

Eine undotierte 10g Futterprobe wurde mit 10 µg je Tetracyclin dotiert und die oben beschriebene Extraktion durchgeführt.

### Einwaage der Kalibrierstandards

Bei der Einwaage der Kalibrierstandards wurde der Anteil an Hydrochlorid berücksichtigt und entsprechend mehr eingewogen. Außerdem wurde die vom Hersteller angegebene Reinheit berücksichtigt und entsprechend mehr eingewogen.

Die Standards wurden mit Hilfe von Wägegläschen in 50 ml Kolben eingewogen und mit einer Methanol- Oxalsäure (0,01 mol/l in tridest. Wasser) Mischung (50 +50, v+v) gelöst.

Die Standards (1 mg/ml) werden anschließend verdünnt und man erhält eine Stammlösung mit der Konzentration 0,1 mg/ml. Von dieser Lösung wird 1 ml auf 100 ml verdünnt und man erhält eine Lösung mit der Konzentration von 1 µg/ml. Dieser Lösung wird zur HPLC-Bestimmung eingesetzt. Bei einer Probenschleife von 20 µl gelangen 20 ng absolut auf die Trennsäule.

## 10.5 Herstellung der Isotetracycline

### 10.5.1 Herstellung des Isooxytetracyclins aus Oxytetracyclin und des Isotetracyclins aus Tetracyclin

#### Vorbemerkung

Die Herstellung der Verbindungen wurde in Anlehnung an Zhao Yibing et al. [12] durchgeführt. Die einfache Umwandlung der Tetracycline in ihre Isomere diente zur Klärung der Frage, ob die Isotetracycline in Proben mit gewachsenen Rückständen anwesend sind oder nicht.

Die erhaltenen Verbindungen wurden anschließend mittels UV bei 310 nm und 360 nm pH 2,2, sowie mittels FLD und MS/MS charakterisiert. Die Umwandlung der zwei Tetracycline Tetracyclin und Oxytetracyclin gelang nur teilweise, was die Charakterisierung des Gemisches aus Produkt und Edukt zeigt.

#### Reagenzien

Ausgangsprodukte waren Oxytetracyclin bzw. Tetracyclin (Sigma Aldrich). Weitere Reagenzien sind Natriumhydroxid Plätzchen und tridestilliertes Wasser.

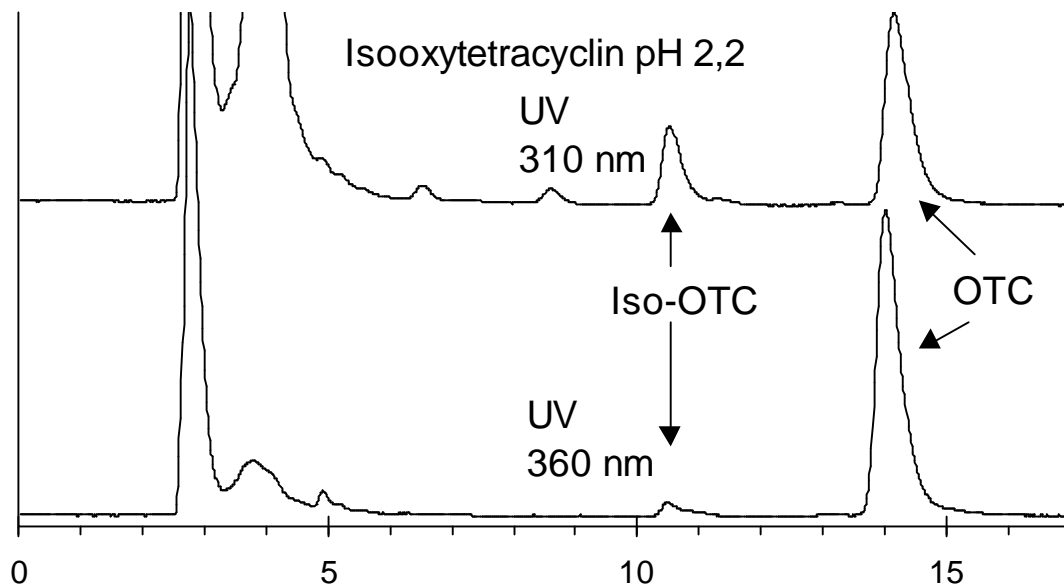
#### Vorschrift

Es werden jeweils 0,5 g Tetracyclin oder Oxytetracyclin in 50 ml einer 15 % Natriumhydroxidlösung gelöst. Die Lösungen werden mit einem Magnetrührer in einem 250 ml Enghalslerlenmeyerkolben unter dem Abzug bei 95°C für 30 Minuten erhitzt. Im Falle des Tetracyclins verfärbt sich die Lösung dunkel und die alkalische Oxytetracyclin-Lösung erhält eine kräftig gelbe Farbe.

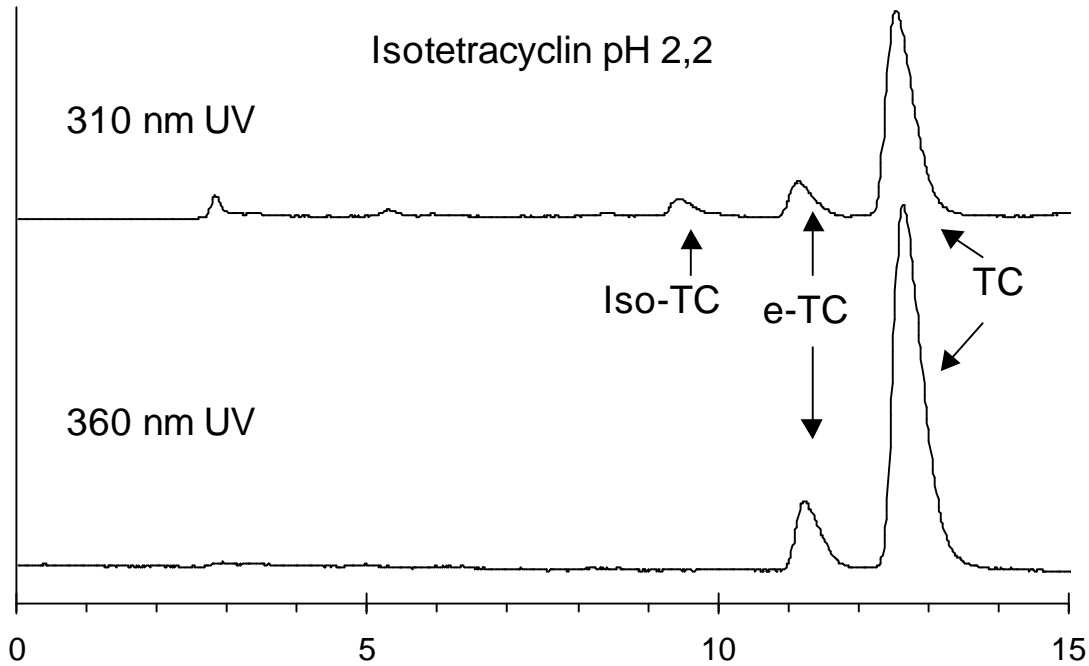
Anschließend werden die Lösungen abgekühlt und die Reaktion gestoppt. 1 ml der Reaktionslösung wird in 100 ml einer 0,01 mol/l Oxalsäure gelöst. Der pH-Wert wird mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 2,4 eingestellt. Die verdünnte Lösung enthält nun eine maximale Konzentration von 0,1 mg/ml und kann nun entsprechend der Standardarbeitsvorschrift für die Tetracyclinanalytik verwendet werden.

### 10.5.2 Analyse und Charakterisierung der Produktgemische Isoxytetracyclin und Oxytetracyclin, sowie des Gemisches Isotetracyclin und Tetracyclin

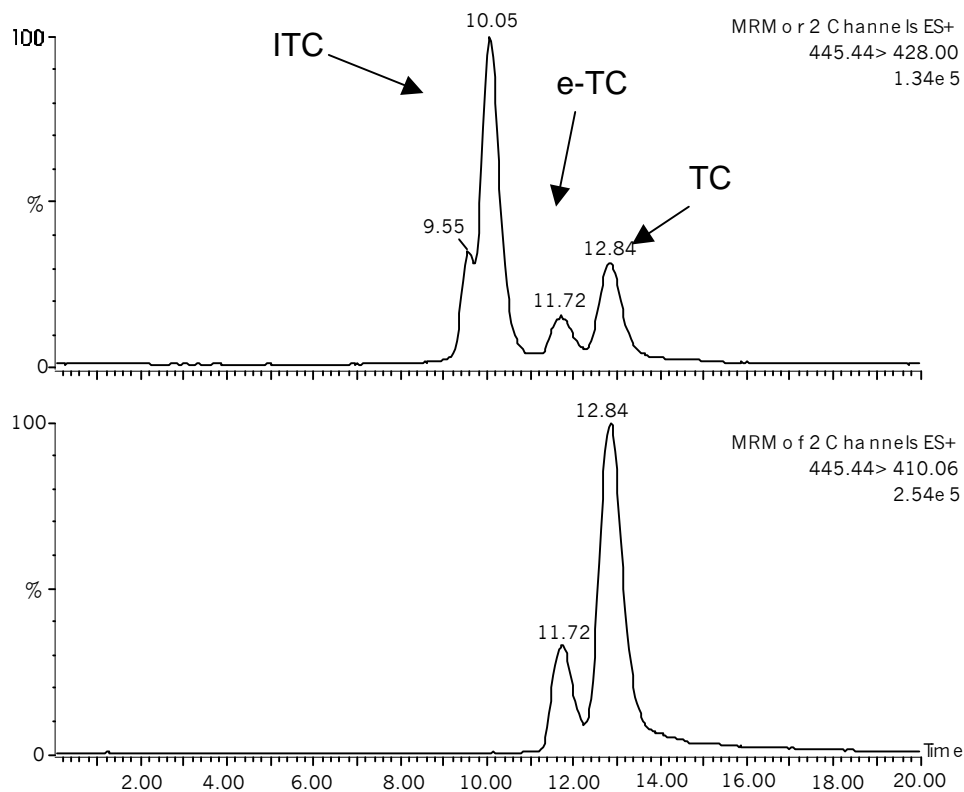
Die Produktgemische wurden mittels UV und beim Isotetracyclin auch mittels MS-MS untersucht, s. Abb. 74 bis 76.



**Abb. 74: Produktgemisch aus Isooxytetracyclin und Oxytetracyclin, sowie weiterer unbekannter Substanzen bei 310 und 360 nm mit Fließmittel II chromatographiert**



**Abb. 75:** Produktgemisch aus Isotetracyclin, Epi-Tetracyclin und Tetracyclin bei 310 und 360 nm mit Fließmittel I chromatographiert



**Abb. 76:** Produktgemisch aus Isotetracyclin (ITC), Epi-Tetracyclin (e-TC) und Tetracyclin (TC) analysiert mittels LC-MS-MS.  
Das MS2 detektiert die Folgeionen des Tetracyclins und des Isotetracyclins.

## 10.6 Medikationsstudien mit gesunden Legehennen

Insgesamt 60 Legehennen wurden für die Medikationsstudien mit Medizinalfutter auf dem Versuchsgut des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin gehalten. Die Hühner wurden je nach Medikationsstudie in Gruppen von 3 bis 10 Hennen zusammengefaßt und mit einem Medizinalfutter gefüttert, (siehe Kap. 10.9). Es gab drei Medikationsstudien-Zeiträume : Monate Februar 98 bis Mitte März, sowie Ende März bis Mitte April '98 und August 98. Zwischen diesen Zeiträumen erhielten die Legehennen wirkstofffreies Futter. Die Medikationsstudien sind in Tab. 20 (Kap.6.2) zusammengestellt. Bei den Studien wurden zwei Hühnerrassen verwendet, eine die weiße Eier legt und eine andere, die braune Eier legt.

„**Weißleger**“: Lohmann White SL, Schlupftermin August 1997

Herkunft: Hühnervermehrungseinrichtung Spreenhagen

Diese Rasse wurde für alle Medikationsstudien eingesetzt

„**Braunleger**“: Eigenkreuzung des BgVV: Warren-Brown x Araucana, Schlupftermin

September 1997, Herkunft Versuchsgut des BgVV

Diese Rasse wurde nur bei Medikationsstudien im August '98 eingesetzt.

### Klinische Untersuchung vor Versuchsbeginn und nach Versuche

Die Legehennen wurde auf ihren Gesundheitszustand hin untersucht. Hierzu wurden folgende Parameter untersucht.

Blut : Hb, HK, Leukozyten, Differentialblutbild

Blutplasma : GOT, LDH

Blutserum : Na, K, Ca

Die Untersuchungsergebnisse waren veterinärmedizinisch sämtlich ohne besondere Bemerkung.

### Lagerung und Nutzung des Probenmaterials

Die ganzen Eier wurden von Berlin nach Wuppertal mit dem Auto transportiert. Die Lagerung der Eier erfolgte in Berlin und Wuppertal im Kühlschrank bzw. in einem Kühlraum bei 6°C.

Die Eier wurden entsprechend Kap. 6.2.4 als Vollei oder getrennt nach Eiklar oder Eigelb untersucht.

## 10.7 Gewinnung von lyophilisiertem Vollei mit dotierten und gewachsenen Tetracyclin-Rückständen

Um Vergleichsuntersuchungen in anderen Labors durchführen zu können, wurde lyophilisiertes Volleimaterial mit dotierten und gewachsenen Tetracyclinrückständen gewonnen. Es wurde ausschließlich Volleimaterial verwendet, welches aus Medikationsstudien stammte, die im März/April 1998 auf dem Versuchsgut des BgVV mit Lohmann White SL durchgeführt wurden.

Es wurde folgendes gefriergetrocknetes Volleimaterial gewonnen

A - Blank-Volleimaterial, rückstandsfrei, aus einem Kontrollversuch

B - Vollei dotiert mit 100 µg/kg Tetracyclin und 100 µg/kg epi-Tetracyclin

C - Vollei dotiert mit 200 µg/kg Tetracyclin

D - gewachsenes homogenes Volleimaterial mit Tetracyclinrückständen

E - gewachsenes homogenes Volleimaterial mit Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclinrückständen.

Das Material wurde auf Homogenität geprüft. Von jedem der 5 Volleiprobe(n) (zwei dotierte und zwei gewachsene, sowie Blankproben) wurde der Inhalt von 5 Probengefäßen rekonstituiert (insgesamt 25 Analysen) und die Tetracyclin-Konzentrationen bestimmt. Die bei der Überprüfung der Homogenität ermittelten Variationskoeffizienten lagen im Bereich derjenigen der Validierung, so daß von einem homogenen Material ausgegangen werden konnte.

Nach 6 Monaten wurde erneut von jedem der 4 Volleiprobe(n) (2 dotierte und 2 mit gewachsenen Rückständen) sowie von dem Blankvolleimaterial 2 Proben zufällig ausgewählt und rekonstituiert. Diese Untersuchungen dienten dazu, Vergleichswerte zu erstellen, da das Probenmaterial einem nordirischen Labor zur Untersuchung gegeben werden sollte.

Die Ergebnisse sind in Kap. 5 zusammengefaßt. Das Material wurde für einen Proficiency-Test an 25 Vergleichslabore versendet. Die Untersuchung und Auswertung erfolgte nach Fertigstellung der Dissertation.

## 10.8 Vorschrift zur Gewinnung von Plasma aus Hühnerblut

Methode des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin

### Vorschrift

Liquemin N 25000 – Wirkstoff: Heparin-natrium 25000 IE wird 0,1 % Kochsalzlösung verdünnt. Man gibt 0,02 ml davon (entspricht 10 IE) in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß, entnimmt aus der Flügelvene Blut bis zur Marke 1,5 und mischt vorsichtig durch Schwenken. Anschließend zentrifugiert man 10 Minuten bei 3000 U/min in einer Tischzentrifuge. Mit einer Eppendorf-Pipette wird das Plasma von den Blutkörperchen getrennt und sofort gekühlt oder eingefroren.

## 10.9 Mischung der Futterproben und eingesetzte Chargen

### Mischanweisung

Die Mischungen werden in Mengen zu 16 kg hergestellt. Exemplarisch wird hier eine genaue Mischanweisung, wie auf dem Versuchsgut des BgVV in Berlin durchgeführt wurde wiedergegeben.

Für die Sollkonzentrationen : 750 mg TC, 1300 mg CTC und 800 mg OTC pro kg Futter und für eine Menge von 16 kg Medizinalfutter wird folgende Mischung durchgeführt :  
954,4 g Legehennenfutter (gemahlen) werden mit 12 g TC, 20,8 g CTC und 12,8 g OTC vermischt und als Vormischung in 15 kg Legehennenfutter eingemischt. 1 kg wird als Analysenprobe abgefüllt.

Als Wirkstoffe wurden ausschließlich die folgenden Substanzen der Fa. Sigma Aldrich eingesetzt.

<b>Wirkstoff</b>	<b>Sigma Aldrich Charge</b>	<b>Reinheit (Herstellerangabe) als Hydrochlorid</b>
Chlortetracyclin	Lot 16H0899	87 %
Tetracyclin	Lot 96H1177	95 %
Oxytetracyclin	Lot 96H0571	100 %



## 11. Literaturverzeichnis

- [1] Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 der Kommission vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festlegung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs vom 26. Juni 1990 (Amtsblatt Nr. L 224/1), zuletzt geändert durch VO (EWG) Nr. 508/1999 vom 4. März 1999 (Amtsblatt Nr. L 60/16)
- [2] Hlavka JJ, Boothe JH (1985) „The Tetracyclines“ Handbook of Experimental Pharmacology Vol 78, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, S. 1-3 und S. 412-439
- [3] Dürckheimer W (1975) „Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen“, Angewandte Chemie 87: 751- 764
- [4] Falbe J, Reglitz M (Hrsg.) (1989) Römpp Chemie Lexikon 9. Auflage, Georg Thieme Verlag S. 3183, S.715, S. 4523-4524
- [5] Colaizzi JL, Klink PR (1969) „pH-partition behaviour of tetracyclines“, Journal of Pharmaceutical Sciences 58:1184-1189
- [6] Stephens CR, Murai K, Burnings KJ, Woodward RB (1956) „Acidity constants of the tetracycline antibiotics“, Journal of the American Chemical Society 78:4155-4159
- [7] Strittmatter Th, Siewert M (1981) „Zur Qualitätsbeurteilung der Tetracycline“, Pharmazeutische Zeitung, 126: 1951 – 1954
- [8] Naggar V, Daabis NA, Motawi MM (1974) „Solubilization of tetracycline and oxytetracycline“, Die Pharmazie 29: 122-125
- [9] Naggar V, Daabis NA, Motawi MM (1974) „Effect of solubilizers on the stability of tetracycline“, Die Pharmazie 29: 126-129
- [10] McCormick JRD, Fox SM, Smith LL, Bitler BA, Reichenthal J, Origoni VE, Muller WH, Winterbottom R, Doerschuk AP (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 Society 2849-2858
- [11] Barker SA, Walker CC (1992) „Review : Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods“, Journal of Chromatography 624: 195-209
- [12] Yibing Z, Yuanxiang CI, Wenbao C (1997) „Fluorescence enhancing by alkaline degradation of tetracycline antibiotics and its application“, Science in China 40: 434-441
- [13] 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

- [14] Remmers EG, Sieger GM, Doerschuk AP (1963) „Some observations on the kinetics of the C-4 epimerization of Tetracycline“, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52 : 752-756
- [15] Hussar DA, Niebergall PJ, Sugita ET, Dolsuisio JT (1968) „Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives“, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20: 539-546
- [16] McCormick JRD, Sjolander NO, Hirsch U, Jensen ER, Doerschuk AP (1957) „A new family of antibiotics : the Demethyltetracycline“, *Journal of the American Chemical Society* 79: 4561-4563
- [17] Bohonos N, Dornbush AC, Feldman LI, Martin JH, Pelcak E, Williams JH (1954) „In vitro studies with chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline“, *Antibiotics Annual 1953-1954*: 49-55
- [18] Naidong W, Hua S, Roets E, Busson R, Hoogmartens J (1993) „Investigation of keto-enol tautomerism and ionization of doxycycline in aqueous solutions“, *International Journal of Pharmaceutics* 96: 13-21
- [19] Naidong W, Roets E, Busson R, Hoogmartens J (1990) „Separation of keto-enol Tautomers of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene)copolymer“, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* 8: 881-889
- [20] Bryan PD, Hawkins KR, Stewart JT, Capomacchia AC (1992) „Analysis of Chlortetracycline by high performance liquid chromatography with post-column alkaline-induced fluorescence detection“, *Journal of Biomedical Chromatography* 6: 305-310.
- [21] Kennedy DG, McCracken RJ, Carey MP, Blanchflower WJ, Hewitt SA (1998) „Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg“, *Journal of Chromatography A* 812: 327-337
- [22] Kelly RG, Peets LM, Hoyt KD (1969) „A fluorometric method of analysis for tetracycline“, *Analytical Biochemistry* 28 (1969) 222 - 229
- [23] Breitfellner G, Neuhold R (1964) „Untersuchungen zur Frage der Kreuzresistenz von Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Demethyltetracyclin an 40 Staphylokokkenstämmen“, *Chemotherapie* 8: 30-40
- [24] Häberlein H „Antibiotika“ in Hänsel R, Hölzl J (Hrsg.) (1996) „Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie“, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York S. 381-382
- [25] Schrunner E., Limbert M (1982) „Antibiotikaresistenz von Bakterien – Entstehung und Wirkungsmechanismen“ *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 5: 258 – 265
- [26] Hausner TP, Nierhus KH (1988) „Proteinbiosynthese und ihre Hemmung durch Antibiotika“ *Biologie in unserer Zeit* 18: 129-144

- 
- [27] Schumann W (1988) Biologie der Plasmide, Vieweg Verlag, S. 173-174
- [28] WHO Technical Report Series 876 „Evaluation of certain veterinary drug residues in Food“, Forty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organization, Geneva 1998
- [29] Frimpter GW, Timpanelli AE, Eisenmenger WJ, Stein HS, Ehrlich LI (1963) „Reversible `Fanconi Syndrome` caused by degraded tetracycline“, Journal of the American Medical Association 184: 111-113
- [30] Wruble LD, Ladman AJ, Britt LG, Cummins AJ (1965) „Hepatotoxicity produced by Tetracycline overdose“, Journal of the American Medical Association 192 : 92-94
- [31] Lepper MH, Wolfe CK, Zimmerman HJ, Caldwell ER, Spies HW, Dowling HF (1951) „Effect of large doses of aureomycin on human liver“, Archives of internal Medicine American Medical Association 88: 271-283
- [32] Benitz KF, Diermeier HF (1969) „Renal toxicity of tetracycline degradation products“, Proceedings of the Society for experimental biology and medicine 115: 930-935
- [33] Somogyi A (1982) „Gesundheitliche Bedeutung von Rückständen pharmakologisch wirksamer Substanzen in der Tierhaltung“, Bundesgesundheitsblatt 25: 365-370
- [34] Rosin H „Antibiotika und Chemotherapeutika“, in Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1992) „Pharmakologie und Toxikologie, 6., Auflage, S. 653
- [35] Eisner HJ, Stirn FE, Dornbusch AC, Oleson JJ (1953) „The enhancement of serum levels of aureomycin in experimental animals“, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 108: 442-449
- [36] Kelly RG, Kanegis LA (1967) „Tissue distribution of tetracycline and chlortetracycline in dog“, Toxicology and Applied Pharmacology 11: 114-120
- [37] Milch RA, Rall DP, Tobie JE (1958) „Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone“, The journal of bone and joint surgery 40: 897-910
- [38] Kline AH, Blattner RJ, Lunin M (1964) „Transplacental effect of tetracyclines on teeth“, Journal of the American Medical Association 188: 170-172
- [39] Böcker R, (1983) Habilitationsschrift „Untersuchungen zum Stoffwechsel von Doxycyclin“, Der Hohen Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg
- [40] Böcker R (1983) „Analysis and quantification of a metabolite of Doxycycline in mice, rats, and humans by high-performance liquid chromatography“, Journal of Chromatography 274: 255-262.

- 
- [41] Böcker R, Estler C.-J. (1983) "Quantitative assessment of a newly detected metabolite of doxycycline. invitro formation and in vivo distribution of N-Demethyl-doxycycline in mice", *Drugs Experimental Clinical Research* 9: 813-819.
- [42] Hewell DB(1967) American Cyanamid Company Report B-28 Experiment L-1232 zitiert in [54] S. 150
- [43] W. Groß, K. Ring, E. Lodemann, *Physiologische Chemie, Edition Medizin, VCH, Weinheim 1989*
- [44] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, BI-Wissenschaftsverlag, 6.Auflage, Mannheim, 1992*
- [45] Nelis HJCF, De Leenheer AP (1982) „Metabolism of Minocycline in Humans“, *Journal of Drug Metabolism and Disposition* 10: 142-146,
- [46] Böcker RH, Peter R, Machbert G, Bauer W (1991) „Identification and determination of the two principal metabolites of minocycline in humans“, *Journal of Chromatography* 568: 363-374
- [47] Schach von Wittenau M, Twomey TM, Swindell AC (1972) „The Disposition of Doxycycline by the Rat“, *Chemotherapy* 17: 26-39
- [48] Fabre J, Pitton JS, Kunz JP (1966) „Verteilung und Ausscheidung von Doxycyclin beim Menschen“, *Chemotherapia* 11: 73-85
- [49] Fabre J, Milek E, Kalfopoulos D, Merier G (1971) „La cinétique des tétracyclines chez l'homme I. Absorption digestive et concentrations sériques“, *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 101: 593-598
- [50] Fabre J, Milek E, Kalfopoulos D, Merier G (1971) „La cinétique des tétracyclines chez l'homme II. Excrétion, pénétration dans les tissus normaux et inflammatoires, comportement en cas d'insuffisance rénale et d'hémodialyse“, *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 101: 625-633
- [51] Neuvonen PJ, Penttilä O, Lehtovaara R, Aho K (1975) „Effect of antiepileptic drugs on the elimination of various tetracycline derivatives“, *European Journal of clinical Pharmacology* 9: 147-154
- [52] Penttilä O, Neuvonen PJ, Aho K, Lehtovaara (1974) „Interaction between Doxycyclin and some Antiepileptic Drugs“, *British Medical Journal* II : 470-472
- [53] FAO (1991) Food and Nutrition Paper 41/3 „Residues of some veterinary drugs in animals and foods“ Monographs prepared by the Forty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 5-14 February 1990
- [54] FAO (1996) Food and Nutrition Paper 41/8 „Residues of some veterinary drugs in animals and foods“, Monographs prepared by the Forty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Geneva, 6-15 June 1995

- [55] FAO (1997) Food and Nutrition Paper 41/9 „Residues of some veterinary drugs in animals and foods“ Monographs prepared by the Forty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Rome, 4-13 June 1996
- [56] Eisner HJ, Wulf RJ (1963) „The metabolic fate of chlortetracycline and some comparisons with other tetracyclines“, Journal of Pharmaceutical Experimental Therapeutics 142: 122-131
- [57] Kühne M „Combination of HPLC and agar diffusion test for confirmatory purposes“, Proceedings of the Euro Residue II conference, 3-5 May 1993, Seite 424- 428
- [58] Kennedy DG, McCracken RJ, Hewitt SA, McEvoy JDG (1998) „Metabolism of chlortetracycline : drug accumulation and extraction in the hen´s egg“, Analyst 123: 2443-2447
- [59] Anonymus (1998) Deutsches Tierärzteblatt, November S. 1093
- [60] Lüders, H. (1992) „Gebräuchliche Medikamente“, In : Heider G, Minreal G (1992) Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Band I Allgemeiner Teil und spezieller Teil 1 Gustav Fischer Verlag Jena und Stuttgart, S. 22 und 223
- [61] Frey, HH, Löscher W (1996) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Verlag Ferdinand Enke Stuttgart, S. 470-472
- [62] Helwig H (1976) „Antibiotika – Chemotherapeutika, Grundlagen – Anwendung – Gefahren“, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [63] Hlavka JJ, Boothe JH (1985) „The Tetracyclines“, Handbook of Experimental Pharmacology Vol 78, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, S. 412-439
- [64] Ausschuß "Rückstandprobleme durch Arzneimitteltherapie" der Deutschen Veterinärischen Gesellschaft e.V. (1981) "Vorschläge der DVG über die Verwendung von Arzneimitteln bei Legehennen im Hinblick auf die Bildung von Rückständen bei Lebensmitteln", Deutsches Tierärzteblatt 29: 480-489
- [65] Kan CA, Petz M (2000) „Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white“, Paper ACS Symposium „Agrochemicals in eggs“ New Orleans, August 20-26, 1999 eingereicht im Journal of Agricultural and Food Chemistry
- [66] McIndoe WM in Bell DJ, Freeman BM (1971) „Physiology and biochemistry of the domestic fowl“, Vol. 3, 1209 – 1220, Academic Press, London/New York, 1971.
- [67] Gilbert AD in Bell DJ, Freeman BM (1971) „Physiology and biochemistry of the domestic fowl“, Vol. 3, 1291 – 1321, Academic Press, London/New York, 1971.
- [68] Ternes W, Acker L, Scholtyssek S (Hrsg.), Ei und Eiprodukte, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1994
- [69] Arnold D, Somogyi A (1986) „Chloramphenicol residues in edible tissues of food animals“ Proceedings of 2<sup>nd</sup> World Congress Foodborne Infection Berlin 832-836 zitiert in [60]

- 
- [70] Pollet RA, Glatz CE, Dyer DC Barnes HJ (1983) „Pharmacokinetics of chlortetracycline potentiation with citric acid in the chicken“, American Journal of Veterinary Research 44: 1718-1721
- [71] Clary BD, Terry RJ, Creger CR (1981) „The potentiation effect of citric acid on aureomycin in turkeys“, Poultry Science 60 : 1209-1212
- [72] Harms RH, Waldroup PW, (1962) „Relationship of the egg formation cycle to antibiotic blood level in laying hens“, Poultry Science 41: 1932-1936
- [73] Lindgren I, Nevalainen T, Kohonen J (1970) „Tetracyclines and egg shell calcification“, Poultry Science 49: 1357-1358
- [74] Bray DJ, Ridlen SF (1967) „Discoloration of Egg shells from feeding high levels of certain tetracyclines“, Poultry Science 46: 258-259
- [75] De Ruyck H, De Ridder, 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 trail“, Food Additives and Contaminants 16 : 47-56
- [76] Bergner-Lang B, Mikisch E (1994) „Zur Bedeutung der 4-Epimeren von Oxytetracyclin-, Tetracyclin- und Chlortetracyclin-Rückständen bei der HPLC-Bestimmung in Lebensmitteln tierischer Herkunft“, Deutsche Lebensmittelrundschau 90: 39-41.
- [77] Durbin CG, DiLorenzo JJ, Randall WA, Wilner J "Antibiotic concentration and duration in animal tissue II. chicken blood, tissues, and eggs", Antibiotics Annual 1953-54 : 428-432
- [78] Raica N, Heywang BW, Kemmer AR (1956) „Antibiotic concentration in eggs from hens on Chlortetracycline supplemented diets", Poultry Science 35: 884-888
- [79] Frye GR, Weiser HH, Winter AR (1958) „Influence of antibiotic feeding on the keeping quality and antibiotic content of poultry products", Poultry Science 37: 633-637
- [80] Brüggemann J, Merckenschlager M, Niesar KH (1963) „Bilanzstudien mit C-14 Chlortetracyclin an der Legehenne unter den Bedingungen der Antibiotikafütterung", Zentralblatt für Veterinärmedizin B10: 631-648
- [81] Illés EM, Szent-Iványi M (1969) „Antibiotic content of eggs laid by hens fed ERRA (oxytetracycline) continuously" Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae 19: 47-51
- [82] Katz SE, Fassbender CA, Dowling JJ (1973) „Oxytetracycline residues in tissues, organs and eggs of poultry fed supplemented rations", Journal of the Association of Official Analytical Chemists 56 : 77-81
- [83] Katz SE, Fassbender CA (1972) „Chlortetracycline residues in eggs from hens on chlortetracycline-supplemented diets", Journal of the Association of Official Analytical Chemists 55: 128- 133

- 
- [84] Pfaendler HR, Stohler W, Schaub H (1973) „Versuche zur Rückstandsbestimmung von Aureomycin in Hühnereiweiß“, *Mitteilungen Lebensmittel-Untersuchung und Hygiene* 64 : 257-261
- [85] Meredith WA, Weiser HH, Winter AR (1965) „Chlortetracycline and oxytetracycline residues in poultry tissues and eggs“, *Applied Microbiology* 13: 86-88
- [86] Yoshida M, Kubota K, Yonezawa S, Nakamura N, Yamaoka R, Yoshimura H (1973) "Transfer of dietary oxytetracycline into eggs and its disappearance from eggs", *Japanese Poultry Science* 10: 254- 260
- [87] Yoshida M, Kubota D, Yonezawa S, Nakamura H, Yamaoka R, Yoshimura H (1973) "Transfer of dietary chlortetracycline into eggs and its disappearance from eggs and from liver", *Japanese Poultry Science* 10: 261- 265
- [88] Anhalt G, Wenzel S, Conrad P (1976) „Modelluntersuchungen zur Rückstandsbildung im Hühnerei nach therapeutischer Verabreichung antibakteriell wirksamer Substanzen“, *Archiv für Lebensmittelhygiene* 27: 201-205
- [89] Frieser J, Gedeck W, Dorn P (1986) „Zum Nachweis und zur Bedeutung von Tetracyclin-Rückständen im Ei“, *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 93: 17-20
- [90] Roudaut B, Moretain JP, Boisseau J (1987) „Excretion of oxytetracycline in eggs after medication of laying hens“, *Food Additives and Contaminants* 4: 297-307
- [91] Roudaut B, Moretain JP, Boisseau J (1989) „Excretion of tetracycline and chlortetracycline in eggs after oral medication of laying hens“, *Food Additives and Contaminants* 6: 71-78
- [92] Yoshimura H, Osawa N, Rasa FSC, Hermawati D, Werdiningsih S, Isriyanthi MR, Sugimori T (1991) „Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking water to laying hens“, *Food Additives and Contaminants* 8: 65-69
- [93] Omija B, Mitema ES, Maitho TE (1994) „Oxytetracycline residue levels in chicken eggs after oral administration of medicated drinking water to laying chickens“, *Food Additives and Contaminants* 11 : 641-647
- [94] Reuter E (1972) „Unerwünschte Wirkungen von Tetracyclinen“, *Medizinische Klinik* 67: 1256-1261
- [95] Fleischle W (1978) „Arzneimittleinsatz in der Geflügelproduktion und Rückstände im Ei und Geflügelfleisch“ *Berichte über Landwirtschaft* 55: 855-864
- [96] Fleischhygienegesetzes vom 8.7.1993, (BGBl. I, S. 1189) in der Fassung vom 22.12.1997 (BGBl. I, S. 3224, 3240)
- [97] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG) vom 19.10.1994 (BGBl., S.3018) in der Fassung vom 5.11.1997 (BGBl. I, S. 2631, 2638)

- [98] EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products : Committee for Veterinary Medicinal Products „Note for guidance: approach towards harmonisation of withdrawal periods“ EMEA/CVMP/036/95 Final  
<http://www.eudora.org/w3/emea.html>
- [99] Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenstände) in der Fassung vom 25.2.1998 (BGBl. I S. 374, 379)
- [100] Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihre Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen (Amtsblatt EG Nr. L 125/10)
- [101] Verordnung über die hygienischen Anforderungen an das Behandeln und Inverkehrbringen von Hühnereiern und roheihaltigen Lebensmitteln (Hühnerei-Verordnung) vom 5. Juli 1994 (BAnz. Nr. 124), zuletzt geändert durch Art. 6, 1 VO zur Änderung tierarzneimittel- und lebensmittelrechtlicher Vorschriften vom 7.7.1998 (BGBl. I S. 1807)
- [102] Verordnung über die hygienischen Anforderungen an Eiprodukte (Eiprodukte-Verordnung) vom 17. Dezember 1993 (BGBl. I, S. 2288), zuletzt geändert durch Art. 4, 1 VO zur Änderung tierarzneimittel- und lebensmittelrechtlicher Vorschriften vom 7.7.1998 (BGBl. I S. 1807)
- [103] Barker SA, Walker CC (1992) „Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods“ *Journal of Chromatography* 624: 195-209
- [104] Kramer J, Carter GG, Wilner AB, Wright WW, Kirshbaum A (1968) „Antibiotic residues in milk, dairy products, and animal tissues: methods, reports, and protocols“, Food and Drug Administration, Department of Health, Education and Welfare, Washington, DC, S. 1-11
- [105] Katz SE, Fassbender CA (1972) „Improved procedures for the determination of Oxytetracyclin in milk, milk products; chicken muscle, liver; and eggs“ *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 7: 229-236
- [106] Nogawa H, Nagura S, Tsuchiya M, Yonezawa (1981) „Residues of tetracycline antibiotics in eggs laid by hens given drinking water medicated“, *Annual Report of the National Veterinary Assay Laboratory* 18: 25-30
- [107] Hamann J (1983) „Untersuchungen über den Nachweis von Tetracyclinen in Milch und Blut“ *Milchwissenschaft*, 38: 73-75
- [108] Honikel KO, Hambloch H, (1976) „Schnelle fluorimetrische Bestimmung von Chlortetracyclin in Fleisch und Knochen“, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 160: 337-346
- [109] Levine J, Garlock EA, Fischbach H (1949) „The chemical assay of Aureomycin“, *Journal of the American Pharmaceutical Association* 38: 473-475



- 
- [110] Scales B, Assinder DA (1973) „Fluorometric estimation of oxytetracycline in blood and plasma“, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 62: 913-917
- [111] Murthy VV, Goswani SL (1973) „A modified fluorometric procedure for the rapid estimation of oxytetracycline in blood“, *Journal of Pathology* 26: 548-550
- [112] Hayes JE, DuBuy HG (1964) „A simple method for quantitative estimation of tetracycline antibiotics“, *Analytical Biochemistry* 7: 322-327
- [113] Ibsen KH, Sanders RL, Urist ME (1963) „Fluorometric determination of oxytetracycline in biological material“, *Analytical Biochemistry* 5: 505-514
- [114] Wilson DM, Lever M, Brosnan EA, Stillwell A (1972) „A simplified tetracycline assay“, *Clinica Chimica Acta* 36: 260-261
- [115] Lever M (1972) „Improved fluorometric determination of tetracyclines“, *Biochemical Medecine* 6: 216-222
- [116] Poiger H, Schlatter C (1976) „Fluorimetric determination of tetracyclines in biological materials“, *Analyst* 101: 808-814
- [117] Tsuji K, Robertson JH (1973) „Formation of trimethylsilyl derivatives of tetracyclines for separation and quantification by gas-liquid chromatography“, *Analytical Chemistry* 45: 2136-2140
- [118] Tavares MFM, McGuffin VL (1994) „Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis“, *Journal of Chromatography A* 686: 129-142
- [119] Pesek JJ, Matyska MT (1996) „Separation of tetracyclines by high-performance capillary electrophoresis and capillary electrochromatography“, *Journal of Chromatography* 736: 313-320
- [120] Croubles S, Baeyens W, Dewaele C, Van Peteghem C (1994) „Capillary electrophoresis of some tetracycline antibiotics“, *Journal of Chromatography A* 673: 267-274
- [121] Tjørnelund J, Hansen SH (1996) „Determination of impurities in tetracycline hydrochloride by non-aqueous capillary electrophoresis“, *Journal of Chromatography A* 737: 291-300
- [122] Li YM, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J (1996) „Analysis of demeclocycline by capillary electrophoresis“, *Journal of Chromatography A* 740: 119-123
- [123] Van Schepdael A, Van den Bergh I, Roets E, Hoogmartens J (1996) „Purity control of oxytetracycline by capillary electrophoresis“, *Journal of Chromatography A* 730: 305-311
- [124] Chen YC, Lin CE (1998) „Migration behaviour and separation of tetracycline antibiotics by micellar electrokinetic chromatography“, *Journal of Chromatography A* 802: 95-105

- [125] Chen CL, Gu X (1995) „Determination of tetracycline residues in bovine milk, serum, and urine by capillary electrophoresis“, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 78: 1369-1377
- [126] Farrington WHH, Tarbin T, Bygrave J, Shearer G (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
- [127] Carson MC (1993) „Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk using metal chelate affinity chromatography“, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* 76: 329-334
- [128] Botsoglou NA, Vassilopoulos, Kufidis DC (1984) „Reversed –phase high pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines in eggs“, *Chimika Chronika, New Series* 13: 37-44
- [129] Sharma JP, Bevill RF (1978) „Improved high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of tetracyclines in plasma, urine and tissues“, *Journal of Chromatography* 166: 213-220
- [130] Chan W, Salisbury CDC (1993) „Determination of tetracycline antibiotics in eggs.“, In: Haagsma N, Ruiters A, Czedik-Eysenberg PB: *Residues of veterinary drug in food. Bd 1, Veldhoven: Proceedings of the Euro residue II, 1993, S. 238-240*
- [131] Oka H, Matsumoto H, Uno K, Harada K, Kadowaki S, Suzuki M, Harada K, Kadowaki S, Suzuki M (1985) „Improvement of chemical analysis of antibiotics VIII application of prepared C18 cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver“, *Journal of Chromatography* 325: 265-274
- [132] Blanchflower WJ, McCracken RJ, Rice DA (1989) „Determination of Chlortetracycline residues in tissues using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection“, *Analyst* 114: 421- 423
- [133] Klein E, Schmidt HH, Mann W, (1994) „Bestimmung von Rückständen an Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in Muskulatur und Niere vom Schwein 1.: Erfahrungen bei Laborvergleichsuntersuchungen“, *Lebensmittelchemie* 48: 67-70
- [134] Klein E, Mann W (1996) „Bestimmung von Rückständen an Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in Muskulatur und Niere vom Schwein 2.Mitteilung: Auswertung einer Laborvergleichsuntersuchung“, *Lebensmittelchemie* 50: 33-38
- [135] Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (1995) „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* 38 : 410-413
- [136] Cooper AD, Stubbings GWF, Kelly M, Tarbin JA, Farrington WHH, Shearer G (1998) „Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography-high performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products“, *Journal of Chromatography A* 812: 321 - 326

- [137] Kondo F, Morikawa S, Tateyama S (1989) „Simultaneous determination of six tetracyclines in bovine tissue, plasma and urine by reverse-phase high-performance liquid chromatography“, *Journal of Food Protection* 52: 41- 44
- [138] Tyczkowska K, Aronson AL (1986) „Simultaneous liquid chromatographic determination of some tetracyclines in serum“, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69: 760-762
- [139] Hermansson J (1982) „Rapid determination of tetracycline and lumecycline in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography“, *Journal of Chromatography* 232: 385-393
- [140] Martinez EE, Shimoda W (1988) „Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in animal feeds“, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 71: 477-480
- [141] Martinez EE, Shimoda W (1989) „Liquid chromatographic determination of epimerization of chlortetracycline residue to 4-epi-chlortetracycline residue in animal feed, using McIlvain´s buffer as extractant“, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72: 848-850
- [142] Holland DC, Faul KC, Roybal JE, Munns RK (1991) „Liquid chromatographic determination of chlortetracycline hydrochloride in ruminant and poultry/swine feeds“, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 74: 780-784
- [143] Lingeman H, McDonald RD, Brinkman UAT (1991) „Guidelines for bioanalysis using column liquid chromatography“, *Trends in analytical Chemistry* 10: 48-59.
- [144] Campíns-Falcó P, Herráez-Hernández R, Sevillano-Cabeza A (1993) „Column-switching techniques for high-performance liquid chromatography of drugs in biological samples“, *Journal of Chromatography B* 619: 177-190
- [145] Erni F, Keller HP, Morin C, Schmitt M (1981) „Application of column switching in high performance liquid chromatography to on-line sample preparation for complex separation“, *Journal of Chromatography* 204: 65-76
- [146] Application Info No. 30, Spark Holland, P.O. Box 388, 7800 AJ Emmen, The Netherlands, Tel. 05910-31700, Fax 05910-30035
- [147] Stubbings GWF, Tarbin JA, 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 B* 679: 137-145
- [148] Aerts MML, Beek WMJ, Brinkman UAT (1988) „Monitoring of veterinary drug residues by a combination of continuous flow techniques and column-switching high-performance liquid chromatography. 1. Sulfonamides in egg, meat and milk using post-column derivatization with dimethylaminobenzaldehyde“, *Journal of Chromatography* 435: 97-112

- [149] Aerts MML, Beek WMJ, Brinkman UAT (1990) „On-line combination of dialysis and column-switching liquid chromatography as a fully automated sample preparation technique for biological samples“, *Journal of Chromatography* 500: 453-468
- [150] van Leeuwen W, van Gend HW (1988) „Determination of amprolium in egg yolk and muscle tissue (chicken) by HPLC with post-column reaction and fluorimetric detection, using on-line clean-up and pre-concentration steps“, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 186: 500-504
- [151] 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
- [152] Oeser AR, Petz M in: Haagsma N, Ruiter A, *Proceedings of the EuroResidue III Conference*, Veldhoven, The Netherlands, 6-8 May 1996, p. 765-769.
- [153] Oeser AR (1994) „Gewinnung von Referenzmaterial mit Rückständen an Nitrofuranen in Hühnereiern und Stabilitätsuntersuchungen mit einem automatischen Probenaufarbeitungssystem“, *Dissertation Univ. GH Wuppertal*, Verlag Mainz, Aachen
- [154] Tuinstra LGMT, Kienhuis PGM, Traag WA, Aerts MML, Beek WMJ (1989) „Fully Automated Column-Switching HPLC Determination of Aflatoxin M1 in Milk Using Dialysis as Sample Preparation“, *Journal of High Resolution Chromatography* 12: 709-713
- [155] Andresen AT, Rasmussen KE (1990) „Automated on-line dialysis and column-switching HPLC determination of flumequine and oxolinic acid in fish liver“, *Journal of Liquid Chromatography* 13 : 4051-4065
- [156] Agasøster T (1991) „Automated analysis of oxolinic acid and flumequine in salmon whole blood and plasma using dialysis combined with trace enrichment as on-line sample preparation for high-performance liquid chromatography“, *Journal of Chromatography* 564: 171-179
- [157] Eng GY, Maxwell RJ, Cohen E, Piotrowski EG, Fiddler W (1998) „Determination of flumequine and oxolinic acid in fortified chicken tissue using on-line dialysis and high – performance liquid chromatography with fluorescence detection“, *Journal of Chromatography A* 799: 349-354
- [158] Agasøster T, Rasmussen KE (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
- [159] Agasøster T, Rasmussen KE (1992) „On-line dialysis, liquid chromatography and post-column reaction detection of oxytetracycline in salmon muscle extracts“, *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 10: 349-354

- [160] Snippe N, Van de Merbel NC, Ruiten FPM, Steiger OM, Lingeman H, Brinkman UAT (1994) „Automated column liquid chromatographic determination of amoxicillin and cefadroxil in bovine serum and muscle tissue using on-line dialysis for sample preparation“, *Journal of Chromatography B* 662: 61-70
- [161] Maxwell RJ, Cohen E, Donoghue DJ (1999) „Determination of Sarafloxacin Residues in Fortified and Incubated Eggs using on-line microdialysis and HPLC/Programmable fluorescence Detection“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1563-1567
- [162] Van de Merbel NC, Hageman JJ, Brinkman UAT (1993) „Review : Membrane-based sample preparation for chromatography“, *Journal of Chromatography* 634: 1- 29
- [163] Cooper JDH, Turnell DC, Green B, Verillon F (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
- [164] Moats WA (1986) „Effect of the silica support of bonded reversed-phase columns on chromatography of some antibiotic compounds“, *Journal of Chromatography* 366 : 69-78
- [165] Knox JH, Jurand J (1979) „Mechanism of reversed-phase separation of tetracyclines by high-performance liquid chromatography“, *Journal of Chromatography* 186: 763-782
- [166] Degroodt JM, Wyhowski B, De Bukanski, Srebnik S (1993) „Multiresidue analysis of tetracycline in kidney by HPLC and photodiode array detection“, *Journal of Liquid Chromatography* 16: 3515-3529
- [167] Croubles S, Van Peterghem C (1994) „Sensitive spectrofluorimetric determination of tetracycline residues in bovine milk“, *Analyst* 119 : 2713-2716
- [168] McCracken RJ, Blanchflower WJ, Haggan SA, Kennedy D (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
- [169] Ahmed BM und Jee RD (1984) „Fluorescence investigation of Isochlortetracycline: Ground-state and excited-state acid-base equilibria“, *Analytica Chemica Acta* 156: 263-271
- [170] Blanchflower WJ, McCracken RJ, Rice DA (1989) „Determination of Chlortetracycline residues in tissues using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection“, *Analyst* 114: 421-423
- [171] Hoffman DR (1966) „The mass spectra of tetracyclines“, *Journal of Organic Chemistry* 31: 792-796
- [172] Niessen WMA, Tinke AP (1995) „Review : Liquid chromatography-mass spectrometry general principles and instrumentation“, *Journal of Chromatography A* 703: 37-57

- [173] Oka H, Ito Y, Ikai Y, Kagami T, Harada K (1998) „Review : Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods“, *Journal of Chromatography A* 812: 309-319
- [174] Kijak PJ, Leadbetter MG, Thomas MH, Thompson EA (1991) „Confirmation of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline residues in milk by particle beam liquid chromatography/mass spectrometry“, *Biological Mass Spectrometry* 20: 789-795
- [175] Carson MC, Ngoh MA, Hadley SW (1998) „Confirmation of multiple residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography – particle beam mass spectrometry“, *Journal of Chromatography B* 712: 113-128
- [176] Blanchflower WJ, McCracken RJ, Haggan AS, Kennedy G (1997) „Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry“, *Journal of Chromatography B* 692: 351-360
- [177] Oka H, Ikai Y, Ito Y, Hayakawa J, Harada KI, Suzuki M, Odani H, Maeda K, (1997) „Improvement of chemical analysis of antibiotics XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissue by electrospray high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry“, *Journal of Chromatography B* 693: 337-344
- [178] Weimann A, Bojesen G, Nielsen P (1998) „Analysis of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline in plasma extracts by electrospray tandem mass-spectrometry and by liquid chromatography“, *Analytical Letters* 31: 2053-2066
- [179] Fürst P (1998) „Anwendung der LC/MS bei der Analytik von Lebensmitteln und Kosmetika“ *Lebensmittelchemie* 52: 63-78
- [180] Entscheidung der Kommission (93/256/EWG) 14. April 1993 über die Verfahren zum Nachweis von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung (Amtsblatt EG Nr. L 118/64)
- [181] Ryan JJ, Dupont JA, (1974) „Chemical analysis of tetracycline residues in animal tissues“, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 57: 828-831
- [182] Karel Allin, „Chemische Bestimmung von Breitband-Antibiotika in Lebensmitteln tierischer Herkunft“, Dissertation, Technische Universität Berlin, 1976
- [183] Persönliche Mitteilung an Prof. Dr. Petz im Dezember 1995 von Prof. Dr. Dr. H. Schmidt Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.
- [184] Vogelgesang J (1992) "Statistiksoftwareprogramm Kalibo<sup>®</sup>" Avenue des Tranquets 152, B-1150 Brüssel
- [185] DIN 32645 (1994) "Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung", Deutsches Institut für Normung e. V., Beuth Verlag GmbH, Berlin

- [186] Walther HF, Holtz KH, Frehse H, Gorbach S, Thier HP (1991) "Ableitung von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze nach dem Eichkurvenverfahren", In: Deutsche Forschungsgemeinschaft: Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 11. Lieferung
- [187] Vogelgesang J, Hädrich J (1998) "Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners", *Accredit Quality Assurance* 3: 242-255
- [188] Persönliche Mitteilung von Prof. Dr. E. Siewert, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin
- [189] Miller MW, Hochstein FA (1962) „Isolation and characterisation of two new tetracycline antibiotics“, *Journal of Organic Chemistry* 27 (1962) 2525 -2528
- [190] Keiner J, Hüttenrausch R, Poethke W (1967) „Vorkommen und Verhalten von 2-Acetyl-2-decarboxamido-Derivaten der Tetracyclin-Antibiotika“, *Archiv der Pharmazie* 300 : 840-844
- [191] Mitscher LA (1978) „The chemistry of the tetracycline antibiotics“, Marcel Dekker, New York S.123
- [192] Cooper AD, Tarbin JA, Farrington WHH, Shearer G (1998) „Effects of extraction and spiking procedures on the determination of incurred residues of oxytetracycline in cattle kidney“ *Food Additives and Contaminants* 15: 645-650
- [193] Uihlein M (1986) „Sample Pretreatment and Cleanup“ in Engelhardt H (Editor) „Practice of High Performance Liquid Chromatography“ Springer Verlag, Berlin, New York, Tokyo S. 159-178
- [194] Bergmeyer HU, „Methoden der enzymatischen Analyse“, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Auflage 1974
- [195] Community Bureau of Reference (1994) „Guidelines for the production and certification of BCR reference materials“, In: European Commission Directorate General XII for Science, Research and Development, Brüssel, B, S. 1-54
- [196] Brüggemann J, Lösch U, Merkschlager M, Offterdinger (1963) „Ablagerung von Tetracyclin im Knochengewebe von Tieren bei dem Zusatz von Tetracyclin zum Futter“ *Zentralblatt für Veterinärmedizin A* 13: 59.74
- [197] Owen JJT (1962) „Localisation of tetracycline in bone“, *The Lancet*, October 13: 780-781
- [198] Ellerbroek L, Kestel L, Kolb H, Weise E (1997) „Nachweis von Tetracyclinrückständen in maschinell entbeintem Schweinefleisch (Separatorenfleisch) unter Berücksichtigung technologischer und lebensmittelhygienischer Aspekte“ *Tätigkeitsbereich des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin* S. 141-142
- [199] Kühne M (1998) „Untersuchungen zum Vorkommen von Tetracyclin-Rückständen bei Puten“ *Fleischwirtschaft* 78: 369-370

- [200] Belitz HD und Grosch W (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 4. Aufl., Springer Verlag, Berlin, S. 504
- [201] Senser F, Scherz H (1991) Der kleine „Souci-Fachmann-Kraut“ Lebensmitteltabelle für die Praxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1991, 2. Auflage

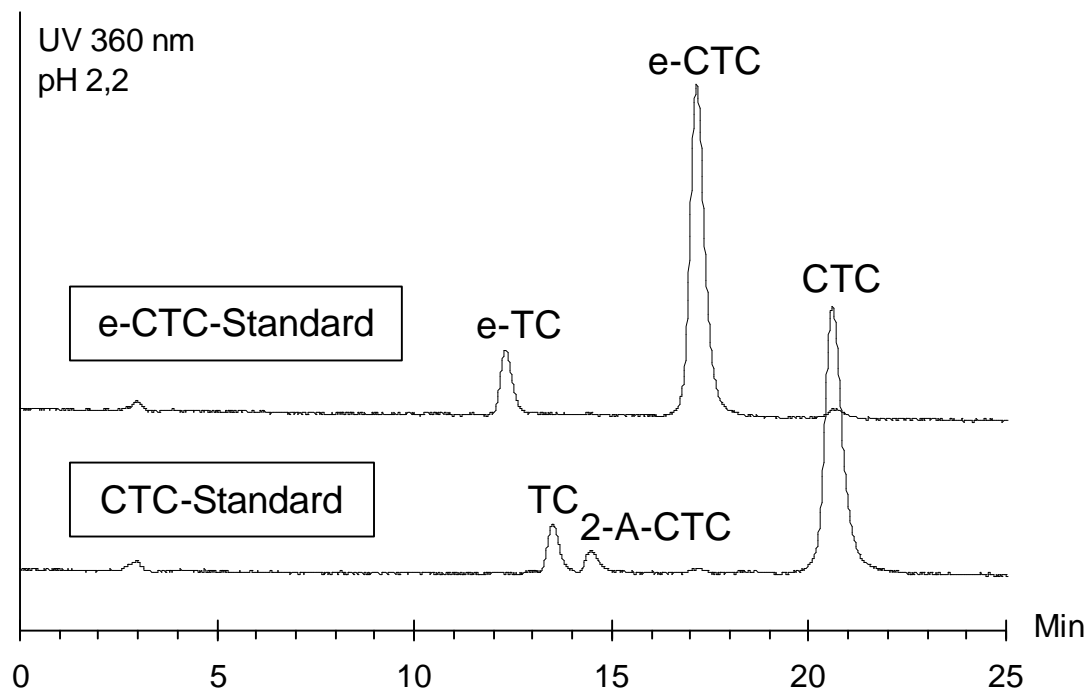


## 12. Anhang

### 12.1 Untersuchungen zum Chlortetracyclin, Isochlortetracyclin, und Apo-Oxytetracyclin-Standard

#### Untersuchungen zum CTC-Standard

Die Quantifizierung des CTC findet mit Hilfe von käuflichen Standards statt. Die kommerziell erhältlichen CTC-Standards weisen mehr als 5 % Verunreinigungen auf.



**Abb. 77: Reinheit des bei Medikationsstudien eingesetzten CTC- Standards (Sigma) und des e-CTC- Standards (Acros Organics)**

Die Standardsubstanz CTC, Abb. 77, von der Firma Sigma Aldrich (Lot 78 F-0022), die auch in den Medikationsstudien verwendet wurde, enthält neben seinem 4-Epimer auch TC und eine weitere Substanz, die aufgrund von Literaturstellen [189-190] vorläufig als 2-Acetyl-2-decarboxyamido-Chlortetracyclin bezeichnet wird. Eigene Untersuchungen zur Identifizierung dieser Verunreinigung waren erfolglos. Der e-CTC Standard der Firma Acros Organics (Lot 72475/1) enthält als Verunreinigung e-TC. Die Abb. 77 zeigt die Chromatogramme dieser Standard-Substanzen. Auch das CTC anderer Hersteller (Riedel de Haen) enthält TC. Für die Medikationsstudien wurde daher das preisgünstigste Chlortetracyclin verwendet, welches das der Firma Sigma Aldrich (Lot 16H0899) war.

Tab. 53 gibt den Gehalt an TC bzw. an e-TC bezogen auf die Gesamtpeakfläche von e-CTC und CTC der beiden Chromatogramme von Abb. 74 wieder.

Neben diesen bei 360 nm UV detektierbaren Substanzen wurde der Standard auch auf das 6-Desmethylchlortetracyclin und auf die fluoreszierenden Iso-Derivate des CTC geprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 56 zusammengestellt.

	<b>e-CTC Standard Acros Organics %- Anteil des Gesamtflächenwertes Lot 72475/1</b>	<b>CTC Standard Sigma Aldrich %- Anteil des Gesamtflächenwertes Lot 16H0899</b>
e-ICTC	--	--
ICTC	--	--
DM-ICTC	--	--
DM-CTC	--	--
e-TC	12,6	--
TC	--	10,3
2-Acetyl-2-decarboxyamido- chlortetracyclin*	--	4,5
e-CTC	84,8	0,8
CTC	2,6	84,4

\* Vorläufige Identifizierung nach Keiner et al.[190]. Aufgrund des UV-Spektrums und der Retentionszeit, kann es sich bei dieser Substanz auch um das Epi-6-Desmethyl-Chlortetracyclin handeln, mittels MS-MS konnte die Anwesenheit von N-Desmethylchlortetracyclin im Standard ausgeschlossen werden, die Anwesenheit des Isochlortetracyclins und des Desmethylisochlortetracyclins im Standard konnte mittels FLD ausgeschlossen werden.

**Tab. 56: Vergleich der beiden Standards e-CTC (Acros Organics) und CTC (Sigma Aldrich)**

Die Peakflächen des Epimers wurde aufgrund der gleichen UV-Spektren von Epimer und Muttersubstanz über die Absorptionskoeffizienten der Muttersubstanz quantifiziert. Die Standards der Firma Acros Organics wurden nur zur Zuordnung der Peaks in den Chromatogrammen und nicht zur Quantifizierung herangezogen wurden.

## Untersuchungen zum Isochlortetracyclin-Standard

### Isochlortetracyclin

Der käuflich erhältliche ICTC-Standard (Acros Organics Lot AO12498101) enthält, bezogen auf Gesamtisochlortetracyclin ( $\Sigma(\text{ICTC} + \text{e-ICTC})$ ), 10 % an 4-Epi-Isochlortetracyclin und kein nachweisbares Chlortetracyclin.

### Epi-Isochlortetracyclin

Das e-ICTC ist nicht als Standard käuflich erhältlich. Die Identifizierung der Peaks für e-ICTC und ICTC erfolgte aufgrund der Ausbildung des Verhältnisses von 60 zu 40 bei dem

beide Formen bei pH 2,2 im Gleichgewicht stehen. Die Zunahme des als ersten eluierenden Substanzpeaks von ursprünglich 10 % auf 60 % am Gesamtisochlortetracyclin ( $\Sigma$ (e-ICTC + ICTC)) wurde in Analogie zu den anderen Tetracyclinen als Epimerisierung aufgefaßt. Die Epimerisierung war innerhalb eines Zeitraumes von 3 Wochen bei 6°C pH 2,2 in 0,01 mol/l Oxalsäure zu beobachten. Eine genaue Untersuchung der Reaktionskinetik zur Bildung des Epimers wurde nicht durchgeführt. Dem als zuerst eluierenden Peak wurde die Struktur des e-ICTC zugeordnet. Mittels LC-MS-MS und UV-Spektren bei pH 2,2 und pH 12,0 wurde überprüft, daß es sich bei dem zuerst eluierenden Peak um eine strukturanaloge Substanz zum ICTC handelt.

### Untersuchungen zum **$\alpha$** - und **$\beta$** -apo-Oxytetracyclin-Standard

Die Retentionszeit des  $\beta$ -apo-OTC ist mit der Retentionszeit des OTC identisch, so daß bei Anwesenheit von OTC nur auf die Existenz des  $\alpha$ -apo-OTC geprüft werden kann. Bei im Kühlschrank bei 6°C für 3 Monate gelagerten Standardlösungen des  $\beta$ -apo-OTC, sowie bei einer Standardlösung, die beide Apo-Oxytetracycline enthielt, wurde festgestellt, daß das Epimerisierungsgleichgewicht auf der Seite des  $\alpha$ -apo-OTC liegt.

Es wurde  $\alpha$ -apo-OTC (Acros Organics, Lot AO11419801) und  $\beta$ -apo-OTC (Acros Organics Lot AO11424701) für diese Untersuchungen verwendet.

## 12.2 DAD-Spektrum des Fließmittels

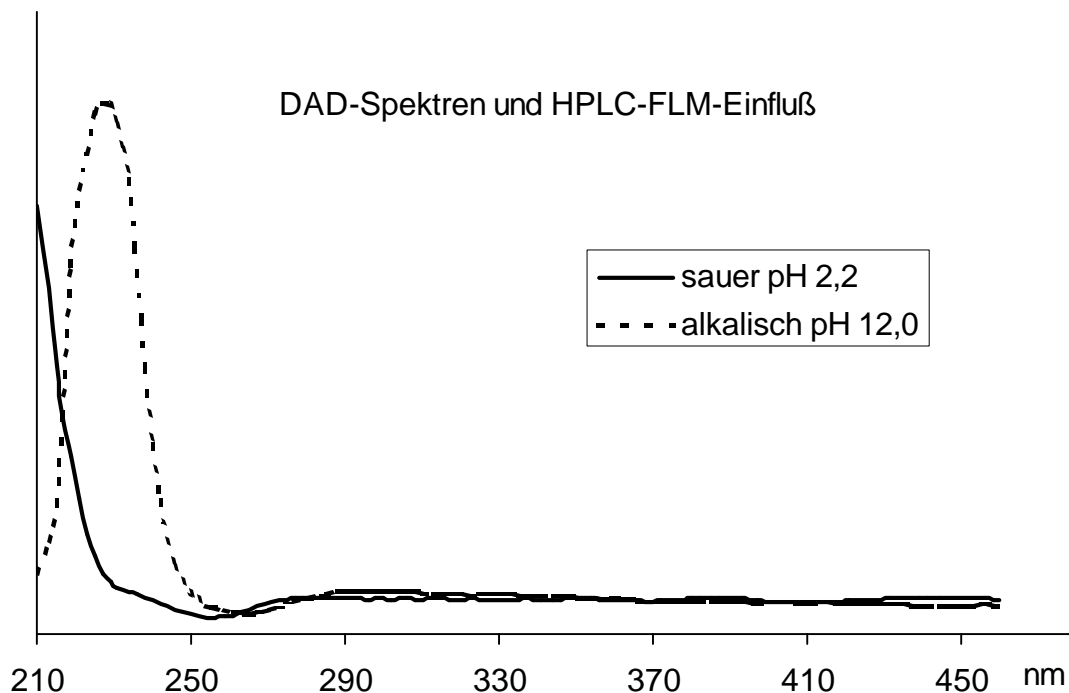
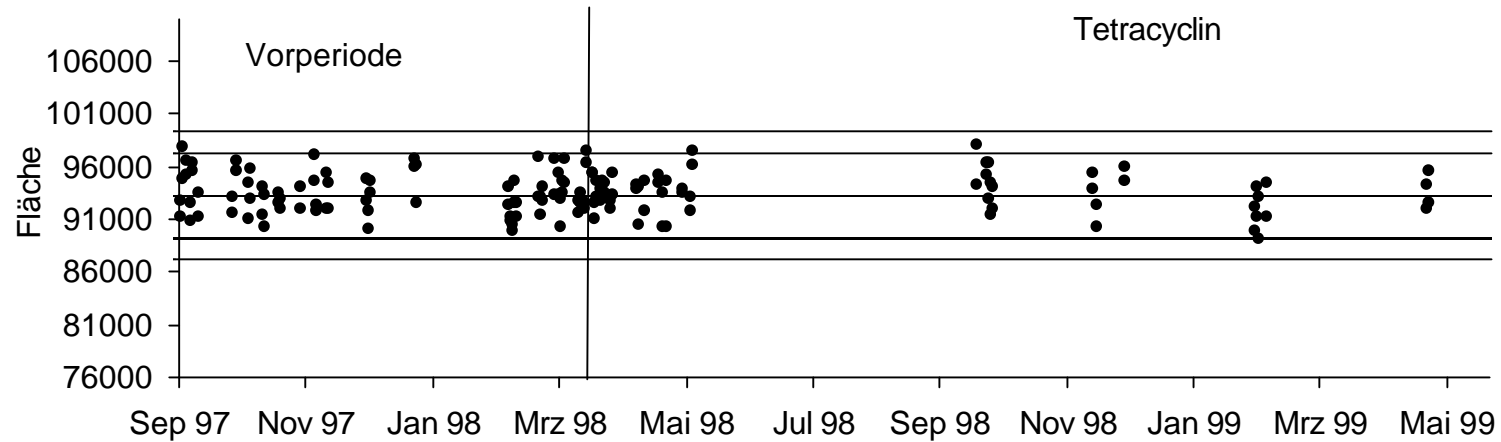
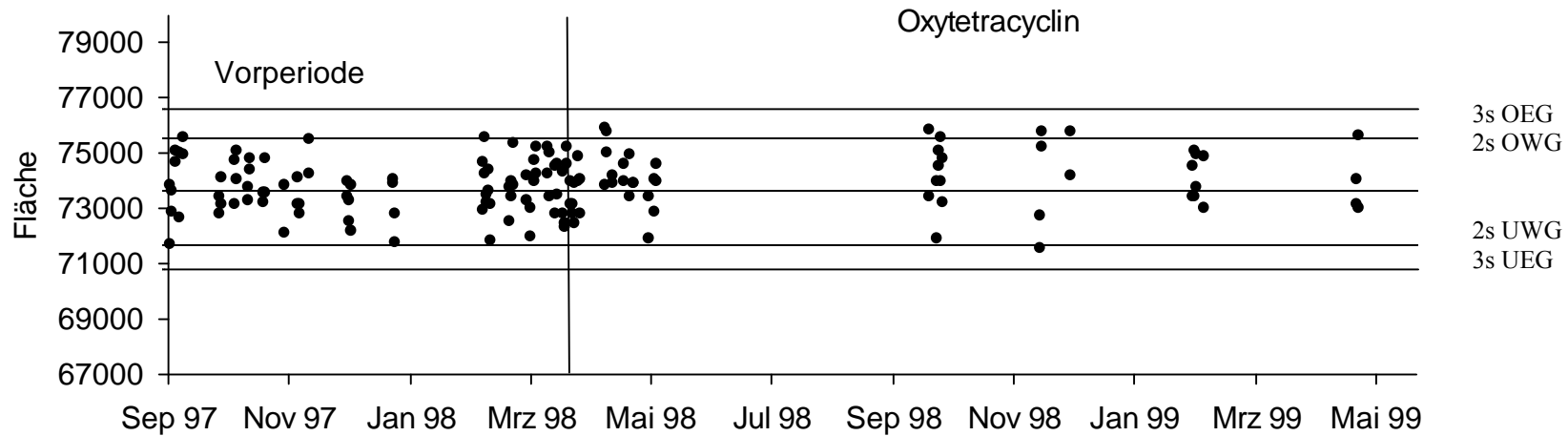
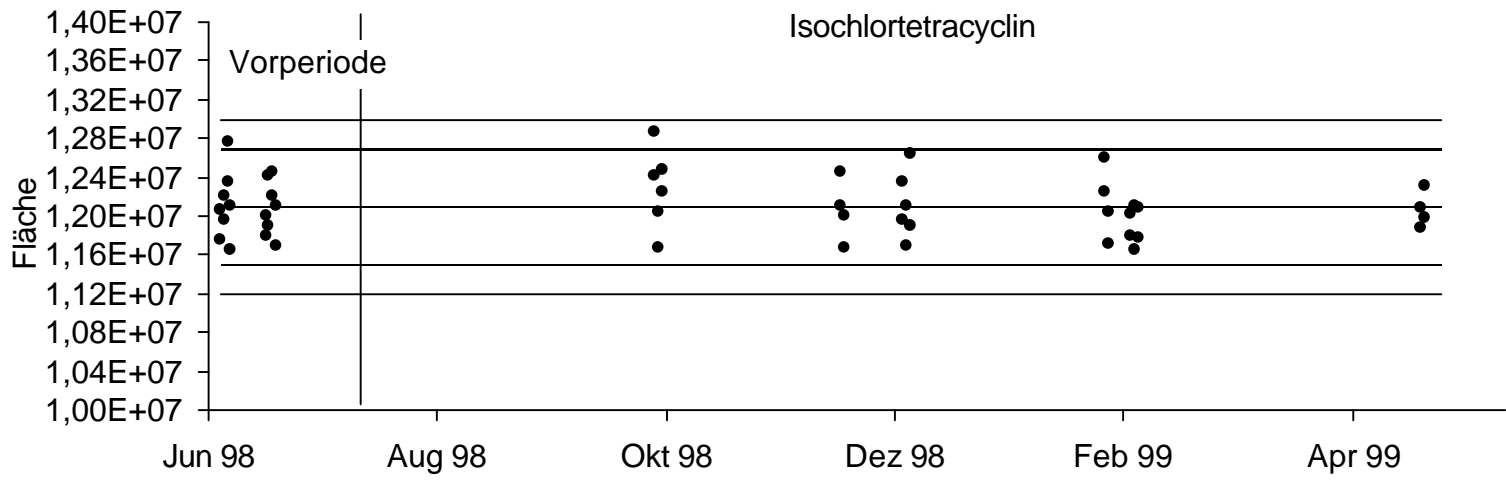
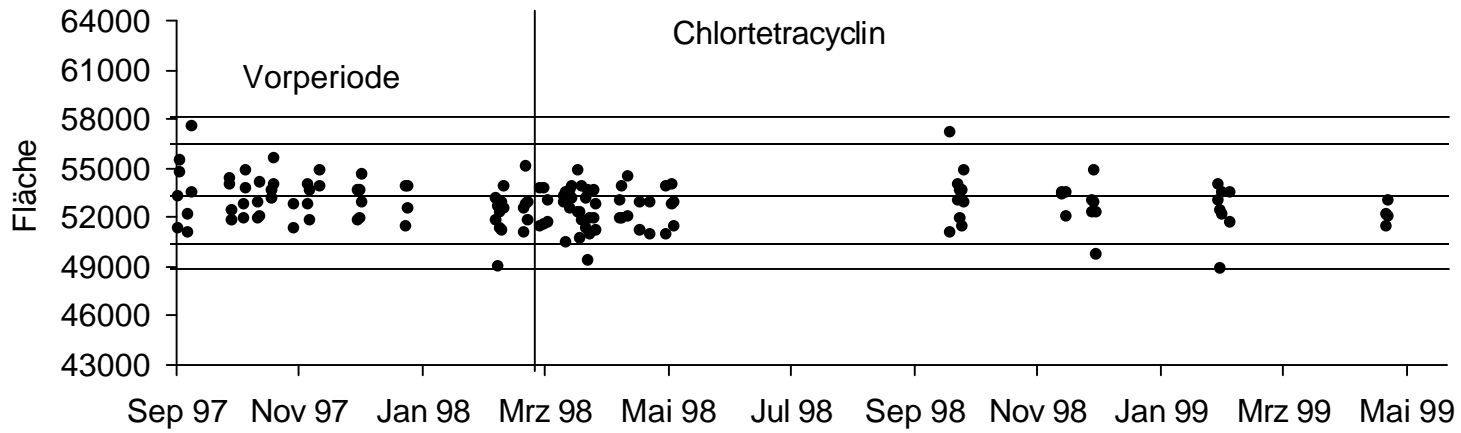


Abb. 78: DAD-Spektrum des Fließmittels : bei pH 2,2 = Fließmittel I und bei pH 12,0 nach pH-Wert-Einstellung mit einem Natrium-Glycin-Puffer

### 12.3 Flächenwerte-Regelkarten von Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin, Isochlortetracyclin für dotierte Volleipproben



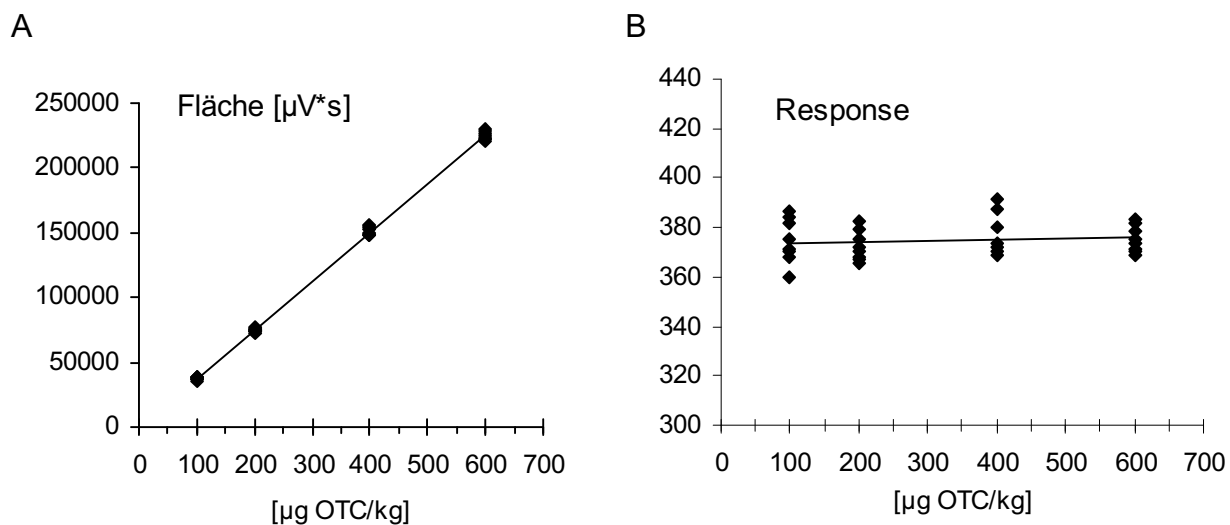


## 12.4 Kalibriergeraden und Response-Werte

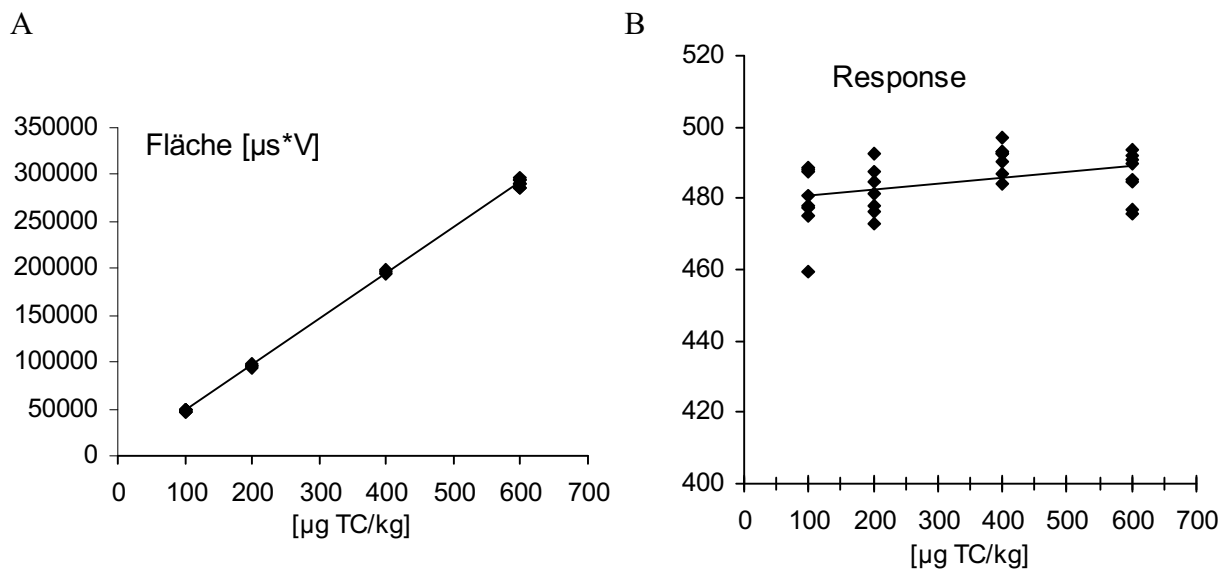
Für die **graphische Darstellung** der Kalibriergeraden wurden die Konzentrationen der dotierten Proben gegen die erhaltenen Peakflächen aufgetragen. Um auf Linearität, speziell im unteren Konzentrationsbereich zu prüfen, wurde der Response-Wert (Peakfläche/Konzentration) gegen die Konzentration aufgetragen. Der parallele Verlauf der Kurve zur x-Achse zeigt, daß die Methode über den gewählten Konzentrationsbereich linear war und damit auch konstante Wiederfindungen erreicht wurden.

### 12.4.1 Detektion bei UV 360 nm pH 2,2 und Fluoreszenz 350/420 nm pH 12,0

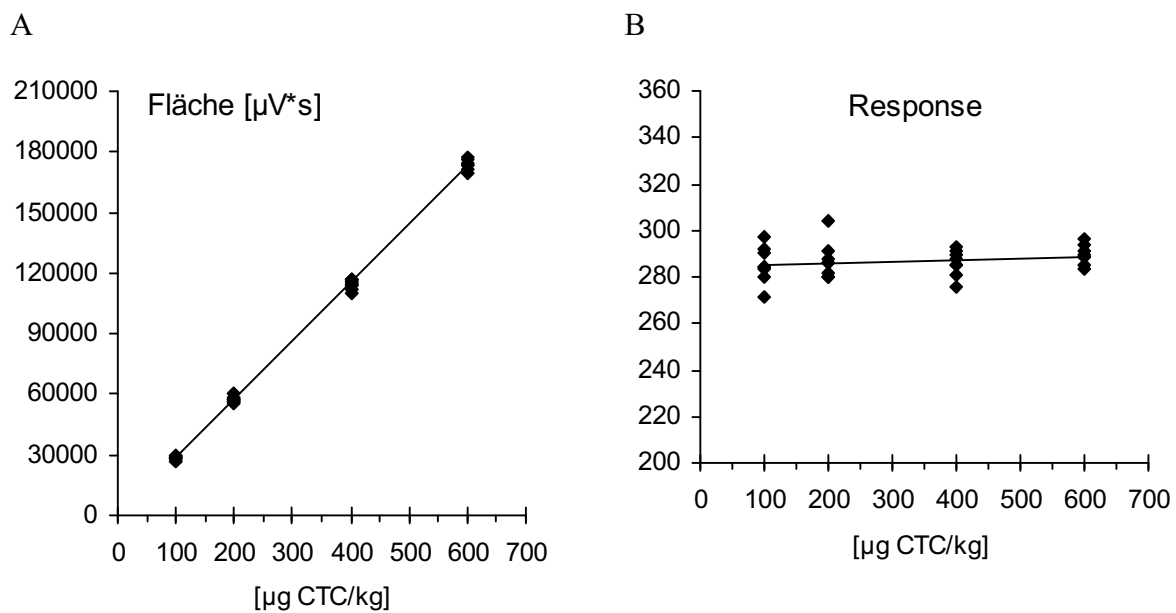
Für jeden Analyten : OTC, TC, CTC und ICTC in Wässrige Lösung, Vollei, Eigelb und Eiklar jeweils verdünnt mit PVL wird eine Kalibriergerade und die Response-Werte dargestellt, siehe Abb. 79 bis 83.



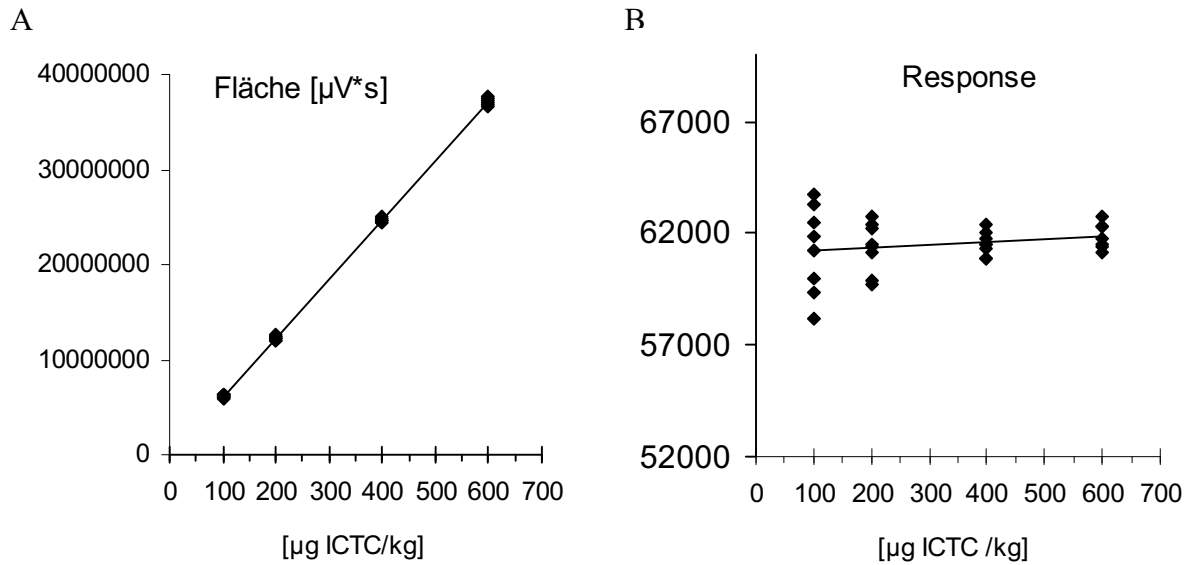
**Abb. 79a: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von OTC**  
*Extraktion aus wässriger Lösung nach Verdünnung mit PVL*



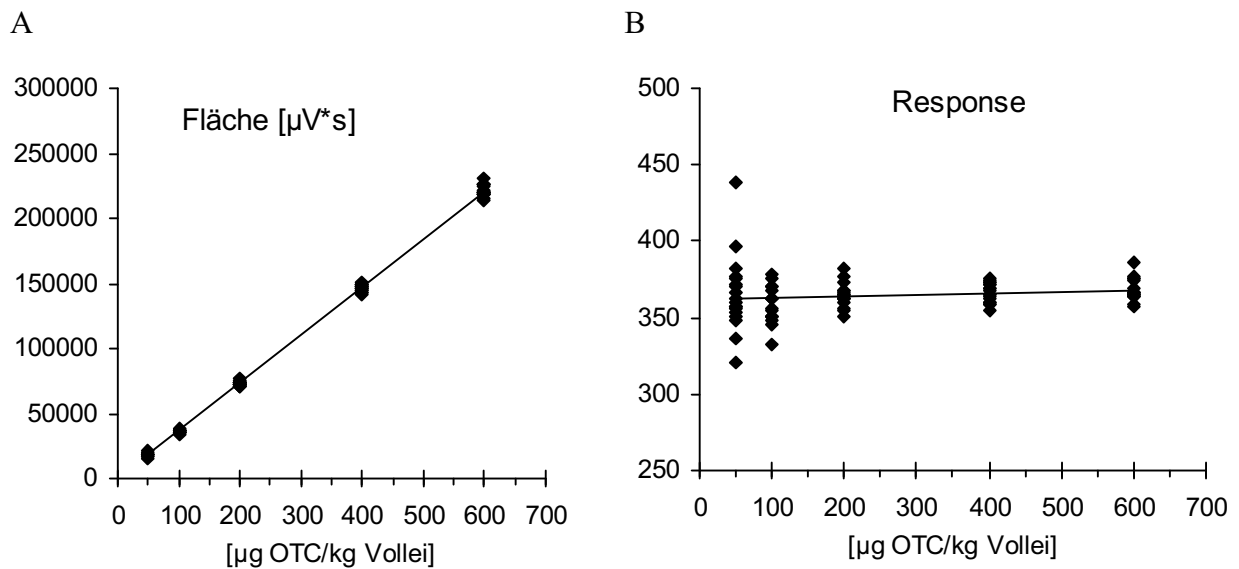
**Abb. 79b: Kalibriergeraden (A) und des Response (B) von TC und e-TC**  
Extraktion aus wässriger Lösung nach Verdünnung mit PVL



**Abb. 79 c: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von CTC und e-CTC**  
Extraktion aus wässriger Lösung nach Verdünnung mit PVL

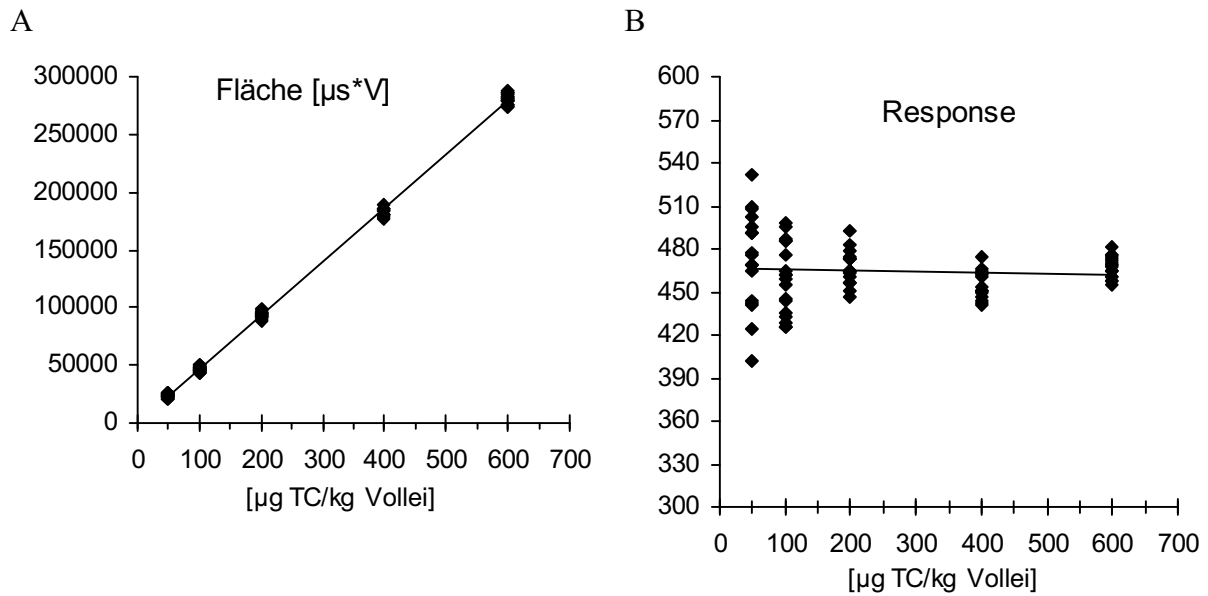


**Abb. 79d: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von ICTC und e-ICTC. Extraktion aus wässriger Lösung nach Verdünnung mit PVL**

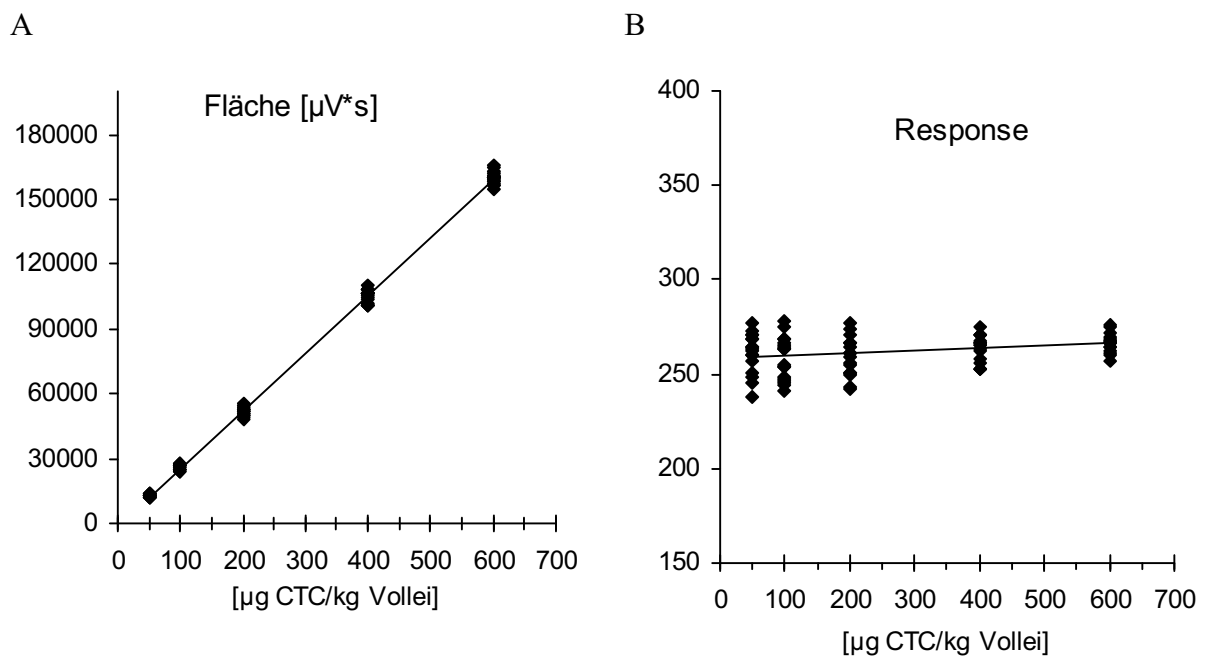


**Abb. 80a: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von OTC. Extraktion aus Vollei**

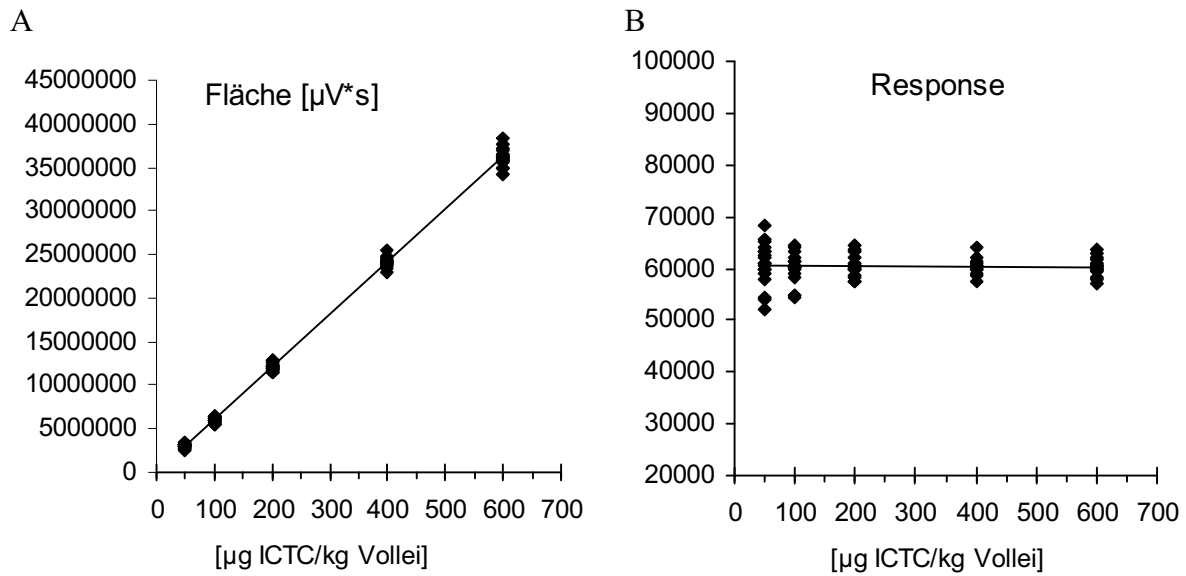




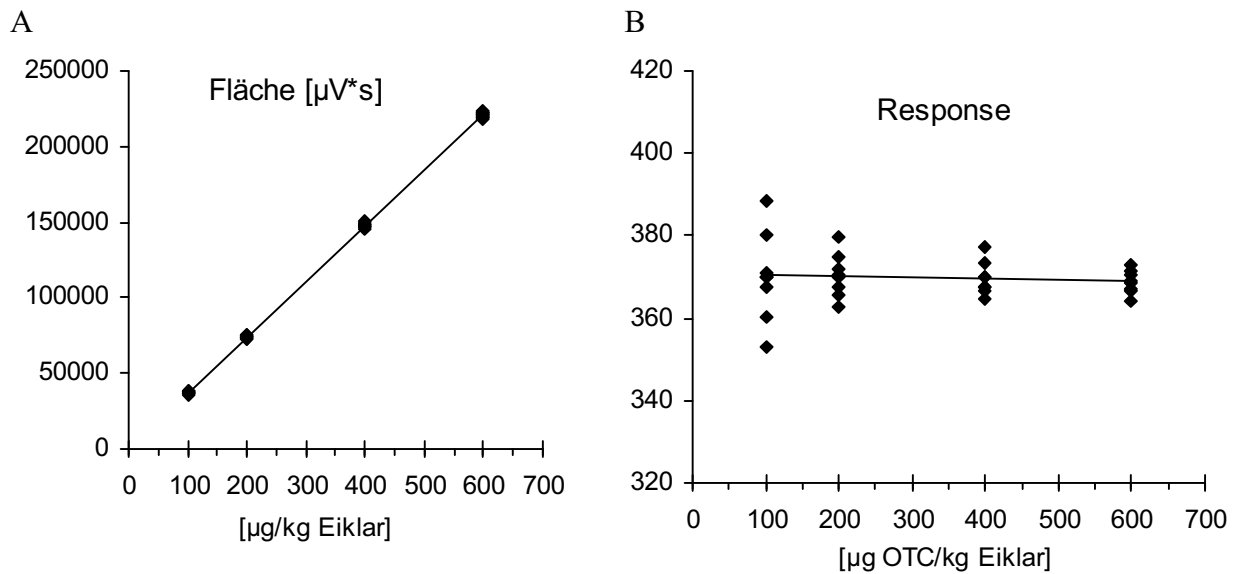
**Abb. 80b:** Darstellung der Kalibriergeraden (A) und Response-Werte (B) von TC und e-TC. Extraktion aus Vollei.



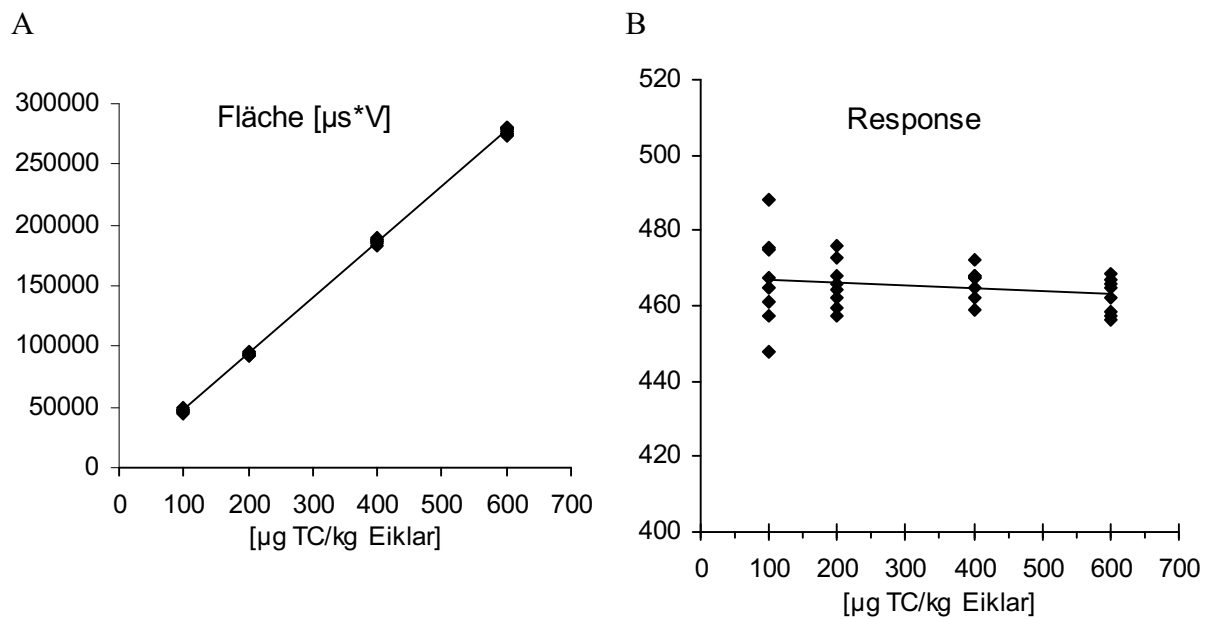
**Abb. 80c:** Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von CTC. Extraktion aus Vollei



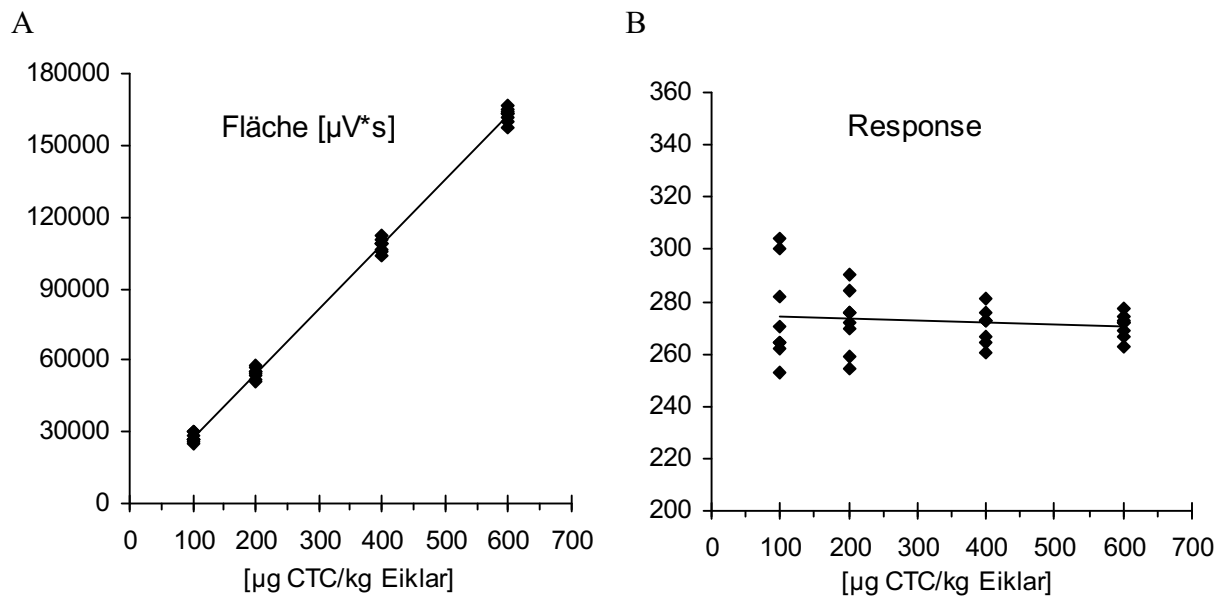
**Abb. 80d: Kalibriergerade (A) und Response (B) von ICTC und e-ICTC. Extraktion aus Vollei.**



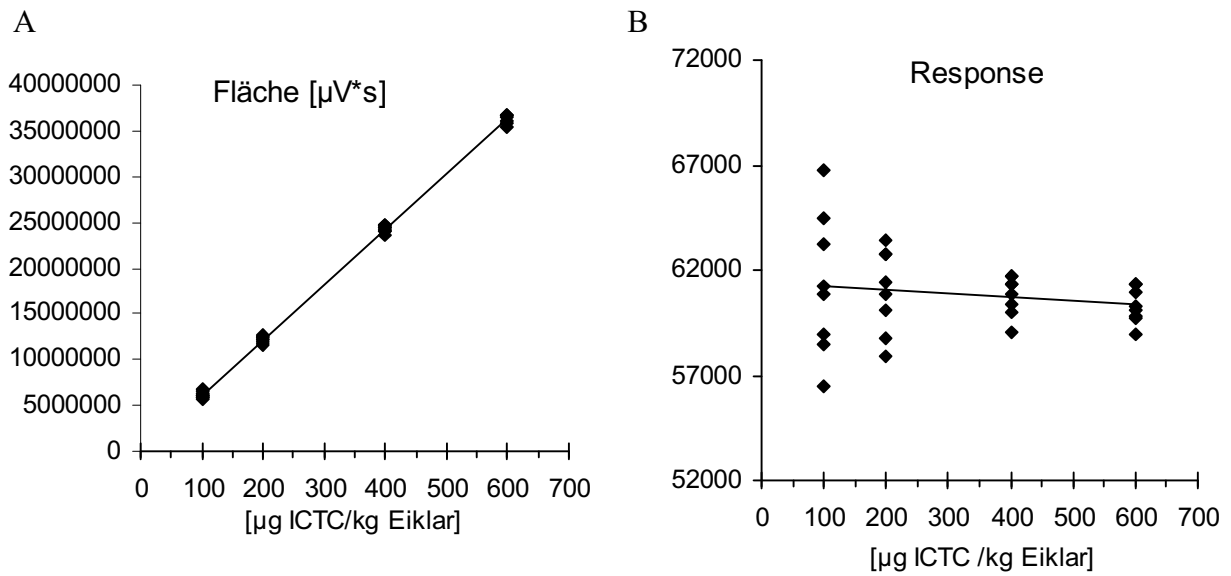
**Abb. 81a: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von OTC. Extraktion aus Eiklar.**



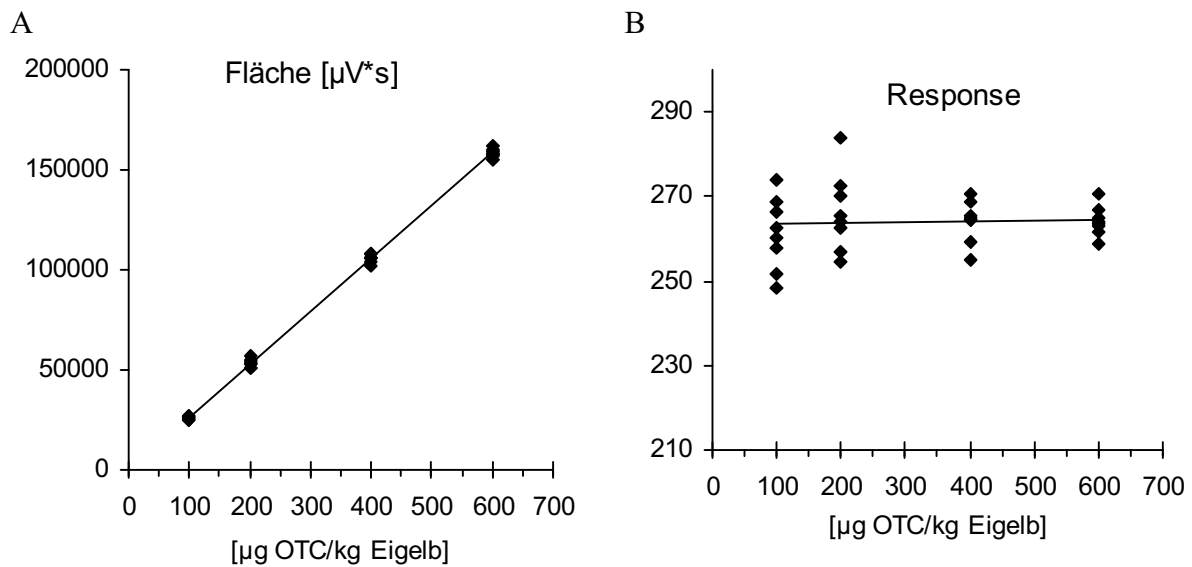
**Abb. 81b: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von TC und e-TC.  
Extraktion aus Eiklar.**



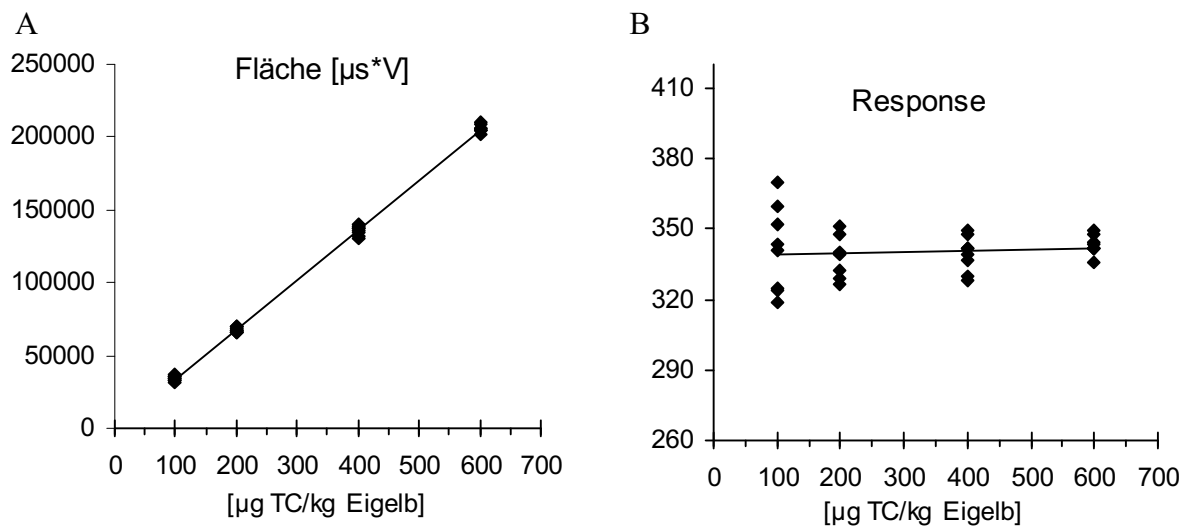
**Abb. 81c: Kalibriergerade (A) der Response-Werte (B) von CTC und e-CTC.  
Extraktion aus Eiklar.**



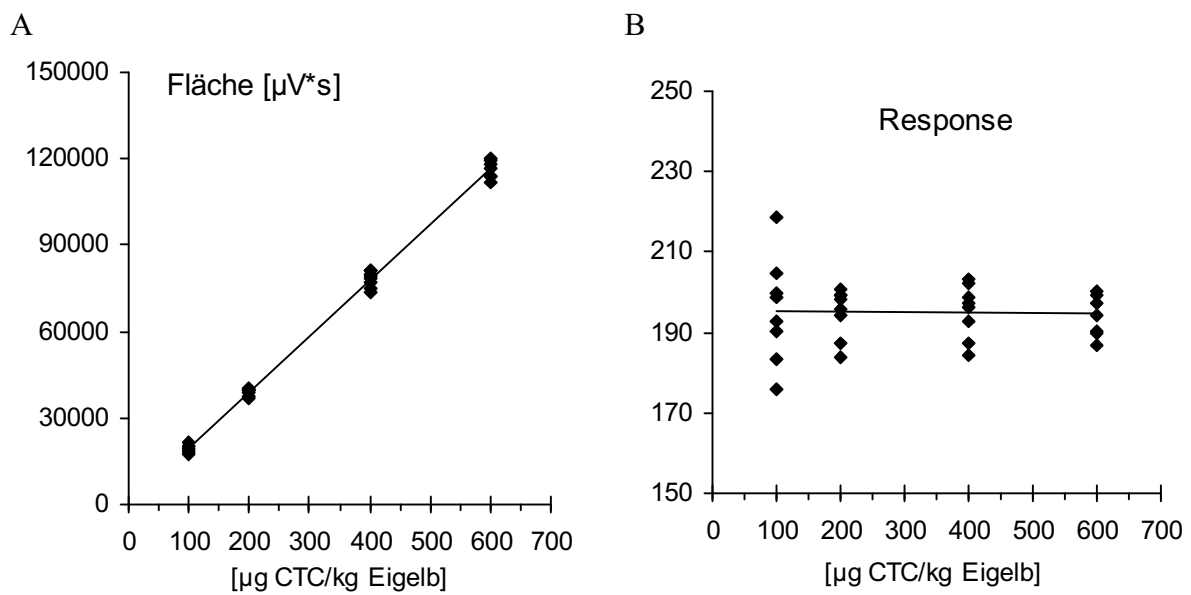
**Abb. 81d: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von ICTC und e-ICTC. Extraktion aus Eiklar.**



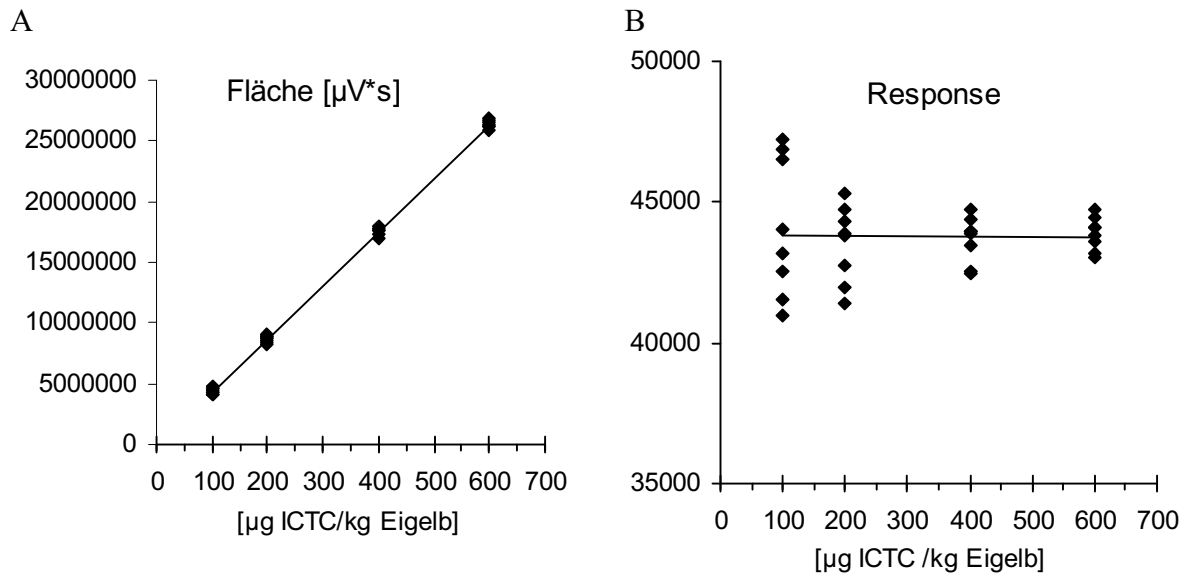
**Abb. 82a: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von OTC. Extraktion aus Eigelb.**



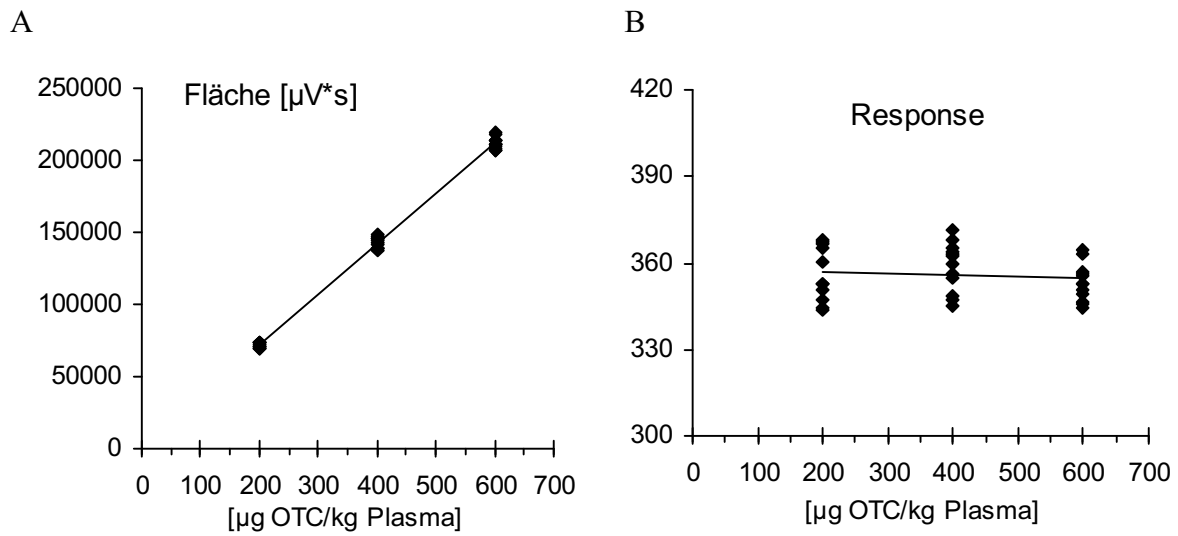
**Abb.82b: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von TC und e-TC.  
Extraktion aus Eigelb.**



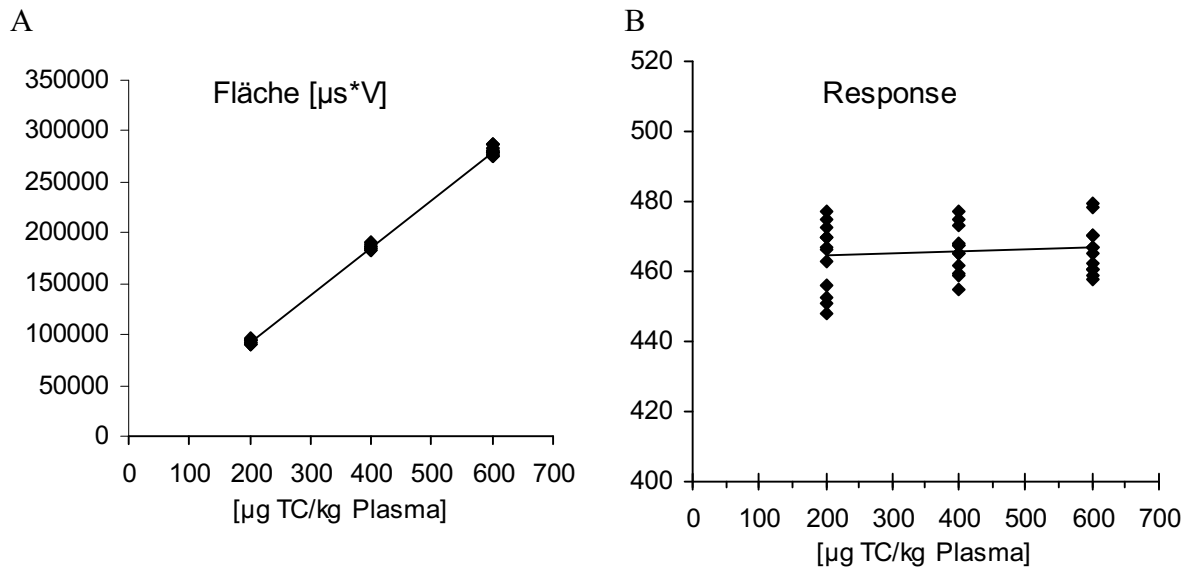
**Abb. 82c: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von CTC und e-CTC.  
Extraktion aus Eigelb.**



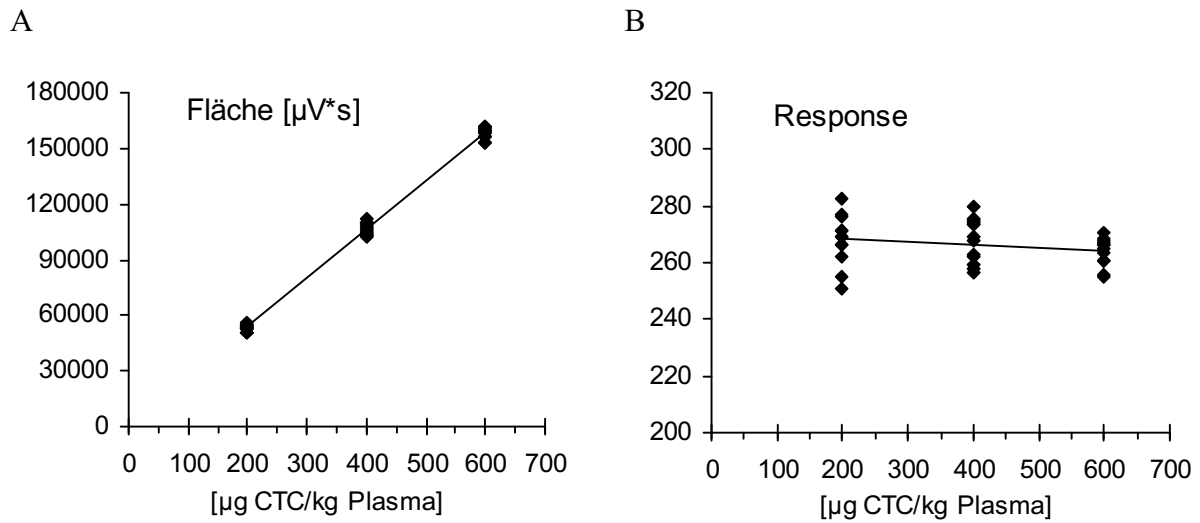
**Abb.82d: Kalibriergeraden (A) und Response-Werte (B) von ICTC und e-ICTC. Extraktion aus Eigelb.**



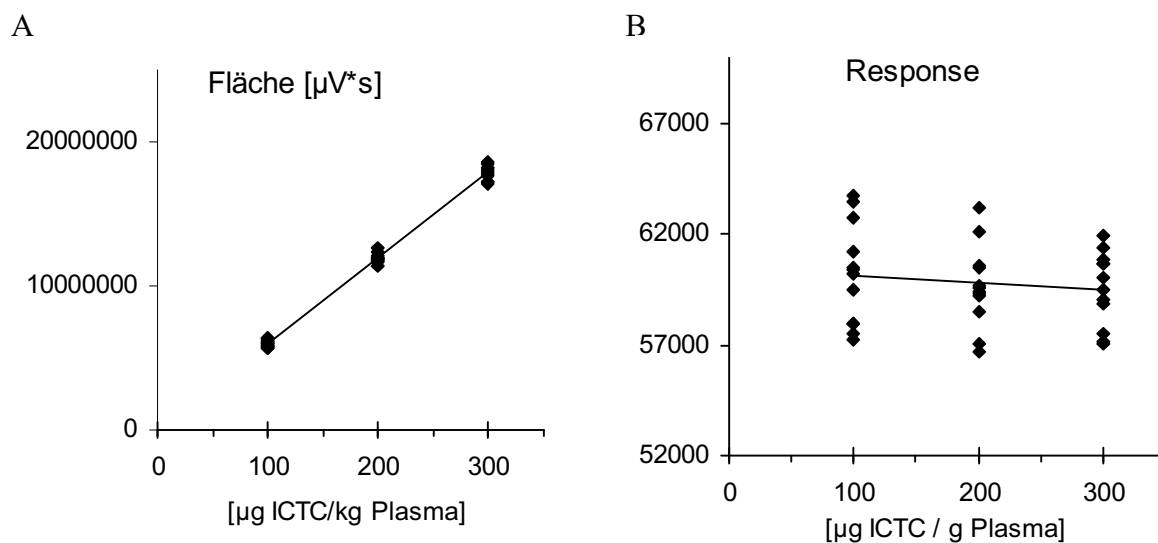
**Abb. 83a : Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von OTC. Extraktion aus Plasma.**



**Abb. 83b : Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von TC und e-TC. Extraktion aus Plasma**



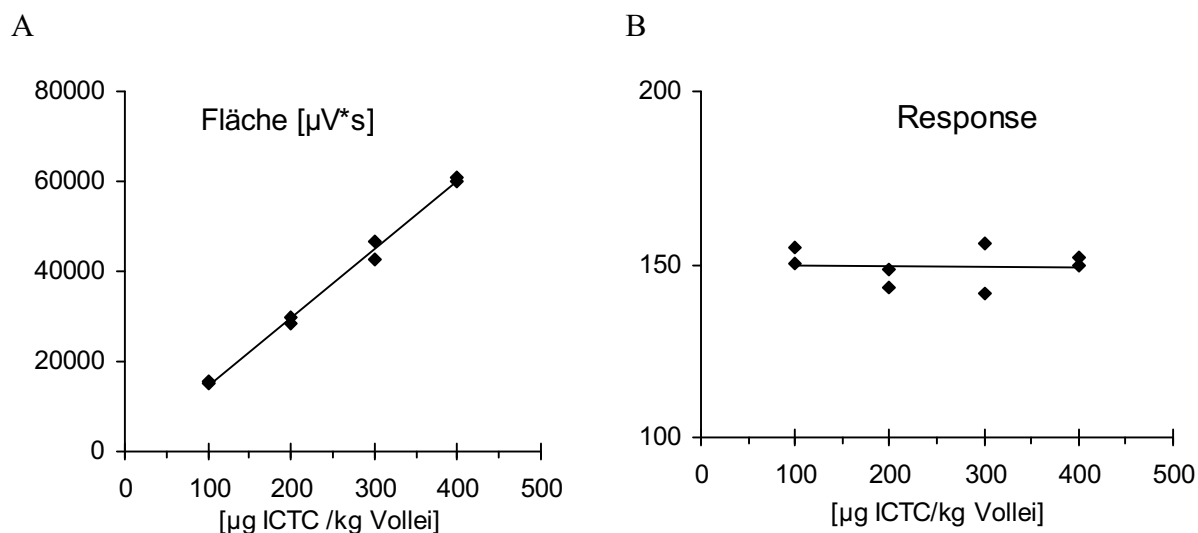
**Abb. 83c : Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von CTC. Extraktion aus Plasma.**



**Abb. 83d: Kalibriergeraden (A) und des Response-Werte (B) von ICTC.  
Extraktion aus Plasma.**

#### 12.4.2 Prüfung auf Linearität bei der UV-Methode 310 nm pH 2,2 zur Ermittlung von ICTC

Die UV Methode zur Ermittlung von Isochlortetracyclin wurde mit der Matrix Vollei auf Linearität geprüft. Andere Matrices wurden für diese Detektionsart nicht untersucht. Ziel dieser Detektionsmethode war es eine Alternative für die etwas aufwendige Fluoreszenz-methode zu entwickeln.



**Abb. 84: Kalibriergerade (A) und Response-Werte (B) von ICTC und e-ICTC.  
Extraktion aus Vollei.**



---

## 12.5 Programmierung des ASTED-Systems zur Analyse von Tetracyclin-Rückständen

Auf den folgenden Seiten befinden sich die Programme, die zur Tetracyclinanalytik mit dem ASTED-System verwendet wurden. Zum Verständnis der Programme ist zu beachten, daß die Programmierung des Gesamtsystems auf dem Stand der Computertechnik von 1990/91 beruht und in einem speziellen Basic erfolgte. Da dem im Autosampler integrierten Computer nur ein begrenzter Arbeitsspeicher (8 KByte) zur Verfügung stand, bestand die Programmierung aus mehreren Programmen, die sich gegenseitig aufrufen können. Die Befehle der Programme können nur aufeinanderfolgend (nacheinander) vom Autosampler, der gleichzeitig auch der Controller ist, bearbeitet werden. Benötigt die Ausführung eines Befehls länger als die elektronische Kommunikation zwischen Autosampler und Dilutor, können beide Dilutoren auch gleichzeitig arbeiten, was als „Concurrent“ Modus bezeichnet wird, d.h. während z.B. Dilutor 1 einen Befehl ausführt, kann der andere Dilutor 0 einen neuen Befehl akzeptieren und ausführen. Ein Dilutor kann aber nur einen Befehl empfangen, wenn er nicht beschäftigt ist, d.h. der vorherige Befehl muß vollständig ausgeführt worden sein, bevor er den nächsten Befehl akzeptieren kann. Eine zeitoptimierte Arbeitsweise durch gleichzeitiges Arbeiten der beiden Dilutoren des Systems ist so möglich, ein Überspringen (Auslassen) eines Befehls (weil die Ausführung des vorherigen Befehls noch nicht abgeschlossen ist) ist dagegen nicht möglich.

```

; Model ASTED V1.11
*****
' Programmname : 80.SST Version : 1.0
' Erstellt am : 19.10.1998 um 13:16 Uhr
' Filenummer : 80 Teil von Programm : 90
' Beschreibung :
' Bemerkung : ruft selbständig File 82 auf
*****
PRINT /147 '„Input File“
WAIT 2 ' 2/100 min warten
INPUT C14/89/0/1 'Eingabe Cleanup nein/ja
IF C14 ' falls kein Cleanup
C19=(AA1-100) 'Hauptprogramm
IF C14=0 'falls kein Cleanup
INPUT C19/117 'fragt nach dem Hauptprogramm
INPUT C2/134/0/56 'Eingabeabfrage Höhe Kanüle
für das Vial
IF C19<>(AA1-100) 'falls kein Cleanup
GOTO Label16 'gehe zu label 16
IF C19=92 'falls Hauptfile 92
GOTO Label20 'gehe zu Label 20
IF AA5=0 'falls kein Signal Feedback
INPUT C9/6/0 'Eingabeabfrage „wait time?“
GOTO /82/ 'ruft Programm-file 82 auf –
wenn Cleanup (Dialyse) gewählt ist

Label16:
INPUT B16/87/20/100 'Volumen der Dosierschleife
INPUT B10/142 'Füllvolumen
INPUT C11/102 'Wartezeit vor der nächsten
Injektion
GOTO /82/ 'gehe zu File 82
Label20:
INPUT A15/120/0/3 'Dilutor-0-flußrate
INPUT B5/54 'Regeneriervolumen
IF AA5=0 'falls kein Signalfeed-Back
INPUT C9/6/0 'Eingabeabfrage „Wait time“
GOTO /82/ 'gehe zu File 82

```

```

; Model ASTED V1.11
*****
' Programmname : 82.sst Version : 1.0
' Erstellt am : 10.04.1997 um 13:00 Uhr
' Filenummer : 82 Aufruf durch Programm : 80
' Beschreibung : Rackeigenschaften für Rack Code 34
' Bemerkung : aus ROM-File 182 übernommen
' gegenüber ROM-File 182 geändert
*****
'Rack Code 34
b6=12 'Anzahl Proben in x-Richtung
IF b11+b12>=1 'Reagenzien zum Spülen/ Eluieren?
b6=10 'nur 10 Proben in x-Richtung
IF a1>=1 'Reagenzien mit Probe mischen?
b6=5 'nur 5 Proben in x-Richtung
b7=3 'Anzahl Proben in y-Richtung
c3=140 'Abstand Position x1/Nadel in Home-
' Position [1/10 mm]
c4=382 'Abstand Position y1/Nadel in Home-
' Position [1/10 mm]
c5=175 'Abstand der Positionen in x-Richtung
'[1/10 mm]
c6=200 'Abstand der Positionen in y-Richtung
'[1/10 mm]
c7=50 'Abstand der Nadel/Gefäßboden =
z-Hub [mm]
c17=7*c5 'Abstand der Proben-/Mischgefäße
'[1/10 mm]
GOTO /83/ 'Gehe zu File 83: Sample File

```

```
; Model ASTED V1.11
*****
' Programmname : 83.sst   Version : 1.0
' Erstellt am   : 24.06.1997   um 14:15 Uhr
' Filenummer    : 83   Aufruf durch Programm : 82
' Beschreibung  : Eingabe von Startposition +
Probenanzahl; Mehrfachinjektion, manuelle Injektion
oder Homogenisieren der Probe; Anfahren der 1. Probe
' Bemerkung     : gegenüber ROM-File 183 geändert
*****
```

'Startposition, Probenanzahl, Mehrfachinjektion,  
manuelle Injektion

```
c18=0      'Reset Returnzeilenvariable
IF c0>0    'nach /AA1/ andere RAM-Files?
GOTO label30 'gehe zu label 30
INPUT b19/0/1/b6*b7 'Eingabe Position 1. Probe
b16=1      'Nr. der 1. Probe=1
IF aa1<192 'Prozess 1 oder 2?
INPUT b15/83/1/b6*b7-(b19-1) 'Eingabe Anzahl der
                               Proben
      IF c19>=92      'Prozess 3 oder anderes
                               Hauptprogr.?
INPUT b15/51/1/b6*b7-(b19-1) 'Eingabe Anzahl der
                               Tubes
b15=b15+b19-1 'Berechnung letzte Probenposition
IF c19=93     'Hauptprogramm HPLC-
                               Autosampler
INPUT c13/50/0/1 'Eingabe Replay nein/ja
INPUT c10/9/0/1 'Eingabe manuelle Injektion
                               nein/ja
IF c10=1      'manuelle Injektion?
GOTO label22  '

```

File 83.sst Fortsetzung

'Homogenisieren

```
LABEL16:      '
INPUT c10/79/0/2 'Eingabe Mixing 0=nein, 2=ja
IF c10=1      'unzulässige Eingabe
GOTO label16  'erneute Eingabe
IF c10=2      'falls Homogenisieren der Probe
INPUT b17/28  'Eingabe Mixture Cycle Nb.
GOTO label23  '

```

```
LABEL22:      '
INPUT b17/124 'Eingabe Calibration
                               Frequency= Anzahl der
                               ' Proben vor der manuellen Injektion

```

```
LABEL23:      '
IF aa5        'mit Signal-Feedback?
GOTO label30  '
PRINT c9/6    ' "Wait Time"
WAIT 4        ' 4/100 min warten
INPUT c14/157/0/1 'Eingabe "New Time n/j"
IF c14=1      'ja, neue Zeit eingeben
INPUT c9/6    'Eingabe Wait Time

```

'Anfahren der 1. Probe

```
LABEL30:      '
c14=0         'Zähler C14=0
FOR a=c3/c3+(b6-1)*c5/c5 'alle Positionen in
                               x-Richtung
FOR b=c4/c4+(b7-1)*c6/c6 'alle Positionen
                               in y-Richtung
c14=c14+1    'Zähler um 1 erhöhen
IF c14=b19   'Zähler=1. Probenposition?
GOTO label38 '
NEXT b       'nächste Position in y-Richtung
NEXT a       'nächste Position in x-Richtung

```

```
LABEL38:      '
GOTO /c19/   'gehe zum Hauptprogramm

```

```

; Model ASTED V1.11
* Diluter Nr. 0 mit Spritze 5000 µL
* Diluter Nr. 1 mit Spritze 5000 µL
*****
Programmname : 90.SST Version: 1.0
Erstellt am   : 10.04.1997 um 13:15 Uhr
' Filenummer  : 90
' Beschreibung : Hauptfile zur Dialyse,
Anreicherung, mit Spülschritten
*****
IF C18<>0 ' Falls Sprungzeile ungleich Null ist
GOTO C18 ' gehe zur Sprungzeile (Zahlenwert)
RACK CODE 99/C7 '
INJECT 1 ' Ventil in Injectposition
PRINT /94 ' Display „Purging“
TUBE 0/0 ' Nadel fährt zum
                Injektionsport
DISP 1/4000/4/1/ ' Dil 1 saugt 4 ml an
DISP 0/7000/2/4 ' Dil 0 gibt 7 ml ab
Label9: '
PRINT /132 ' Display „Rinsing“
WAIT 200 ' wartet 2 Minuten
RINSE ' Nadel in Reinigungsposition
DISP 0/1500/4/4 ' Dil 0 gibt 1,5 ml ab
PRINT /130 ' Display „Washing“
AUXIL 2/1 ' Niederdruckventil LMV
WAIT 2 ' wird auf die
AUXIL 2/0 ' Position 2 geschaltet
DISP 1/4000/3/1/ ' Dil 1 saugt 4 ml an
TUBE A/B ' Nadel fährt Spülvial
HEIGHT C7 ' Nadel steht über den Vial
ASPIR 0/50/1 ' Nadel saugt 50 ml Luft an
HEIGHT C2 ' Nadel taucht in das Vial
ASPIR 0/3500/2 ' Saugt 3,5 ml an
WAIT 2 '
HEIGHT C7 ' Nadel über dem Vial
ASPIR 0/40/1 ' saugt 40 µl Luft an
TUBE 0/0 ' geht zum Injektionsport
PRINT /130 ' Display „Washing“
DISP 0/3500/2/3 ' Dil 0 gibt die Lösung in
                die Donorkammer
RINSE ' Nadel in Reinigungsposition
DISP 0/4000/4/5 ' Nadel wird mit 4 ml gespült
WAIT 500 ' System wartet 5 Minuten
TUBE 0/0 ' Nadel geht zum Injektionsport
DISP 0/25000/3/5/ ' Dil 0 reinigt mit 25 ml die
                Zuleitungen und die Donorkammer
AUXIL 5/1 ' Niederdruckventil LMV
WAIT 5 ' schaltet auf Position 1
AUXIL 5/0 '
DISP 1/4000/3/2 ' 4 ml AK-Lösung wird angesaugt
WAIT 2 '
AUXIL 0/1 ' externes Hochdruckventil
WAIT 2 ' schaltet so, daß tridestilliertes
AUXIL 0/2 ' Wasser durch die 5 ml
                Probenschleife gepumpt wird

```

```

--- File 90 -- Fortsetzung
DISP 1/4000/4/2 ' AK wird mit 4 ml AK-
                lösung gereinigt
WAIT 2 '
DISP 1/2000/4/1 ' AK wird mit 2 ml AK-
                lösung gereinigt
PRINT /128 ' Display „Regenerating“
AUXIL 4/1 ' Niederdruckventil schaltet
WAIT 3 ' auf Position 3
AUXIL 4/0 '
DISP 1/600/3/1 ' Dil 1 saugt 600 µl Luft an
WAIT 2 '
AUXIL 5/1 ' Niederdruckventil schaltet
WAIT 5 ' auf Position 1
AUXIL 5/0 '
DISP 1/810/4/1 ' Dil 1 saugt 810 µl AK-Lösung an
AUXIL 0/1 ' externes Hochdruckventil schaltet
WAIT 2 ' so daß kein Wasser durch die 5 ml
AUXIL 0/2 ' Probenschleife läuft
DISP 1/950/4/1 ' Dil 1 saugt Luft und AK an und
                gibt diese in die 5 ml Probenschleife
WAIT 2 '
C12=1 '
PRINT B16/1 ' Display „Tube X“
B19=B19+1 ' berechnet nächstes Vial
B16=B16+1 ' berechnet nächstes Sample
IF B19>B15 ' letztes Vial erreicht ?,
GOTO Label134 ' wenn ja dann gehe zu Label 134
IF B>=C4+(B7-1)*C6 ' falls Ende der Rackspalte
GOTO Label70 ' gehe zu label 70
B=B+C6 ' berechnet die nächste Rackzeile
GOTO Label73 ' geh zu Label 73
Label70: '
B=C4 ' Y-Position = 1. Zeile
A=A+C5 ' X-Position = nächste Spalte
GOTO Label73 '
Label73: '
TUBE A/B ' Nadel geht zum Probenvial
IF C10=2 '
GOTO Label138 '
Label76: '
HEIGHT ' Nadel in höchster Position
ASPIR 0/50/1 ' Nadel saugt 50 µl Luft an
HEIGHT C2 ' Nadel taucht in die Probe ein
ASPIR 0/1700/2 ' Nadel saugt 1,7 ml Probe an
WAIT 2 '
HEIGHT C7 ' Nadel in höchster Position
ASPIR 0/50/1 ' Nadel saugt 50 µl Luft an
TUBE 0/0 ' Nadel in Injektionsport
INJECT 0 ' Rheodyne B schaltet, so daß die
                TEC mit Wasser FLM-frei gewachsen wird
PRINT B16/69 ' „Sample Nr. Enrichment“
DISP 0/1300/2/3/ ' 1,3 ml Probelösg. wird in die
                Donorkammer gefüllt
WAIT 300 ' System wartet 3 min
DISP 1/1350/3/1 ' 1,35 ml Dialysat wird angesaugt
WAIT 30 '
DISP 1/1350/3/1 ' 1,35 ml Dialysat wird angesaugt
WAIT 30 '

```

--- File 90 -- Fortsetzung

```

DISP 1/1350/3/1 ' 1,35 ml Dialysat wird angesaugt
WAIT 30 '
DISP 1/1450/3/1 ' 1,45 ml Dialysat wird angesaugt
WAIT 12 '
AUXIL 0/1 ' Das externe Rheodyneventil schaltet,
WAIT 2 ' so daß die mit Dialysat gefüllte 5 ml
AUXIL 0/2 Probenschleife mit der TEC verbunden
ist und der Analyttransfer auf die TEC
beginnt.
RINSE ' Nadel in Spülposition
DISP 0/1500/4/5 ' Nadel wird mit 1,4 ml gereinigt
DISP 0/3500/4/5 ' Nadel wird mit 3,5 ml gereinigt
TUBE A/B ' Nadel in Injektionsport
HEIGHT ' Nadel steht über den Vial
ASPIR 0/50/1 ' saugt 50 µl Luft an
TUBE 0/0 ' Nadel fährt zum Injektionsport
DISP 0/1200/2/5 ' DK wird mit 1,2 ml gereinigt
DISP 0/2000/2/5/ ' DK wird mit 2 ml gereinigt
WAIT 2 '
WAIT 700 ' System wartet 7 Minuten
IF (AA4=1)+(AA5=1)<>2 ' bei Signalfeedback
GOTO Label115 ' gehe zu label 115
C18=115 ' setze Sprungzeile auf 115
IF C12=0 ' falls die „allererste Probe
abgearbeitet worden ist,
GOTO /96/ ' gehe zu Feed-Programm 96
prüft, ob Apex gerade ein
Chromatogramm aufzeichnet
Label115:
C12=0 ' setze allererste Probe „fertig“
C18=118 ' Sprungzeile ist nun 118
GOTO /95/ ' gehe in das Feedback-
Unterprogramm, dort wird Apex
gestartet
INJECT 1 ' Analyttransfer von der
Anreicherungssäule auf die
analytische Säule beginnt
AUXIL 0/1 ' externes Rheodyne schaltet, so daß
WAIT 2 ' der Dilutor 1 die 5 ml Proben-
AUXIL 0/2 ' schleife reinigen kann
PRINT /94 ' Display „Purging“
B19=B19+1 ' nächste Vialposition im
B16=B16+1 ' Rack wird berechnet
IF B19>B15 ' falls alles bearbeitet wurde
GOTO Label134 ' gehe zu label 134
IF B>=C4+(B7-1)*C6 '
GOTO Label131
B=B+C6 ' berechne nächstes Vial
GOTO Label9 ' gehe zu label 9

```

--- File 90 -- Fortsetzung

```

Label131: '
B=C4 '
A=A+C5 ' berechnet nächste Position
GOTO Label9 '
Label134: '
C18=136 ' Sprungzeile 136
GOTO /96/ ' gehe zum Feedbackprogramm 96
HEIGHT ' Nadel nach oben
HOME ' Nadel in „Home“ = Ende
Label138: '
PRINT B16/79 ' Mischung von Probe Nr
HEIGHT C7 ' Nadel höchste Position
ASPIR 0/50/1 ' saugt 50 ml Luft an
HEIGHT C2 ' taucht in das Probenvial
FOR C13=1/B17 ' Anzahl der Mischungs-
zyklen
ASPIR 0/1500/2 ' saugt 1,5 ml Probe an
WAIT 2 '
DISP 0/1500/2 ' gibt 1,5 ml Probe in das Vial
ab
NEXT C13 ' startet neuen Mischvorgang
RINSE ' Nadel in Reinigungsposition
DISP 0/2200/5 ' Dil 0 reinigt sich selbst mit
2,2 ml Dil-0-Lösung
TUBE A/B ' Nadel fährt zum Probenvial
GOTO Label76 ' geht zum Label 76

```

```
; Model ASTED V1.11
```

```
*****
```

```
' Programmname : 95.sst   Version : 1.0
' Erstellt am  : 15.10.1997 um 12:00 Uhr
' Filenummer  : 95   Teil von Programm : 90
' Beschreibung : Data System Start bei Signal-
                  Feedback mit APEX
' Bemerkung   : Gerät 7 nicht immer angeschlossen
'Gerät 1 = APEX-Input; Signal, da ASTED "ready"
'Gerät 3 = APEX-Output; Signal, da APEX "Busy"
'(elektr. Level = 1)
' Gerät 6 = APEX-Input; Start Datenaufnahme
*****
```

```
AUXIL 7/1      'Signal zum externen Gerät 7 an
WAIT 2         '(Start von Diodenarray : falls
                  angeschlossen)
AUXIL 7/0      'Signal zum externen Gerät 7 aus
IF aa5=0       'kein Signal-Feedback?
GOTO label10   '
LABEL6:        '
AUXIL 8/2      'Beep am Controller
AUXIL 1/2      'Puls-Signal zum Gerät 1
IF /3/=1       'externes Gerät 3 nicht bereit?
GOTO label6    ' das Gerät „beep“ so lange bis
                  Apex ready ist
LABEL10:       '
AUXIL 6/1      'Signal zum externen Gerät 6 an
WAIT 2         'Apex-Aufzeichnung wird gestartet
AUXIL 6/0      'Signal zum externen Gerät 6 aus
GOTO /c19/     ' zurck zum Hauptprogramm
```

```
; Model ASTED V1.11
```

```
*****
```

```
Programmname : 96.sst   Version : 1.0
' Erstellt am  : 14.10.1997 um 14:50 Uhr
' Filenummer  : 96   Teil von Programm : 90
' Beschreibung : Data System Wait bei Signal-Feedback
                  mit Apex
' Bemerkung   : Gerät 3 = APEX-Output, „Ready“ =
elektr.Level 0
*****
```

```
IF aa5=1      'Signal-Feedback?
GOTO label6   ' wenn ja dann gehe zu Label 6
PRINT c9/6    '"Wait Time"
WAIT c9       'Wait Time abwarten
GOTO /c19/    'zurck zum Hauptprogramm
LABEL6:       '
PRINT /149    '"Wait Control"
WAIT /3/0     'warten, bis Signal v. Aux.3 =aus
                  '(ASTED ready, Output 1=closed)
GOTO /c19/    'zurck zum Hauptprogramm
```

## 12.6 Abkrzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADI	acceptable daily intake
AK	Akzeptorkammer
Anhydro-TC	Anhydrotetracyclin
Anhydro-CTC	Anhydrochlortetracyclin
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
α-apo-OTC	alpha-apo-Oxytetracyclin
β-apo-OTC	beta-apo-Oxytetracyclin
ASTED	automated sequential trace enrichment of dialysates
BGA	Bundesgesundheitsamt
BgVV	Bundesinstitut fr gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinär- medizin, vormals :BGA

---

---

BG	Bestimmungsgrenze
°C	Grad Celsius
CRM	certified reference material
CTC	Chlortetracyclin
DAD	Dioden-Array-Detektor (zur Aufnahme von UV-Spektren)
DC	Dünnschichtchromatographie
DK	Donorkammer
DM-TC	6-Desmethyl-Tetracyclin
DM-CTC	6-Desmethyl-Chlortetracyclin
e-	4-Epi-
Epimer	4-Epimer
et al.	Lateinisch für : und andere (Autoren)
ESI	Electrospray Ionisation
Epi-	4-Epi-
EU	Europäische Union
EU-MRL	Europäischer MRL-Wert
FAO	Food and Agricultural Organization (UN)
FDA	Food and Drug Administration
FLD	Fluoreszenz Detektion
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography Hochleistungsflüssigchromatographie
ICTC	Isochlortetracyclin
IOTC	Isooxytetracyclin
ITC	Isotetracyclin
IR	infra red, Infrarot
KGW	Körpergewicht
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	LC – Tandem-Massenspektroskopie
LD50	mittlere letale Dosis (mg/kg Körpergewicht), bei der voraussichtlich 50 % der Testorganismen nach akuter Exposition sterben
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz
min	Minute
MRL	maximum residue limit
MRM	multiple reaction monitoring
MS	mass spectrometry, Massenspektrometrie
NICI	Negative Ion Chemical Ionization
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernresonance

---

---

NOEL	no-observed-effect-level
N-DM-..	4-N-Desmethyl-..
N-DM-CTC	4-N-Desmethyl-Chlortetracyclin
N-DM-ICTC	4-N-Desmethyl-Isochlortetracyclin
N-DM-OTC	4-N-Desmethyl-Oxytetracyclin
N-DM-TC	4-N-Desmethyl-Tetracyclin
NG	Nachweisgrenze
OEG	Obere Eingreifsgrenze
OTC	Oxytetracyclin
PVL	Probenverdünnungslösung
pKa	Säurekonstante
RM	reference material
RP	reversed phase
s	Standardabweichung
SIM	selected ion monitoring
SPE	Festphasenextraktion (solid-phase extraction)
Tab.	Tabelle
TEC	trace enrichment cartridge
Tridest.	tridestilliertes
UEG	Untere Eingreifsgrenze
UV	ultra violet, Ultraviolett
VO	Verordnung

## 12.7 Begriffsbestimmungen

### Akzeptorkammerlösung :

Die Akzeptorkammerlösung ist die Lösung, die die Analyten nach ihrem Durchtritt durch die Membran aufnimmt.

### Akzeptorkammerpuls :

Als Akzeptorkammerpuls wird das Entleeren und das gleichzeitige Nachfüllen der Akzeptorkammer mit Akzeptorkammerlösung verstanden.

### Analyttransfer :

Hierunter versteht man den Transfer der angereicherten Analyten auf die analytische Säule. Der Analyttransfer ist von der Elutionskraft des HPLC-Eluenten abhängig.



Dialysat :

Die Akzeptorkammerlösung, die bereits dialysierte Analyte aufgenommen hat, wird Dialysat genannt. Das Dialysat wird an der Anreicherungssäule angereichert.

Dialysatvolumen :

Das Dialysatvolumen ist das Gesamtvolumen, welches von Dilutor 1 diskontinuierlich in 4 Pulsen als Dialysat angesaugt. Das Dialysatvolumen hat ein Volumen von 5,5 ml, damit die Probenschleife (5,0 ml) überfüllt werden kann.

Dialysezelle :

Sie besteht aus einer Donorkammer und einer Akzeptorkammer. Zwischen den Kammern befindet sich eine Dialysemembran.

Dilutor 0 :

Der Dilutor 0 saugt u.a. aus den Probenvials die Proben an und gibt diese in die Donorkammer. Er führt alle Tätigkeiten aus, die im Zusammenhang mit der Donorkammer stehen.

Dilutor 1 :

Der Dilutor 1 saugt das Dialysat aus der Akzeptorkammer an und gibt dieses Volumen in eine 5,0 ml Probenschleife.

Dilutor -0- Lösung :

Hierbei handelt es sich um die Lösung, die der Dilutor 0 abgeben kann und die sich in den Zuleitungen des Dilutors 0 befinden. Es handelt sich um einen Phosphatpuffer 0,06 mol/l pH 6,0 mit 1 g/l Triton X-100.

Donorkammerpuls :

Als Donorkammerpuls wird eine Füllung der Donorkammer mit Probevolumen bezeichnet. Wenn die Donorkammer während einer Dialyse mehrmals gefüllt wird, ergeben sich mehrere Donorkammerpulse pro Analyse und das Probe- sowie das Dialysevolumen erhöht sich.

Epimerisierungsrate

Hierunter wird der Anteil des 4-Epimers an der Summe von Muttersubstanz und 4-Epimer verstanden. z.B. Epimerisierungsrate 55 % für Tetracyclin bedeutet, daß 55 % der Summe von e-TC und TC als 4-Epimer vorliegt.

Fließmittel 1 (FLM I)

0,01 mol/l Oxalsäure, Acetonitril, 50 + 50, v+v

Fließmittel II (FLM II)

0,005 mol/l Oxalsäure, Acetonitril, 50 + 50, v+v

Isomerisierungsrate

Hierunter wird der prozentuale Konzentrationsanteil des Isochlortetracyclins und seines 4-Epimers an der Summe der Konzentrationen von CTC, e-CTC, ICTC und e-ICTC verstanden. Da die Konzentration des N-DM-ICTC auch unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen kann, wird die Konzentration des N-DM-ICTC zur Vereinheitlichung generell nicht berücksichtigt.

Isoderivate des CTC

Hierzu zählen ICTC, e-ICTC und N-DM-ICTC.

N-Desmethylierungsrate

Unter dieser Rate wird der Konzentrationsanteil des N-Desmethylderivats an der Summe aller Rückstände verstanden, die auf die Medikation mit einer Muttersubstanz zurückzuführen sind. N-Desmethylierungsrate von Tetracyclin : Prozentualer Konzentrationsanteil des N-DM-TC an der Gesamtkonzentration aller Rückstände, die auf die Medikation mit Tetracyclin zurückzuführen sind d.h. ( $\Sigma(\text{N-DM-TC} + \text{e-TC} + \text{TC})$ ).

Im Falle des Oxytetracyclins bezieht sich die N-Desmethylierungsrate auf das Oxytetracyclin alleine, da die Summe von OTC und e-OTC nicht immer gebildet werden konnte.

Probevolumen :

Hierunter wird das Volumen verstanden, welches der Dilutor 0 aus den Vials ansaugt. Aufgrund der Zuleitungen zu der Donorkammer ist das Probevolumen immer größer als das Volumen, welches tatsächlich dialysiert wird.

Probenhomogenisation :

Hierunter wird das Ansaugen und wieder Abgeben eines bestimmten Probevolumens in das Probenvial verstanden, um die Probelösung vor ihrer Aufgabe in die Donorkammer nochmal zu durchmischen bzw. zu homogenisieren.

Probelösung :

Hierunter wird die verdünnte Matrix-haltige Probe verstanden, die in die Donorkammer gefüllt und dialysiert wird.

Probenverdünnungslösung, PVL :

Die Proben werden vor ihrer Dialyse mit einem bestimmten Citratpuffer (0,3 mol/l, pH 5,75) verdünnt, der auch als Probenverdünnungslösung bezeichnet wird. Erst durch diese Verdünnung erhalten die Proben eine genügend niedrige Viskosität, die die Analyse mittels ASTED ermöglicht. Die übliche Verdünnung ist hierbei 5 g homogenisiertes Vollei und 10 g Probenverdünnungslösung.

Spüllösung :

Die Spüllösung für Donor- und Akzeptorkammer ist identisch und ist ein 0,3 mol/l Phosphatpuffer pH 5,85 mit 13 g/l Triton X-100.

Für die Donorkammer gilt folgende Definition :

Hierbei handelt es sich um die Lösung, die der Dilutor 0 aus einem Spülvial des Probenracks ansaugt und zur Reinigung der Donorkammer durch diese drückt.

Für die Akzeptorkammer gilt folgende Definition :

Hierbei handelt es sich die Lösung, die der Dilutor 1 mit Hilfe eines zusätzlich eingebauten Niederdruckventils ansaugt und die zur Reinigung der Akzeptorkammer dient.

Spülvial und Probenvial :

Das Probenrack wird so bestückt, daß sich vor und nach jeder Probe ein Vial mit Donorkammerspüllösung befindet. Das Probenrack bietet Platz für 36 Vials à 4 ml.

Wasser (Abb. 10, S. 41) :

Als Wasser wird tridestilliertes Wasser zum Waschen der Anreicherungssäule nach erfolgter Anreicherung der Tetracycline an einer Anreicherungssäule verwendet. Das Wasser befreit die Anreicherungssäule vom hohen Salzgehalt des Dialysates und ermöglicht indirekt so die Chromatographie der Tetracycline.