

**Bestimmung von Chlortetracyclinrückständen  
in biologischen Proben aus der landwirtschaftlichen  
Tierhaltung mit HPLC-UV-MS/MS  
- Methodenentwicklung und Anwendung in Medikationsstudien -**

Der Fakultät für Naturwissenschaften

Department Chemie

der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Diplom-Chemikerin

Andrea Vockel

aus Detmold

Paderborn 2005



Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen, die in der Zeit von Mai 2000 bis Januar 2004 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote, Universität Paderborn, Fakultät für Naturwissenschaften, Department Chemie (Anorganische und Analytische Chemie) überwiegend am Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt, SVUA Detmold durchgeführt worden sind.

1. Referent: Prof. Dr. M. Grote

2. Referent: Prof. Dr. M. Weiß

Eingereicht am 23.05.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2005



Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:

A. Vockel, H.-A. Wagener, W. Klemm, K. Röwer, A. Mehlich, M. Grote; *Bestimmung von Tetracyclinrückständen mit LC-MSMS in lebensmittelliefernden Schweinen*; Lebensmittelchemie 55 (2001), 67-68

A. Vockel, K. Röwer, A. Mehlich, M. Grote; *Bestimmung von Tetracyclinrückständen mit LC-MSMS in lebensmittelliefernden Schweinen*; 5<sup>th</sup> International Symposium Extraction for Sample Preparation - SFE - (X)SE - SPME, 5. – 7. Mai 2001; Siegen (Posterbeitrag)

A. Vockel, K. Röwer, A. Mehlich, M. Grote; *Quantifizierung von Chlortetracyclin mit LC-MSMS in biologischen Proben von lebensmittelliefernden Schweinen*; DVG-LChG-Symposium, "Lebensmittel - Mittel zum Leben", 8. – 10. April 2002; Münster (Posterbeitrag)

A. Vockel, K. Röwer, A. Mehlich, M. Grote; *Bedeutung von Umwandlungsprodukten bei der quantitativen Chlortetracyclinanalytik in biologischen Proben mit LC-MSMS*; Analytica, 18. Internationale Fachmesse und Analytica Conference; 23. – 26. April (2002) München (Posterbeitrag)

A. Mehlich, A. Vockel, M. Grote; *Quantitative Analysis of chlortetracycline and its degradation products in biological samples by LC-MSMS*; Euroanalysis-12, European Conference on Analytical Chemistry, Dortmund, Germany, September 8 - 13, 2002 (Posterbeitrag)

M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag; *Fate of Antibiotics in food chain and environment originating from pigfattening (Part 1)*; Fresenius Envir. Bull.; 13 (11 b) (2004) 1216-1224

A. Vockel, K. Röwer, K. Vogel, A. Mehlich, M. Stolz, B. Brand, M. Grote; Sonderprogramm Verbraucherschutz 2000-2002; Abschlußbericht: „Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung“; Hrsg.: Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes NRW, Düsseldorf (2004) [www.lej.nrw.de](http://www.lej.nrw.de)



## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M. Grote danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, stete Diskussionsbereitschaft und für die engagierte Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Weiß (Fakultät für Naturwissenschaften, Department Sport & Gesundheit, Sportmedizin, Universität Paderborn) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. M. Stolz (Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Detmold), Herrn Dr. A. Mehlich sowie allen Mitarbeitern des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes Detmold, die durch ihr Mitwirken und ihr kollegiales Verhalten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders möchte ich mich bei Karin Röwer und Kerstin Tingelhoff bedanken.

Weiterhin möchte ich allen Mitwirkenden des Verbraucherschutzprojektes, die die Durchführung der Medikationsstudien begleitet haben, für die gute Zusammenarbeit danken, die damit zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank all den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Analytische und Anorganische Chemie, insbesondere Rolli Knaup, Dr. Detlef Schwarze und Dr. Heike Wollersen.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich darüber hinaus all denjenigen aussprechen, die in fachlicher wie auch privater Hinsicht diese Arbeit auf vielfältige Art und Weise unterstützten. Ich danke all meinen Freunden, die mir stets zur Seite standen und durch ihre Diskussionsbereitschaft eine große Hilfestellung waren. Besonders danke ich auch meinem Vater, in Erinnerung an meine Mutter, für die jahrelange Geduld und Unterstützung.





*Für meinen Vater  
in Erinnerung an meine Mutter*



---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1</b>	<b>Klassifizierung von Antibiotika .....</b>	<b>6</b>
3.1.1	Definition, Wirkungstypen und Klassifizierungsmöglichkeiten .....	6
3.1.2	Aufbau von Bakterienzellen .....	8
3.1.3	Wirkmechanismen, Struktur-Wirkungsbeziehungen und Wirkungsspektren .....	10
3.1.3.1	Einteilung der Antibiotika nach Wirkmechanismen .....	10
3.1.3.2	Wirkungsspektrum von Antibiotika .....	11
3.1.3.3	Wirkmechanismus der Tetracycline .....	12
<b>3.2</b>	<b>Struktureller Aufbau und Struktur-Wirkungsbeziehungen der Tetracycline.....</b>	<b>12</b>
3.2.1	Struktur und Nomenklatur .....	12
3.2.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Tetracyclinen.....	14
<b>3.3</b>	<b>Pharmakologie der Tetracycline .....</b>	<b>14</b>
<b>3.4</b>	<b>Resistenzmechanismen, Gefährdung des Verbrauchers und Rechtliche Bewertung .....</b>	<b>16</b>
3.4.1	Resistenzmechanismen.....	16
3.4.1.1	Definition und Möglichkeiten der Resistenzentstehung.....	16
3.4.1.2	Resistenzeigenschaften gegenüber Tetracyclinen .....	17
3.4.2	Gefährdung des Verbrauchers durch den Einsatz von Antibiotika .....	18
3.4.3	Rechtliche Bewertung von pharmakologisch wirksamen Stoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs .....	20
<b>3.5</b>	<b>Eigenschaften der Tetracycline .....</b>	<b>22</b>
3.5.1	Physikalische und chemische Eigenschaften.....	22
3.5.2	Komplexbildung .....	23
3.5.3	Umwandlungs- und Abbaureaktionen .....	24
3.5.3.1	Epimerisierung .....	24
3.5.3.2	Isomerisierung .....	25
3.5.3.3	Keto-Enol-Tautomerie.....	26
3.5.3.4	Dehydratation .....	27
<b>4</b>	<b>Stand der Tetracyclin-Analytik .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchungsmethodik und Projektverlauf.....</b>	<b>33</b>
5.1.1	Haus Düsse-Studie.....	34

---

---

5.1.2	FAL-Studie .....	35
<b>5.2</b>	<b>Methodenentwicklung zur Bestimmung von CTC und Metabolite in biologischen Proben .....</b>	<b>37</b>
5.2.1	Entwicklung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens .....	37
5.2.1.1	Auswahl der mobilen und stationären Phase .....	37
5.2.1.2	Entwicklung der MS/MS-Detektion .....	39
5.2.1.3	Stabilität von CTC und e-CTC in Lösung .....	41
5.2.2	Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung .....	44
5.2.2.1	Auswahl des SPE-Materials .....	46
5.2.2.2	Einfluß der Zusammensetzung des Extraktionsmittels .....	46
5.2.2.3	Wiederfindungsstudien mit CTC und e-CTC .....	47
5.2.2.4	Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung .....	48
5.2.2.5	Urin, Plasma und Faeces .....	49
5.2.2.6	Muskulatur, Leber und Niere .....	52
5.2.2.7	Optimierung der Probenvorbereitung für Muskulatur .....	54
5.2.2.8	Knochen .....	56
5.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Verfahrensentwicklung .....	58
<b>5.3</b>	<b>Validierung des Analysenverfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC .....</b>	<b>60</b>
5.3.1	Kalibrierung .....	61
5.3.1.1	Wahl des Arbeitsbereiches .....	61
5.3.1.2	Linearität .....	62
5.3.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	64
5.3.3	Selektivität des Verfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC in Muskulatur .....	65
5.3.3.1	Selektivitätstest durch Peaklöschung nach alkalischer Behandlung .....	66
5.3.3.2	Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten .....	66
5.3.3.3	Selektivitätstest durch Vergleich der UV- und MS-Spektren .....	67
5.3.4	Systematische und zufällige Fehler .....	69
5.3.4.1	Richtigkeit .....	69
5.3.4.2	Matrixbedingte Signalbeeinflussung bei der ESI-MS/MS-Detektion .....	72
5.3.4.3	Präzision .....	74
5.3.5	Zusammenfassung der Validierungsergebnisse für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Muskulatur .....	76
5.3.6	Validierung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Urin, Faeces, Plasma, Knochen, Leber und Niere .....	77
<b>5.4</b>	<b>Anwendung des Analysenverfahrens auf Proben der Medikationsstudien .....</b>	<b>79</b>
5.4.1	Haus Düsse-Studie .....	79
5.4.1.1	Ausscheidungsverhalten von CTC in Urin .....	79

---

---

5.4.1.2	CTC-Gehalte in Schlachtproben.....	81
5.4.1.3	Resistenzuntersuchungen .....	82
5.4.1.4	Zusammenfassung.....	83
5.4.2	FAL-Studie .....	83
5.4.2.1	CTC und e-CTC in Urin, Faeces und Plasma.....	84
5.4.2.2	Bilanzierung (Applikation-Exkretion) .....	87
5.4.2.3	Schlachtproben .....	88
5.4.2.4	Zusammenfassung .....	89
5.4.3	Ergebnisse der Studien und Konsequenzen.....	89
<b>5.5</b>	<b>Identifizierung von Tautomeren.....</b>	<b>90</b>
<b>5.6</b>	<b><i>In vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Bildung von Metaboliten des CTC .....</b>	<b>93</b>
5.6.1	<i>In vitro</i> -Bildung .....	93
5.6.2	<i>In vivo</i> -Bildung.....	94
<b>5.7</b>	<b>Antibiotische Aktivitäten .....</b>	<b>96</b>
5.7.1	Agar-Diffusionstest .....	96
5.7.2	Bildung von Abbauprodukten während des Agar-Diffusionstests .....	98
5.7.3	Zusammenfassung der Ergebnisse und Konsequenzen .....	100
<b>5.8</b>	<b>Methodenentwicklung zur quantitativen Bestimmung weiterer CTC-Metabolite .....</b>	<b>100</b>
5.8.1	HPLC-UV-MS/MS-Verfahren .....	101
5.8.1.1	Stabilität der Metabolite in Lösung .....	101
5.8.1.2	Kalibrierung .....	102
5.8.2	Probenvorbereitung .....	103
5.8.2.1	Wiederfindung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC .....	103
5.8.2.2	Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung.....	104
5.8.2.3	iso-CTC und e-iso-CTC als Summenparameter .....	105
5.8.3	Zusammenfassung .....	106
<b>5.9</b>	<b>Anwendung des erweiterten Analysenverfahrens auf Proben der FAL-Studie .....</b>	<b>107</b>
5.9.1	Schlachtproben .....	107
5.9.2	Gebundene CTC-Rückstände in Knochen.....	109
5.9.2.1	Freisetzung von CTC aus Knochen.....	111
5.9.2.2	Fluoreszenz-Screening-Test .....	114
5.9.2.3	Applikation von CTC und Ablagerungsmuster in Knochen .....	114
5.9.3	Bilanzierungsstudie von Tier 95.....	116
5.9.3.1	Urin und Faeces.....	116
5.9.3.2	Schlachtproben .....	118
5.9.3.3	Bilanzierung .....	119

---

---

5.9.4	Konsequenzen.....	122
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>128</b>
<b>7.1</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>128</b>
<b>7.2</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>128</b>
7.2.1	HPLC-UV-MS/MS Triple Quadrupol-System .....	128
7.2.2	Probenzerkleinerung .....	129
7.2.3	Probenhomogenisierung .....	129
7.2.4	Zentrifugen .....	129
7.2.5	SPE-Extraktionseinheit.....	129
7.2.6	TurboVap.....	129
7.2.7	pH-Meter.....	130
7.2.8	UV-Lampe .....	130
<b>7.3</b>	<b>Lösungen/Reagenzien .....</b>	<b>130</b>
7.3.1	Mobile Phase .....	130
7.3.2	McIlvain-Puffer, pH 4 mit 0,1 mol/L EDTA.....	130
7.3.3	Stammlösungen.....	130
7.3.4	Standardlösungen.....	130
7.3.5	Kalibrierlösungen .....	131
<b>7.4</b>	<b>Medikationsstudien.....</b>	<b>131</b>
7.4.1	Haus Düsse-Studie.....	131
7.4.2	FAL-Studie .....	133
<b>7.5</b>	<b>Methodenentwicklung .....</b>	<b>135</b>
7.5.1	Chromatographische Bestimmung.....	135
7.5.2	Stabilität von CTC und e-CTC in Lösung .....	137
7.5.3	Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung.....	137
7.5.3.1	Auswahl der SPE-Materials.....	137
7.5.3.2	Einfluß der Zusammensetzung des Extraktionsmittels.....	137
7.5.3.3	Wiederfindungsstudien mit CTC und e-CTC .....	138
7.5.3.4	Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung von CTC und e-CTC.....	138
7.5.3.5	Zusammenfassung des SPE-Verfahrens .....	138
7.5.4	Probenvorbereitung verschiedener Matrices.....	138
7.5.4.1	Urin, Plasma und Kot .....	138
7.5.4.2	Muskulatur, Leber und Niere.....	139
7.5.4.3	Optimierung des Extraktionsverfahrens für Muskulatur .....	140

---

---

7.5.4.4	Knochen .....	140
<b>7.6</b>	<b>Validierung des Analysenverfahrens .....</b>	<b>141</b>
7.6.1	Linearer Bereich .....	141
7.6.2	Kalibriergeraden .....	141
7.6.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	142
7.6.4	Selektivität.....	142
7.6.4.1	Selektivitätstest durch Peaklöschung nach alkalischer Behandlung .....	142
7.6.4.2	Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten .....	142
7.6.4.3	Selektivitätstest durch Vergleich der UV- und MS-Spektren .....	142
7.6.5	Richtigkeit .....	142
7.6.6	Matrixbedingte Signalbeeinflussung bei der massenspektrometrischen Detektion....	143
7.6.6.1	Matrixkalibrierung.....	143
7.6.6.2	Kontinuierliche Nachsäulen-Injektion von CTC.....	143
7.6.7	Präzision .....	143
7.6.7.1	Meßpräzision .....	143
7.6.7.2	Methodenpräzision .....	143
7.6.8	Validierungsparameter für Urin, Kot, Plasma, Knochen, Leber und Niere.....	144
<b>7.7</b>	<b>Identifizierung tautomerer Verbindungen von CTC .....</b>	<b>144</b>
<b>7.8</b>	<b><i>In vitro</i>-Bildung von Metaboliten des CTC .....</b>	<b>144</b>
<b>7.9</b>	<b>Antibiotische Aktivitäten .....</b>	<b>145</b>
7.9.1	Agar-Diffusionstest .....	145
7.9.2	Abbaureaktionen während des Agar-Diffusionstestes.....	145
<b>7.10</b>	<b>Methodenentwicklung zur quantitativen Bestimmung weiterer CTC-Metabolite .....</b>	<b>146</b>
7.10.1	Herstellung einer Standardlösung aus iso-CTC und e-iso-CTC.....	146
7.10.2	Linearer Bereich .....	146
7.10.3	iso-CTC und e-iso-CTC als Summenparameter .....	147
7.10.4	Wiederfindung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC .....	147
7.10.5	Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC .....	147
<b>7.11</b>	<b>Gebundene CTC-Rückstände in Knochen .....</b>	<b>147</b>
7.11.1.1	Freisetzung von CTC aus Knochen.....	147
7.11.1.2	Fluoreszenz-Screening-Test .....	148
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>149</b>
<b>A</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>A 1</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Allgemeine Abkürzungen

AMG	Arzneimittelgesetz
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation
ASE	Accelerated Solvent Extraction
AU	Absorption Units
$\beta$	Massenkonzentration
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
$c_0$	molare Ausgangskonzentration der Lösung
CI	Chemical Ionisation
$c_i$	Analyt-Konzentration der Lösung zum Zeitpunkt i
DAD	Dioden-Array-Detektor
$d_i$	Residuen
DIN	Deutsche Industrie Norm
DPT	Drei-Platten-Test
$DS^2$	Differenz der Varianzen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Europäische Arzneimittelbehörde
ESI	Electrospray Ionisation
FAB	Fast Atom Bombardment
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FDA	Food and Drug Administration
FlHG	Fleischhygienegesetz
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
I	intermediär
ICH	International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Kontrolltier
KG	Körpergewicht
LEJ	Landesamt für Ernährungswirtschaft und Jagd
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MeOH	Methanol

---



---

MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRL	Maximum Residue Limit
MRPL	Minimum Required Performance Limit
MS	Massenspektrometrie
MSPD	Matrix Solid Phase Extraction
MUNLV	Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
n	Anzahl der Meßwerte
nn	nicht nachweisbar
NWG	Nachweisgrenze
P	Signifikanzniveau
p.a.	pro analysi
PG	Prüfgröße
R	resistent
r	Wiederholdifferenz
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
rM	statistischer Tabellenwert für den GRUBBS-Test
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
R <sub>t</sub>	Retentionszeit [min]
RT	Raumtemperatur
S	sensibel
s	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Micro Extraction)
S <sub>rel</sub>	relative Standardabweichung
S <sub>xo</sub>	Verfahrensstandardabweichung
t	Zeit
TMP	Trimethoprim
VB	Vertrauensbereich
V <sub>xo</sub>	relative Verfahrensstandardabweichung
WF	Wiederfindung
x	Konzentration
y	Detektorsignal

---

**Tetracycline**

Anhydro-CTC	Anhydrochlortetracyclin
CTC	Chlortetracyclin
DMCTC	Desmethyhlchlortetracyclin
DC	Doxycyclin
e-Anhydro-CTC	epi-Anhydrochlortetracyclin
e-CTC	epi-Chlortetracyclin
e-iso-CTC	epi-Isochlortetracyclin
iso-CTC	Isochlortetracyclin
MC	Minocyclin
OTC	Oxytetracyclin
RTC	Rolitetracyclin
TC	Tetracyclin

---

## 1 Einleitung

Antibiotika gehören zu den bedeutendsten und am häufigsten eingesetzten human- und veterinärmedizinischen Therapeutika [1]. In der landwirtschaftlichen Tierhaltung finden Antibiotika zum einen zu therapeutischen, also medizinischen, Zwecken, zum anderen aber auch zur Leistungsförderung Anwendung. Der therapeutische Einsatz von Antibiotika erfolgt neben der Behandlung einzelner erkrankter Tiere bei landwirtschaftlichen Nutztieren aufgrund der Haltungsbedingungen in Form von „Massenbehandlungen“, bestandsweise über ganze Lebensabschnitte hinweg, wobei die Medikation meist über das Futter oder Trinkwasser erfolgt. Leistungsförderer sind dagegen im Sinne des Futtermittelgesetzes keine Arzneimittel, sondern „Werkstoffe der Tierernährung“, die oral wirksam sind und bei Nutztieren zu einer Steigerung der Wachstumsrate und der Futterverwertung führen. Die auch als Futterzusatzstoffe bezeichneten Leistungsförderer fallen damit auch nicht unter die Bestimmungen des Arzneimittelgesetzes [2], obwohl sie eine pharmakologische Wirkung aufweisen können. Zur mastleistungssteigernden Wirkung werden auch therapeutisch wichtige Antibiotika in niedriger, subtherapeutischer Dosis verfüttert. In der Europäischen Union stehen derzeit etwa 650 Wirksubstanzen zur Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren zur Verfügung [3]. Daten über die zur Anwendung kommenden Mengen dieser Arzneimittel existieren in den Ländern der Europäischen Union nur in begrenztem Ausmaß. Die FEDESA (Federation Européenne de la Santé Animale) publizierte für das Jahr 1997 Daten über das europaweite Verkaufsvolumen von Antibiotika. Hiernach beträgt der Einsatz von Antibiotika in der Humanmedizin mit 5400 t 52 %, in der Veterinärmedizin mit 3494 t 33 % und der Einsatz als Leistungsförderer in der Landwirtschaft mit 1599 t 12 %. Von den insgesamt EU-weit 5093 t eingesetzten Tierarzneimitteln im Bereich der Veterinärmedizin und der Leistungsförderung entfallen ca. 80 % auf Nutztiere, wobei die Tierarten Schwein, Rind/Kalb, Geflügel, Schaf und Ziege eine besonders große Rolle spielen. Aufgrund einer möglichen resistenzfördernden Wirkung wird der nutritive Einsatz von antibakteriell wirksamen Leistungsförderern stark kritisiert und ist in den letzten Jahrzehnten erheblich eingeschränkt worden. Der Einsatz von Antibiotika als Leistungsförderer ist inzwischen bis auf die vier antimikrobiell wirksamen Substanzen Avilamycin, Monensin-Natrium, Salinomycin-Natrium und Flavophospholipol verboten [2]. Ein kompletter Verzicht auf den Einsatz von Futtermittelzusatzstoffen zur Leistungsförderung wird angestrebt. Von den 3494 t eingesetzten Antibiotika in der Veterinärmedizin entfielen nach der Studie der FEDESA im Jahr 1997 EU-weit die in **Abb. 1** dargestellten Mengen [4].

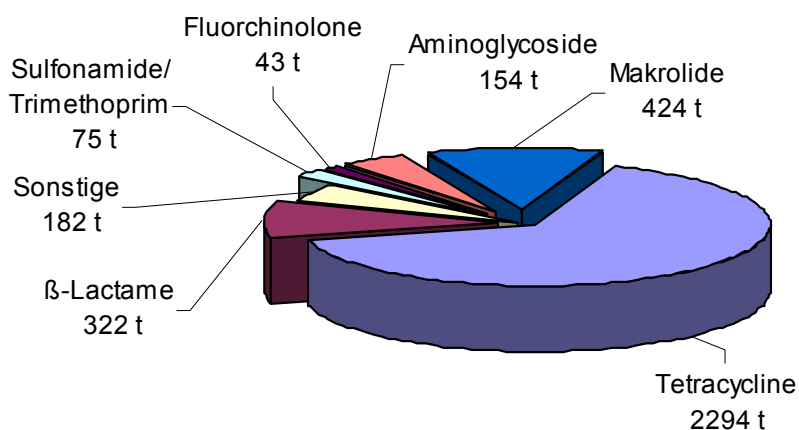


Abb. 1: Mengen der EU-weit in der Tiermedizin eingesetzten Wirkstoffgruppen im Jahre 1997 (in Tonnen), (FEDESA) [4]

Unter den in der Veterinärmedizin gebräuchlichen Antibiotikagruppen machen die Tetracycline mit einem relativen Gesamtverkaufsvolumen von 66 % (2294 t) weit vor den Makroliden (12 %, 424 t) und  $\beta$ -Lactamen (9 %, 322 t) den größten Anteil aus [5, 6]. Für den Einsatz als Leistungsförderer sind Tetracycline bereits seit über 25 Jahren verboten und dürfen seitdem nur noch zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. Dennoch kommt gerade dieser Wirkstoffgruppe eine besondere Bedeutung zu, da es sich um kostengünstige Antibiotika handelt und sie daher vor allem der therapeutischen Anwendung bei Tieren dienen. In der Veterinärmedizin werden im wesentlichen dieselben Wirkstoffgruppen wie in der Humanmedizin angewendet, wobei jedoch einige Vertreter einer Wirkstoffgruppe weitestgehend der Humanmedizin vorbehalten sind. Während von den Tetracyclin-Derivaten in der Humanmedizin über 90 % der verordneten Präparate auf den Wirkstoff Doxycyclin entfallen [7], ist in der veterinärmedizinischen und landwirtschaftlichen Anwendung Chlortetracyclin der bedeutendste Wirkstoff [8-12]. Chlortetracyclin wird oft auch in Kombination mit Sulfonamiden zur Behandlung von Schweinen eingesetzt.

Die sich anfänglich einstellende Euphorie nach Beginn der breiten Antibiotika-Anwendung in den 30er und 40er Jahren wurde sehr bald durch Beobachtungen einer erhöhten Häufigkeit resistenter Bakterienstämme gedämpft. Die rasante zunehmende Verbreitung von Antibiotikaresistenzen hat zu einer Abnahme des medizinischen Behandlungserfolges geführt. Im Bereich von Kliniken, Landwirtschaft und Umwelt ist es zunehmend zu multiplen mobilen Resistenzgenen gekommen. Heutzutage besteht kein Zweifel an der Verbreitung von Resistenzen über Krankenhäuser und in der Umwelt und ist daher als ein globales Problem zu betrachten [13]. Das BfR, ehemals BgVV, erfaßt seit 1992 Resistenzen als Risiko einer Arzneimittelwirkung auf der Grundlage der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift in Ergänzung des § 56 des AMG. An diesem Erfassungsprogramm sind verschiedene veterinärmedizinische Untersuchungsinstitute beteiligt, die Bakterienstämme aus diagnostischem Material auf antimikrobielle Resistenz geprüft haben. Diese Untersuchungen zeigen eine deutliche Zunahme von resistenten pathogenen Erregern, wobei der höchste Anteil resistenter Keime für Sulfonamide und Tetracycline bei Schweinen zu verzeichnen ist [14-17]. Bemerkenswert ist daher der hohe Verbrauch an Tetracyclinen trotz ihrer ungünstigen Resistenzsituation [6, 18]. Für den Anstieg der Resistenzen in der Veterinärmedizin wird der breite Einsatz von Arzneimittelvormischungen als Fütterungsarzneimittel verantwortlich gemacht. Insbesondere die Behandlung ganzer Tierbestände über Lebensabschnitte hinweg durch Arzneimittelfütterung birgt ein besonders hohes Risiko der Resistenzentwicklung in sich, da hierbei eine Vielzahl von Tieren einer Langzeitexposition von häufig zu niedrigen Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt ist [4]. Die Bildung von Kreuzresistenzen innerhalb einer Wirkstoffgruppe sowie das breite Wirkungsspektrum der meisten Antibiotika führt zu einem erhöhten Risiko der Resistenzausbildung. Resistenz ist heute ein generelles klinisches Problem, so daß in vielen nationalen und internationalen Expertenvereinigungen daher Strategien zum gezielteren Einsatz von Antibiotika in der Medizin und Landwirtschaft erarbeitet werden [19-22]. Die Entstehung und Verbreitung von Resistenzen wird heutzutage zunehmend in einem mikrobiell-ökologischen Zusammenhang gesehen [23-26]. Dies bedeutet, daß pathogene Bakterien, die eine Resistenz erlangen, nicht isoliert in ihrem Lebensraum betrachtet werden dürfen, sondern vielmehr als Teil einer Lebensgemeinschaft zwischen Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt zu verstehen sind. Deshalb gibt es vermehrt Untersuchungen zum Verbleib der den Tieren applizierten Wirkstoffe unter besonderer Beachtung des Umwelteintrages [27-36]. Dennoch gibt es noch keine valide Daten hinsichtlich des Antibiotikaeintrages in die Umwelt und die Nahrungskette. Nach dem derzeitigen Wissensstand kann daher keine klare Einschätzung des Gefährdungspotentials für den Verbraucher durch Antibiotika aus veterinärmedizinischer Anwendung

---

und deren Resistenzproblematik gegeben werden.

Im Hinblick auf die rasante Entstehung von Antibiotikaresistenzen bei Mikroorganismen ergab sich die Notwendigkeit, immer neue Wirkstoffe entwickeln zu müssen. Dabei sollte die antibakterielle Wirkung neuer Präparate in Relation zu den bisher wirksamsten Substanzen geprüft werden. Wichtige Beurteilungskriterien sind dabei die Wirkungsintensität, ausgedrückt im MHK-Wert in  $\mu\text{g/mL}$  Substrat, der Wirkungstyp, die Resistenzsituation sowie pharmakokinetische Parameter wie Inaktivierung, Um- und Abbau und Stabilität in verschiedenen pH- und Temperaturbereichen und gegenüber Metabolisierungsprozessen *in vivo* [50]. Zwischen 1940 und 1960 sind die meisten Antibiotika, die heute eine bedeutende therapeutische Rolle spielen, entdeckt worden. Obwohl die Zahl neu entdeckter mikrobiell wirksamer Substanzen seitdem nicht abgenommen hat, sind in den letzten Jahrzehnten nur wenige strukturell neuartige Antibiotika zur Anwendung gekommen. Insbesondere auf dem Tierarzneimittelmarkt zeigt sich ein deutlicher Rückgang von Neuentwicklungen für Nutztiere. Der Hauptgrund liegt darin, daß die Anforderungen an ein neues Antibiotikum ständig gestiegen sind [37]. Die Zeit und die Kosten für eine Neuentwicklung haben enorm zugenommen. Für viele Präparate im Bereich der Tierarzneimittel ist von der pharmazeutischen Industrie aufgrund der hohen Nachzulassungskosten kein Antrag auf Festsetzung einer Rückstandshöchstmenge gestellt worden. Trotz weltweiter Bestrebungen zur chemischen Modifikation natürlicher Antibiotika zur Optimierung der Eigenschaften wie ein erweitertes Wirkungsspektrum, bessere pharmakokinetische und toxikologische Eigenschaften sind bei vielen Infektionskrankheiten die herkömmlichen Ausgangswirkstoffe der Penicilline, Sulfonamide und Tetracycline das Mittel der Wahl [2, 48], wodurch die Bedeutung der klassischen Antibiotika verdeutlicht wird.

Aus dem unvermindert hohen Einsatz von Chlortetracyclin in der Schweinemast und der ungenügenden Datenlage über die hieraus entstehenden möglichen Auswirkungen für den Verbraucher resultiert Forschungsbedarf hinsichtlich des Eintrages dieses Antibiotikums sowie dessen Metabolite in die Nahrungskette. Neben dem direkten Eintrag von Chlortetracyclinrückständen in tierische Lebensmittel sind auch indirekte Eintragspfade über die Einbringung von Chlortetracyclin in die Umwelt von Bedeutung.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Während früher zum Schutz des Verbrauchers zur Vermeidung von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln lediglich die Einhaltung von Wartezeiten herangezogen worden ist, so dürfen mit Einführung der Rückstandshöchstmengenregelung im Jahre 1990 in zur Lebensmittelgewinnung dienenden Tieren in verschiedenen Matrices bestimmte Grenzwerte (MRL  $\triangleq$  maximum residual limit) nicht überschritten werden. Darüber hinaus weisen aber LANGEWISCHE et al. auf eine resistenzfördernde Wirkung von Antibiotikarückständen bei lebensmittelliefernden Tieren hin, die unterhalb der gesetzlich festgelegten Rückstandshöchstmengen, den MRL-Werten, liegen [38]. Bei der Festlegung der MRL-Werte gehen die mikrobiologischen Eigenschaften eines Antibiotikums nur bedingt mit ein, was dazu führt, daß viele MRL-Werte unterhalb der MHK-Werte, den minimalen Hemmstoffkonzentrationen, liegen. Der Konsum tierischer Erzeugnisse kann demzufolge zu einer Resistenzbildung beitragen, da das Wachstum der Keime nicht vollständig verhindert wird und damit eine Promotion resistenter Keime erfolgt.

Obwohl es eine Vielzahl von Untersuchungen zur Metabolisierung und zum Verbleib der in der Tiermast eingesetzten Tetracycline gibt [39-46], fehlt eine genaue Kenntnis über die daraus resultierende Gefährdung für den Verbraucher, insbesondere im Hinblick darauf, daß auch geringe unterhalb der MRL-Werte liegende Arzneimittelgehalte in tierischen Produkten eine Gefährdung für den Verbraucher darstellen können. Bei vielen Veröffentlichungen zur analytischen Bestimmung von Tetracyclinen in Muskulatur, Leber und Niere erfolgt die Festlegung der Bestimmungsgrenze unter Zugrundelegung der MRL-Werte, so daß mit vielen veröffentlichten Verfahren eine Bestimmung von Antibiotikagehalten unterhalb der MRL-Werte nicht zuverlässig möglich ist [185, 210, 239, 310].

Tetracycline besitzen die chemische Eigenschaft, in wäßriger Lösung antibiotisch aktive Epimere, siehe **Abb. 7**, zu bilden, weshalb im Rahmen der MRL-Verfahren festgelegt wurde, den Tetracyclin-Gehalt als Summe von Muttersubstanz und Epimeren zu ermitteln. Zusätzlich bildet vor allem Chlortetracyclin in Abhängigkeit vom pH-Wert weitere Umwandlungs- und Abbauprodukte wie Isochlortetracyclin und Anhydrochlortetracyclin, die in den meisten Fällen in der Literatur wie auch bei der Festlegung der MRL-Werte unberücksichtigt bleiben [172, 194, 195]. Weiterhin erfolgte bei den in der Literatur beschriebenen Analysenverfahren zumeist nur eine ungenügende Überprüfung der Zuverlässigkeit der Verfahren. Es werden zwar teilweise einzelne Validierungsparameter angegeben, jedoch fehlt eine ausführliche Validierung [170, 173, 210]. Eine weitere charakteristische Eigenschaft von Tetracyclinen ist ihre Komplexbildung mit verschiedenen Matrixkomponenten wie z.B. Proteine und Metallkationen, die zu einer Einlagerung von Tetracyclinen in Knochen führt [37, 48]. Es ist umstritten, ob diese gebundenen Tetracyclinrückstände unbedenklich für den Verbraucher sind. Diese Arbeit verfolgt daher folgende Ziele:

Um nähere Erkenntnisse über die Aufnahme, die Metabolisierung und den Verbleib von Arzneimitteln in der Tiermast zu erlangen, wurde vom MUNLV (Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz NRW) im Jahre 2000 ein Verbraucherschutzprogramm gegründet. Ein Schwerpunkt dieses Verbraucherschutzprogrammes sollte hierbei auf der Untersuchung von Chlortetracyclin in der Schweinemast liegen. Ziel dieses Projektes „Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung“ war es, den durch die häufige Anwendung von Chlortetracyclin in der Schweinemast resultierenden Eintrag von Chlortetracyclin in die Nahrungskette sowie das Ausscheidungsverhalten von Chlortetracyclin bei Schweinen und damit den Umwelteintrag zu untersuchen. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sollten dazu dienen, eine Gefährdung für den Ver-

braucher durch den Einsatz von Chlortetracyclin in der Schweinmast besser beurteilen zu können. Bei der Ermittlung der Chlortetracyclinegehalte galt besonderes Augenmerk möglichen Umwandlungs- und Abbauprodukten von Chlortetracyclin. (Anmerkung: Zur Vereinfachung werden alle Umwandlungs- und Abbauprodukte von Chlortetracyclin nachfolgend als „Metabolite“ bezeichnet und für die einzelnen Substanzen die im Abkürzungsverzeichnis aufgeführten Abkürzungen verwendet.)

In einer ersten Medikationsstudie sollten in Zusammenarbeit mit dem Landwirtschaftszentrum Haus Düsse (Haus-Düsse-Studie) Schweine, die unter üblichen landwirtschaftlichen Bedingungen in einer Gruppe von 40 Tieren gehalten wurden, definiert medikamentiert werden und das Ausscheidungsverhalten von CTC in Urin sowie die verbleibenden Rückstände in den Schlachtproben untersucht werden. Zur besseren Beurteilung, welche Mengen der den Tieren applizierten Wirkstoffe wieder ausgeschieden werden, erfolgte in einer zweiten Medikationsstudie an der Bundesforschungsanstalt Braunschweig-Völkenrode (FAL-Studie) eine individuelle Arzneimittelfütterung von fünf Schweinen in Einzelhaltung und eine individuelle Sammlung von Faeces und Urin. Vier dieser Tiere sind nach Ablauf der Wartezeit geschlachtet worden, eines zur Durchführung einer Bilanzierung direkt nach Absetzen der Medikation.

Hieraus ergaben sich im Einzelnen folgende Aufgabenstellungen:

- Zur Untersuchung der in den Medikationsstudien entnommenen Proben sollte in einem ersten Schritt ein HPLC-UV-MS/MS-Verfahren für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Urin, Faeces, Plasma, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen entwickelt werden. Neben der quantitativen Bestimmung von CTC und e-CTC sollte dieses Verfahren auch die qualitative Bestimmung der weiteren Metabolite iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC ermöglichen.
  - Ein weiteres Ziel war, das entwickelte Verfahren zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des unter Berücksichtigung der gültigen Normen und Richtlinien, insbesondere der für Tierarzneimittel gültigen Richtlinie 2002/657/EG, einer ausführlichen Validierung zu unterwerfen.
  - Im Anschluß daran war geplant, den CTC-Gehalt in den bei den Medikationsstudien entnommenen Proben gemäß der EU-Verordnung EWG Nr. 2377/90 als Summe von CTC und e-CTC zu ermitteln. Neben der Quantifizierung von CTC und e-CTC in den genannten Matrices galt es, zu prüfen, welche weiteren Metabolite von CTC in diesen Proben noch vorkommen.
  - Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, welche der in den Proben nachgewiesenen Metabolite von CTC bei der Ermittlung des CTC-Totalgehaltes mit einbezogen werden müssen.
  - Erweiterung des validierten Analysenverfahrens auf die quantitative Bestimmung anderer Metabolite
  - Quantifizierung von CTC und weiterer Metabolite in Schlachtproben
  - Bilanzierung von CTC anhand eines Tieres unter Berücksichtigung weiterer Metabolite
  - Untersuchung gebundener Tetracyclinrückstände in Knochen
-

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Klassifizierung von Antibiotika

#### 3.1.1 Definition, Wirkungstypen und Klassifizierungsmöglichkeiten

Der Begriff der **Chemotherapeutika** wurde 1906 von Paul Ehrlich geprägt und umfaßte synthetisch hergestellte Produkte mit antibiotischer Wirkung, wie die Sulfonamide. Die später entdeckten, von Pilzen produzierten, antimikrobiell wirkenden Substanzen wurden **Antibiotika** genannt. Der Begriff Antibiotika bezeichnet nach seiner ursprünglichen Definition niedermolekulare, mikrobielle Stoffwechselprodukte, die das Wachstum anderer Mikroorganismen inhibieren, jedoch auf den Produzenten selbst nicht wirken [13, 47]. Antibiotika zeichnen sich durch eine geringe erforderliche Wirkstoffkonzentration, die Spezifität ihres Wirkmechanismus und eine geringe Toxizität aus [48-50]. Mit der Aufklärung der chemischen Struktur und den Möglichkeiten der totalen oder partiellen Synthese der Antibiotika und der Darstellung von Derivaten konnte der Begriff der Antibiotika als reine Stoffwechselprodukte nicht mehr aufrecht erhalten werden. Zu den Antibiotika zählen heute alle biosynthetisch, halb- und vollsynthetisch hergestellten antibiotisch wirksamen Substanzen [50].

Allgemein lassen sich in der antibakteriellen Wirkung der Antibiotika verschiedene **Wirkungstypen** unterscheiden, die als *Bakteriostase* und *Bakteriozidie* bezeichnet werden. Während bakteriostatische Antibiotika lediglich das Bakterienwachstum hemmen, führt die Behandlung mit bakteriziden Antibiotika zu einer raschen irreversiblen Keimschädigung [48, 50]. Die meisten Antibiotika zeigen eine bakteriostatische Wirkung, wobei der Wirkungstyp abhängig vom Stadium des Zellwachstums und der Konzentration des eingesetzten Antibiotikums ist. Eine Reihe von Antibiotika wirken auf im Wachstum befindliche Zellen bakterizid, hingegen bei ruhenden Keimen bakteriostatisch. Ebenso können primär bakteriostatisch wirksame Präparate mit einem Vielfachen ihrer minimalen Hemmkonzentration bakterizide Eigenschaften zeigen.

Die unterschiedlichen Wirkungstypen der Chemotherapeutika haben praktische therapeutische Bedeutung. Bakterizide Antibiotika sind bei allen Infektionen indiziert, bei denen die körpereigene Abwehr geschwächt ist, da bei einer Therapie mit bakteriostatischen Antibiotika körpereigene Abwehrmechanismen zur Elimination der Infektionserreger eine entscheidende Rolle spielen. Eine lang anhaltende bakteriostatische Wirkung führt bei empfindlichen Keimen zu einer sekundären Keimabtötung. Daher erfordert die Therapie mit bakteriostatisch wirksamen Substanzen die Aufrechterhaltung eines wirksamen Dauerspiegels in Blut und Gewebe. Zur Therapie von Infektionen mit bakteriziden Präparaten sind oft intermittierende Gaben ausreichend. Körpereigene Abwehrmechanismen sind bei bakteriziden Substanzen nur zur Elimination sogenannter Persister erforderlich. Das Persistenzphänomen führt zum Überleben einzelner Keime trotz optimaler, bakterizide Wirkstoffkonzentration am Infektionsort und trotz unveränderter Empfindlichkeit der Keime [50]. Die Persistenz muß grundsätzlich vom Phänomen der Resistenz, bei der Keime eine verminderte Empfindlichkeit aufweisen, unterschieden werden.

Eine **Klassifizierung von Antibiotika** kann unter Berücksichtigung der Herkunft, der biologischen Wirkung, der therapeutischen Anwendung, der chemischen Struktur, des Biosyntheseweges und des zellulären Wirkmechanismus erfolgen [47]. Zunächst werden Antibiotika nach ihrer chemischen Struktur klassifiziert. In **Abb. 2** sind die Strukturen der gebräuchlichen Antibiotikaklassen dargestellt

---



[2, 13, 48, 49].

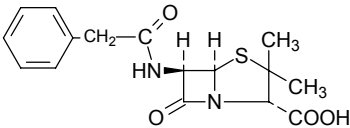
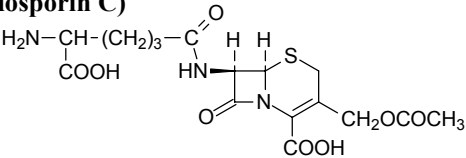
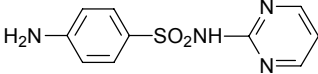
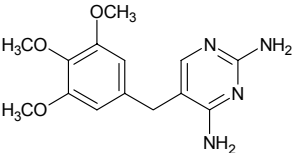
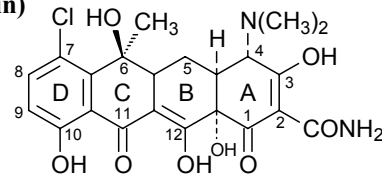
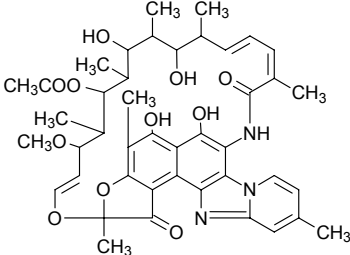
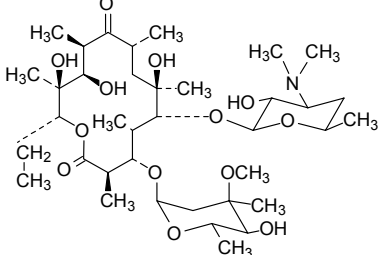
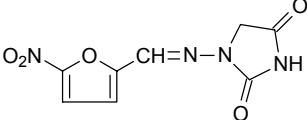
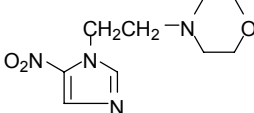
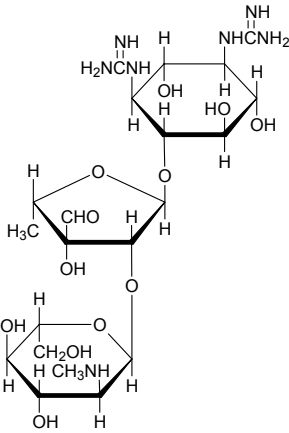
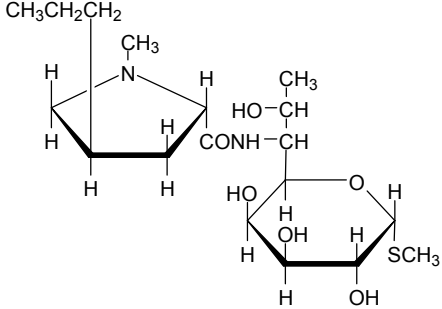
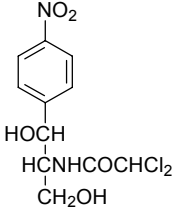
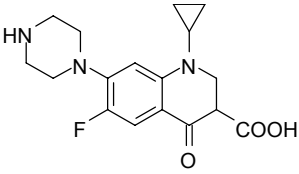
<b>Penicilline (Benzylpenicillin)</b> 	<b>Cephalosporine (Cephalosporin C)</b> 
<b>Sulfonamide (Sulfadiazin)</b>   <b>Trimethoprim</b> 	<b>Tetracycline (Chlortetracyclin)</b> 
<b>Ansamycine (Rifaximin)</b> 	<b>Makrolide (Erythromycin)</b> 
<b>Nitrofurane (Nitrofurantoin)</b> 	<b>Nitroimidazole (Nimorazol)</b> 
<b>Aminoglycoside (Streptomycin)</b> 	<b>Lincosamide (Lincomycin)</b> 
<b>Amphenicole (Chloramphenicol)</b> 	<b>Chinolone (Ciprofloxacin)</b> 

Abb. 2: Struktureller Aufbau der Antibiotikastoffklassen [2, 13, 48, 49]

Darüberhinaus kann eine weitere Klassifizierung der Antibiotikastoffklassen nach dem **Wirkmechanismus** erfolgen. Zur Wachstumshemmung von pathogenen Mikroorganismen muß das Antibioti-

kum in die Zelle eindringen, spezifisch an eine für den Erhalt von Lebensprozessen erforderliche Zellstruktur binden und deren Funktion unterbinden. Zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der antibiotischen Wirkung wird nachfolgend zunächst der Aufbau von Bakterienzellen erläutert.

### 3.1.2 Aufbau von Bakterienzellen

Unter dem Begriff Mikroorganismen werden einzellige Lebewesen, die aufgrund ihrer geringen Größe nur mit mikroskopischen Verfahren erkannt werden können, zusammengefaßt. Mikroorganismen lassen sich aufgrund ihrer einfachen morphologischen Merkmale weder den Pflanzen noch den Tieren eindeutig zuordnen. Sie werden in sogenannte höhere und niedere Protisten unterteilt. Zu den höheren Protisten gehören Pilze und Algen, zu den niederen Bakterien. Der Zellbau der höheren Protisten ist ähnlich dem der Pflanzen und Tiere. Aufgrund des Vorhandenseins eines Zellkerns gehören sie zu den Eukaryonten. Bakterien hingegen besitzen einen anderen Zellaufbau. Ihnen fehlt insbesondere ein typischer, durch eine Zellmembran gegen den übrigen Zellinhalt abgegrenzter, Zellkern sowie Mitochondrien und Chloroplasten und daher zählen sie zur Gruppe der Prokaryonten [51]. Der anatomische Aufbau einer Bakterienzelle ist in **Abb. 3** schematisch dargestellt. Bakterien bestehen aus dem Nukleoid als Kernäquivalent, dem Zytoplasma mit Ribosomen, der Zytoplasmamembran und einer relativ starren Zellwand.

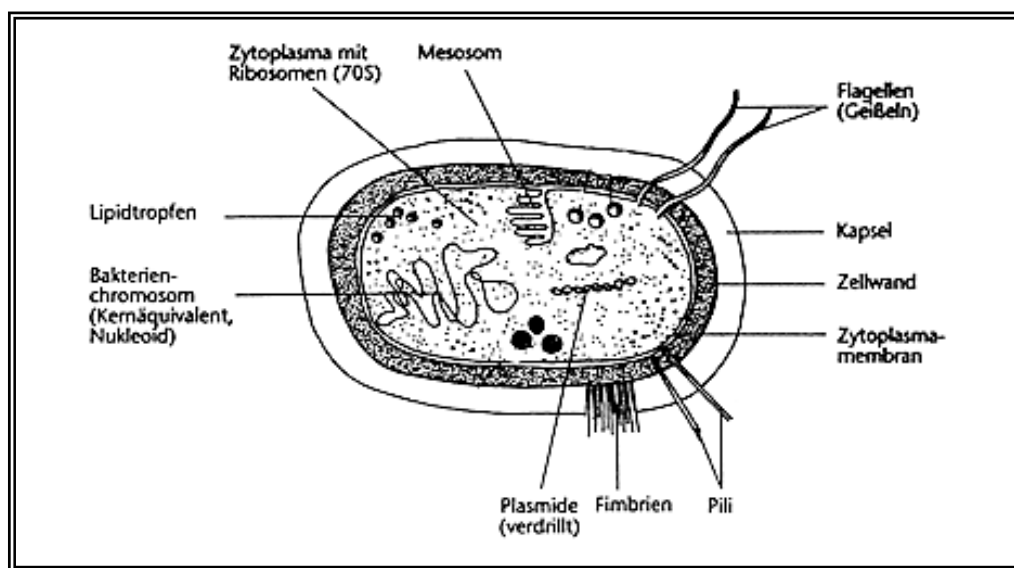


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Bakterienzelle [52]

Bakterien besitzen nicht diffus im Zytoplasma verteilte DNA, sondern diese ist in diskreten Bereichen, dem *Nukleoid*, lokalisiert [53]. Das Nukleoid enthält ein ringförmig geschlossenes DNA-Molekül als Genom, dem sogenannten Bakterienchromosom. Es liegt in stark gefalteteter und verdrehter Form ohne Abgrenzung durch eine Kernmembran frei im Zytoplasma. Das Nukleoid kann einzeln oder in 2-4 Kopien vor der Zellteilung im Zytoplasma vorliegen. Außer dem Bakterienchromosom können im Zytoplasma noch extrachromosomale ringförmig geschlossene, kleine Satelliten-DNA-Moleküle vorkommen. Diese sogenannten Plasmide können Träger von Genen sein, die den Bakterienzellen zusätzliche Eigenschaften verleihen wie z.B. Antibiotikaresistenz. Das von der Zytoplasmamembran umschlossene *Zytoplasma* enthält neben Wasser, Salzen, Enzymen Stoffwechselintermediärprodukte,

Proteine und Ribonukleinsäure (mRNA, rRNA und tRNA). Zusätzlich findet sich im Zytoplasma eine große Anzahl von Ribosomen, die Orte der Proteinbiosynthese. Eine Bakterienzelle enthält ungefähr 5000-50000 Ribosomen. Aufgrund ihrer Funktion der Proteinbiosynthese besitzen sie eine komplizierte Struktur. Ribosomen bestehen aus etwa 60 % RNA und 40 % Protein, wobei etwa 80-85 % der Bakterien-RNA in den Ribosomen enthalten sind. Die intakten Ribosomen sedimentieren in einer Ultrazentrifuge mit einer Geschwindigkeit von 70 SVEDBERG-Einheiten (Sedimentationskonstante: 70 S) und haben daher auch die Bezeichnung 70 S-Ribosomen im Gegensatz den etwas größeren 80 S-Ribosomen der Eukaryonten. Jedes Ribosom setzt sich aus einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammen, deren Sedimentationskoeffizient bei 50 S und 30 S liegt. Die Aufklärung der strukturellen Zusammensetzung der Ribosomen aus RNA und Basensequenz der Proteine sowie deren Funktion ermöglichte weitgehend die Aufdeckung des Wirkmechanismus von Antibiotika, die mit der Proteinbiosynthese interferieren.

Die *zytoplasmatische Membran* besteht aus einer Lipiddoppelschicht, deren hydrophobe Enden der Phospholipide und Triglyceride nach innen und die hydrophilen Enden nach außen der Zelle weisen. In diese Doppelschicht sind Proteine eingelagert, die die Membran ganz durchkreuzen oder nur teilweise eintauchen können. Die *Zytoplasmamembran* hat entscheidende Stoffwechselfunktionen. Sie ist die Permeabilitäts-Barriere der Zelle und kontrolliert Stoffaufnahme und -abgabe. Enzymsysteme in der Zytoplasmamembran bewirken z.B. den Elektronentransport, die Atmungsketten-Phosphorylierung, die Biosynthese von Lipiden und der Zellwand und die Replikation der DNA. Die *Zellwand* von Bakterien kann unterschiedlich aufgebaut sein. Es werden nach dem Färbeverfahren von GRAM grampositive (blau-schwarz gefärbte Zellen) und gramnegative (rot-gefärbte Zellen) Bakterien unterschieden [51, 53, 54]. Das Grundgerüst sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien basiert auf einer netzartigen Struktur von Polysaccharidketten, dem Glykan, die über kurze Peptidketten miteinander verknüpft sind. Dieses auch als Murein bezeichnete Peptidoglykan bildet auf diese Weise ein dreidimensionales Makromolekül, das sich über die gesamte Zelloberfläche erstreckt. Da diese Mureinstruktur der bakteriellen Zelle nicht bei Pflanzen und Tieren anzutreffen ist, können Antibiotika, die mit der Biosynthese des Peptidoglykans interferieren, angewendet werden, ohne daß die Zellen des Makroorganismus geschädigt werden. Der Hauptbestandteil **grampositiver** Bakterien ist das Peptidoglykan. Auf der Mureinhülle befindet sich eine Schicht aus sauren Polysacchariden, wodurch die Permeabilität durch die Zellwand grampositiver Bakterien sehr gut ist [49]. Die Zellwand **gramnegativer** Bakterien enthält weniger Peptidoglykan und ist komplexer in ihrer Struktur. Die zytoplasmatische Membran und die Mureinhülle sind durch einen sogenannten periplasmatischen Spalt getrennt, der Enzyme und andere Proteine enthält. Eine äußere Membran, die aus vielschichtigen Lipopolysacchariden und Lipoproteinen besteht, umhüllt die Zellwand. Diese äußere Membran ist für die geringe Permeabilität der gramnegativen Zellwand verantwortlich, da Antibiotika nur über die engen Porin-Poren in die Zelle eindringen können. Aufgrund der höheren Permeabilität der Zellwand grampositiver gegenüber der gramnegativer Bakterien haben die meisten Antibiotika gegen grampositive Bakterien eine höhere Wirksamkeit als gegen gramnegative Bakterien [49, 53].

### 3.1.3 Wirkmechanismen, Struktur-Wirkungsbeziehungen und Wirkungsspektren

#### 3.1.3.1 Einteilung der Antibiotika nach Wirkmechanismen

Antibiotika wechselwirken in Zellen mit Nucleinsäuren (DNA, messenger-RNA (mRNA), ribosomale RNA (rRNA), transferRNA (tRNA)), Proteine und Biomembranen. Durch Bindung des Wirkstoffes an den Wirkort wird die normale Funktion des jeweiligen Biomoleküls inhibiert bzw. qualitativ so verändert, daß es seine Aufgabe innerhalb der Zelle nicht mehr wahrnehmen kann [47].

Die Bindung kann durch chemische Reaktion des Antibiotikums mit reaktionsfähigen Gruppen des Biomoleküls sowie durch zwischenmolekulare Wechselwirkungen, die den konformativen und energetischen Zustand von Makromolekülen wie z.B. Nucleinsäuren oder Enzymen verändern, erfolgen. Häufig werden in einem ersten Schritt durch die Wechselwirkungen zwischen Antibiotikum und Biomolekül Konformationsveränderungen und Bindungsinstabilitäten ausgelöst, die schließlich zu irreversiblen chemischen Strukturveränderungen des Makromoleküls führen, z.B. Strangbrüche der DNA, Substitution reaktiver Gruppen in Enzymzentren. Die resultierende Hemmung der zellulären Prozesse kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen [47]:

- direkte Unterbrechung des biologischen Informationsflusses von der DNA über die RNA zu den Proteinen
- Inhibierung von Stoffwechselleistungen, die den Informationsfluß indirekt durch Bausteinbereitstellung und Energieversorgung gewährleisten
- Veränderung der Wechselwirkungen der Zellen mit ihrer Umgebung: Beeinflussung der Struktur und Funktion der Zellbegrenzung (Zellwand, biologische Membranen), der Penetration und des Transportes von Metaboliten

Diese Möglichkeiten des zellulären Eingriffs sind eng miteinander verknüpft, und es ist daher nicht immer möglich, einen spezifischen Wirkort anzugeben. Häufig erfolgen auf zellulärer Ebene mehrere verschiedene Veränderungen bei Einwirkung von Antibiotika. Üblicherweise werden Antibiotika über eine strukturelle Zuordnung hinaus, siehe **Kap. 3.1.1**, anhand ihrer Wirkmechanismen klassifiziert [47, 49]. In **Abb. 4** sind die einzelnen Wirkmechanismen bzw. Wirkorte aufgeführt.

Die *synthetischen Chemotherapeutika mit spezifischen Wirkmechanismen (Folsäurestoffwechsel, DNA-Replikation)* werden aus historischen Gründen zu einer Gruppe zusammengefaßt. Hierzu zählen Sulfonamide, Trimethoprim, Nitrofurane und Chinolone [2, 49]. Sulfonamide zeigen mit Trimethoprim eine synergistische Wirkung, indem sie aufeinanderfolgende Schritte der Folsäuresynthese hemmen, und deshalb haben sie vor allem in Kombination in der Veterinärmedizin therapeutische Bedeutung [13]. Nitrofurane beeinträchtigen die Protein- und Nucleinsäuresynthese und bewirken eine Schädigung der DNA in Form von Doppelstrangbrüchen und gestörter Energiebilanz. Nitroimidazole und Chinolone wirken als Hemmstoffe des bakteriellen Enzyms Gyrase, was eine Zerstörung der superhelikalen Form der DNA-Stränge bewirkt.

Zu den *zellwandwirksamen Antibiotika* zählen die zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehörenden Penicilline, Cephalosporine und Glykopeptidantibiotika. Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika stellen heute die wichtigste Wirkstoffgruppe gegen bakterielle Infektionen im humanmedizinischen Bereich dar, weil sie eine sehr geringe Toxizität aufweisen. Sie wirken bei wachsenden Keimen bakterizid, bei ruhenden nur bakte-

riostatisch. Alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika inhibieren das Endstadium der Peptidoglykansynthese und verhindern damit die Schließung der Peptidbrücke zwischen den Glykansträngen, was zu einer mechanischen Instabilität der Zellwand führt. Die Zellwand kann demzufolge dem osmotischen Druck des Zytoplasmas nicht standhalten, und es erfolgt der Zelltod durch Plasmolyse.

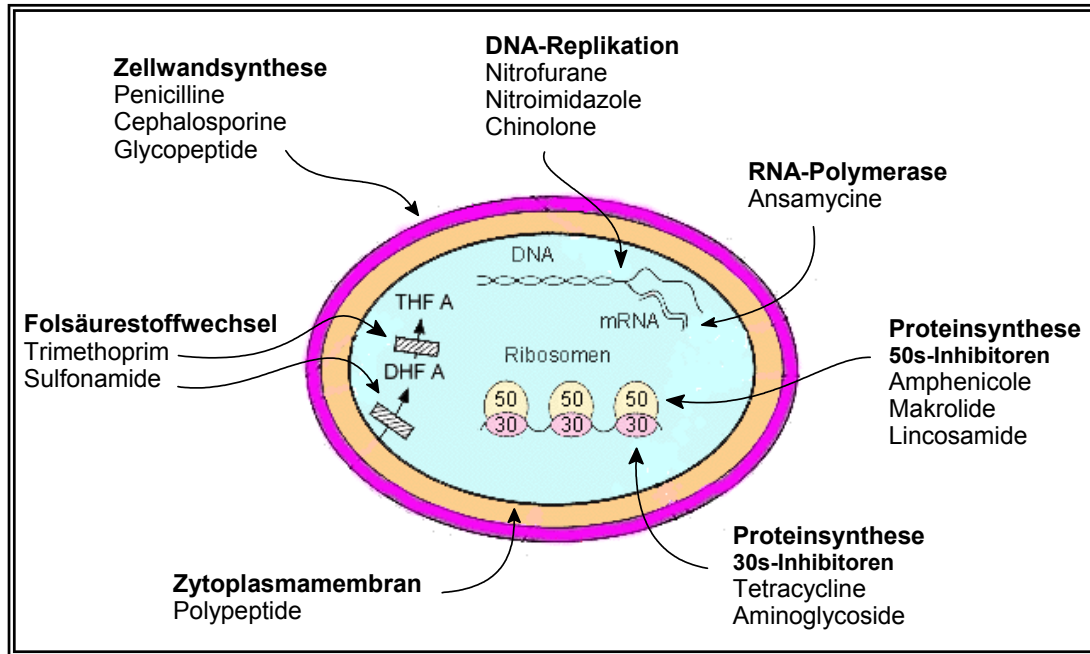


Abb. 4: Wirkmechanismen oder Wirkorte von Antibiotika [49, 55]

Zur Gruppe der *zytoplasmamembranwirksamen Antibiotika* gehören Polypeptidantibiotika, die sich in die Zytoplasmamembran einlagern und mit Phospholipidkomponenten der Zellmembran reagieren. Als Folge davon wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht, was schließlich zum Verlust von essentiellen Plasmabestandteilen führt, und die Zellen sterben ab. Daher sind Polypeptidantibiotika vom Wirkungstyp bakterizid.

Eine wichtige Rolle spielen *Antibiotika, die auf die Proteinsynthese einwirken*. Dies sind die Ansamycine, Tetracycline, Aminoglycoside, Amphenicole, Makrolide und Lincosamide. Bis auf die bakterizid wirksamen Aminoglycoside zeigen alle anderen Antibiotika einen bakteriostatischen Wirkungstyp. Alle Antibiotika dieser Gruppe inhibieren letztendlich die Proteinbiosynthese auf unterschiedlichen Stufen. Ansamycine hemmen die DNA-abhängige RNA-Polymerase. Amphenicole, Makrolide und Lincosamide binden reversibel an die 50 S-Untereinheit der Ribosomen. Durch eine Hemmung der Peptidyltransferase wird die Peptidkettenbildung verhindert. Die Wirkung von Tetracyclinen und Aminoglycosiden beruht auf einer Bindung des Antibiotikums an die 30 S-Untereinheit der Ribosomen. Tetracycline werden reversibel, Aminoglycoside irreversibel gebunden. Deshalb wirken Tetracycline bakteriostatisch und Aminoglycoside bakterizid.

### 3.1.3.2 Wirkungsspektrum von Antibiotika

Das Wirkungsspektrum ist für jedes einzelne Antibiotikum individuell sehr verschieden und hängt von dem Wirkungstyp, der Wirkung in der Vermehrungs- oder Ruhephase, der extra- und intrazellulären Wirkung und des Resistenztyps ab. Durch total- oder partialsynthetische strukturelle Modifikationen von Wirkstoffen lassen sich auch innerhalb einer Substanzklasse Antibiotika mit unterschiedlichen

Wirkungsspektrum herstellen [37, 47, 50]. Zur Erzielung eines therapeutischen Erfolges sollten Antibiotika gegen möglichst viele Keime wirken, also ein möglichst breites Wirkungsspektrum aufweisen. Um die Ausbildung resistenter Keime dagegen möglichst gering zu halten, sollten Antibiotika ein eingeschränktes Wirkungsspektrum besitzen. Antibiotika mit begrenztem Wirkungsbereich vorwiegend gegenüber grampositive Keimarten sind die klassischen Penicilline, Cephalosporine und Makrolide. Vorwiegend gegen gramnegative Keime wirksam sind die Polypeptidantibiotika. Obwohl das Wirkungsspektrum von Aminoglycosidantibiotika eine Vielzahl von Erregern umfaßt, spielen sie insbesondere aufgrund ihrer bakteriziden Wirkung bei der Bekämpfung von Infektionen mit gramnegativen Erregern eine große Rolle. Zu den klassischen Breitbandantibiotika gehören die Sulfonamide, Tetracycline, Amphenicole und einige partialsynthetische Penicilline. Sie wirken gegen zahlreiche grampositive und gramnegative sowie aerobe und anaerobe Infektionserreger. Als empfindlich gegenüber Tetracyclinen gelten Keime mit einer MHK von 0,1-5,0 µg/mL. Die Unterschiede in der Wirkungsintensität der einzelnen Tetracycline spielen *in vivo* keine wesentliche Rolle. Tetracycline wirken gegen extra- und intrazelluläre Erreger, allerdings besser auf Keime im Wachstumsstadium als auf ruhende Keime.

### 3.1.3.3 Wirkmechanismus der Tetracycline

Tetracycline erreichen passiv über Porin-Proteine den periplasmatischen Raum und passieren anschließend durch aktive Transportsysteme die innere Membran. Obwohl mehrwertige Metall-Kationen die Tetracyclin-Wirkung durch Bildung antibakteriell unwirksamer Chelate antagonisieren, wird vermutet, daß zweiwertige Metall-Ionen, insbesondere  $Mg^{2+}$ -Ionen, durch reversible Bildung von Komplexen beim Transport des Antibiotikums durch die Zellmembran in die Bakterienzelle eine Rolle spielen [2, 37]. Eine Voraussetzung der Wirkung von Tetracyclinen beruht darauf, daß eine Akkumulation von Tetracyclinen im Zellinneren stattfindet. Obwohl Tetracycline bei erstmaligem Kontakt mit einem Bakterium die äußere Zellwand und die Zytoplasmamembran in beide Richtungen passieren können, wird nach Eindringen des Tetracyclins ein Mechanismus induziert, wodurch eine Akkumulation hervorgerufen wird, so daß schließlich die Proteinbiosynthese völlig zum Erliegen kommt [47, 48]. In der Bakterienzelle erfolgt dann die reversible Bindung an die ribosomale 30 S-Untereinheit der 70 S-Ribosomen mit einhergehender Hemmung der Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorregion der Ribosomen, was zum Abbruch der Kettenverlängerung führt [49, 53]. Tetracycline wirken deshalb bakteriostatisch. Bakterielle Ribosomen verfügen über eine deutlich höhere Affinität zu Tetracyclinen als die 80 S-Ribosomen der eukaryontischen Zellen, was die geringe Toxizität für den Menschen erklärt [48].

## 3.2 Struktureller Aufbau und Struktur-Wirkungsbeziehungen der Tetracycline

### 3.2.1 Struktur und Nomenklatur

Unter dem Begriff Tetracycline wird eine Reihe von antibiotisch wirksamen Verbindungen zusammengefaßt, die sich vom Grundgerüst des Tetracyclins ableiten. Das Tetracyclin besteht aus einem System aus vier linear anellierten sechsgliedrigen Ringen, dem 4-Dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,6,10,12,12a-penta-hydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacencarb-

oxamid. Unterschiedliche Substituenten ( $R_1$ - $R_4$ ) an den Positionen 5, 6 und 7 konstituieren die heute handelsüblichen Präparate. Aufgrund der charakteristischen Anordnung der Doppelbindungen werden die beiden durch das  $sp^3$ -Kohlenstoffatom 12a getrennten chromophoren Bereiche A und BCD unterschieden. Die Kohlenstoffatome 4, 4a, 5, 5a, 6 und 12a sind bei entsprechender Substitution asymmetrisch. OTC besitzt sechs, TC, CTC und DMCTC dagegen besitzen fünf chirale Zentren mit (S)-Konfiguration, die das Molekül optisch aktiv machen. Die absolute Konfiguration des Systems ist durch Röntgenstrukturuntersuchungen, NMR- sowie CD-Messungen ermittelt worden [49, 57, 56]. In **Abb. 5** sind die wichtigsten Vertreter der Tetracyclin-Antibiotika zusammengefasst.

Chlortetracyclin war das erste isolierte Antibiotikum der Tetracyclinreihe und wurde 1947 von B.M. Duggar in den Lederle Laboratories entdeckt. Er erkannte das als Aureomycin bezeichnete Chlortetracyclin als eine neue von Bodenbakterien (Actinomyceten = Strahlenpilze) erzeugte antibiotische Substanz und isolierte sie daraus [57]. „Terramycin“ wurde 1950 von FINLAY et al. bei der Firma Chas. Pfizer and Co. aus *Streptomyces rimosus* isoliert und strukturell als Oxytetracyclin aufgeklärt. Tetracyclin wurde 1953 entdeckt und zunächst partialsynthetisch durch katalytische Hydrierung von dem als Chlortetracyclin identifizierten Aureomycin hergestellt.

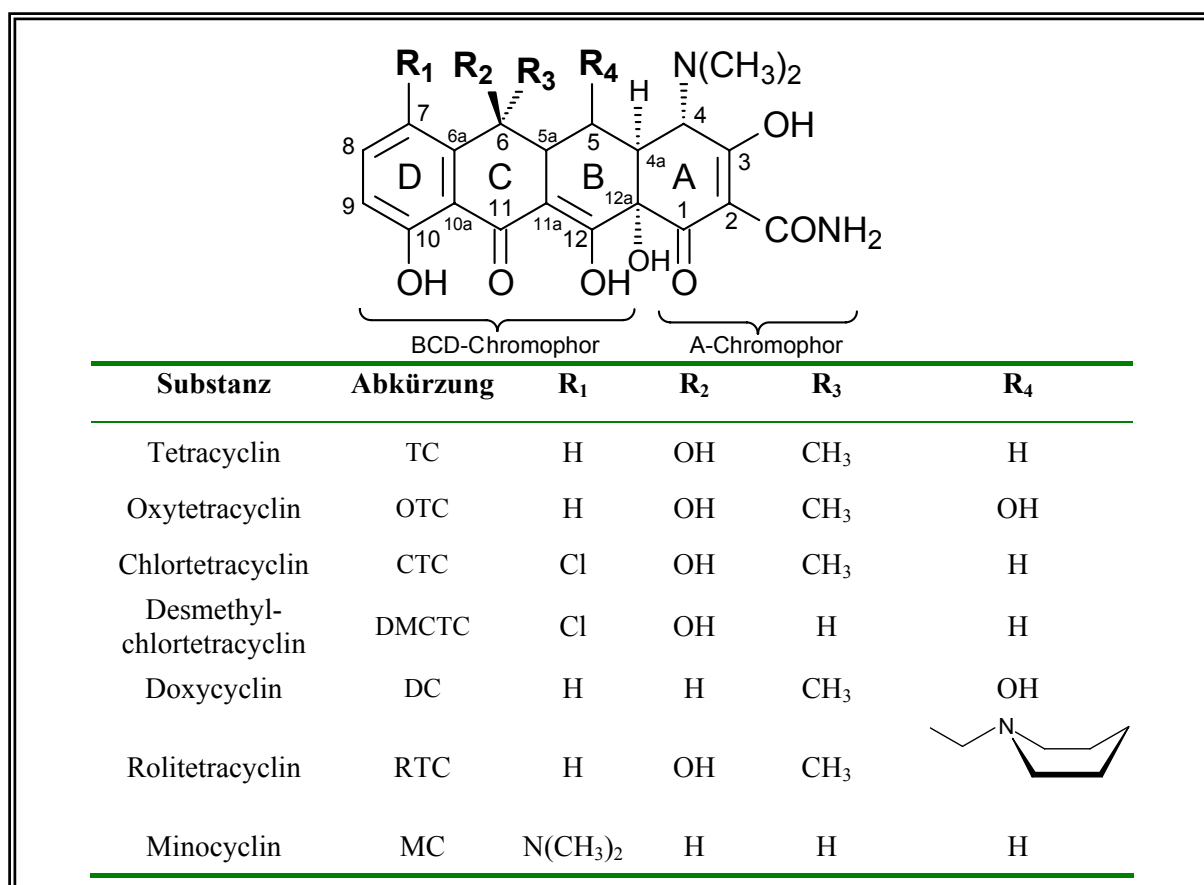


Abb. 5: Struktur der Tetracyclin-Derivate [48, 49]

Die erste Totalsynthese des DL-6-Desmethyl-6-desoxytetracyclin gelang Woodward und einer Arbeitsgruppe der Firma Chas. Pfizer and Co. im Jahre 1962. Tetracyclin wurde erstmals im Jahre 1968 von Muxfeldt synthetisiert. Aufgrund des Aufwandes der Totalsynthesen haben diese keinen Eingang in die industrielle Herstellung finden können. Die meisten modifizierten Tetracyclinderivate werden daher partialsynthetisch aus den fermentativ erhältlichen Grundtetracyclinstrukturen gewonnen [58, 59,

60]. Chemische Modifikation von den klassischen Tetracyclinen dienen dazu, die pharmakologischen Eigenschaften zu verbessern. Dazu gehören Rolitetraacyclin, Doxycyclin und Minocyclin.

### 3.2.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Tetracyclinen

Für die antibiotische Wirkung spielt die Struktur der Tetracycline eine wichtige Rolle. Eine grundlegende strukturelle Voraussetzung für eine antibiotische Wirksamkeit ist die lineare Anordnung der vier Ringe und die beiden chromophoren Keto-Enol-Systeme im Ring A und den Ringen BCD (siehe **Abb. 5**). Alle Derivate mit weniger als vier Ringen sind wirkungslos. Der Austausch der Dimethylaminogruppe durch eine primäre Aminogruppe beeinflusst die Wirksamkeit nicht, hingegen führen alle anderen Veränderungen der basischen Dimethylaminofunktion am Ring A zu einem Verlust der antibiotischen Wirkung. Während der Amidwasserstoff sich durch eine Methylgruppe ersetzen läßt, wirken sich größere Reste negativ aus. Die Konfiguration an den Asymmetriezentren C4, C4a und C12a ist essentiell, dagegen kann sie an C5, C5a und C6 variiert werden. Der hydrophobe Teil des Moleküls von C5 bis C9 ist in vielfältiger Weise modifizierbar, die zu Produkten mit größerer Stabilität, höherer Wirkungsintensität und günstigeren pharmakokinetischen Eigenschaften führen [37, 48]. Im Gegensatz zu den Tetracyclinen selbst zeigen die Anhydrotetracycline als Dehydratationsprodukte, siehe **Kap. 3.5.3.4**, einen vollkommen anderen Wirkungsmechanismus. Sie interferieren mit der Cytoplasmamembran und verursachen so Zellschäden, die zur Lyse und damit zum Tod der Zelle führen. Ihre Wirkung ist also bakterizid. Die Verabreichung von Anhydrotetracyclinen führt zu schweren Nebenwirkungen aufgrund ihrer mangelnden Spezifität infolge ihrer Interferenz mit der Cytoplasmamembran prokaryotischer und eukaryotischer Zellen [61, 62].

## 3.3 Pharmakologie der Tetracycline

Die verschiedenen Tetracyclin-Derivate unterscheiden sich in ihrer enteralen Resorbierbarkeit, ihrer Plasmaeiweißbindung, der Eliminationsgeschwindigkeit, dem Ausscheidungsweg und ihrer Neigung zur Komplexbildung. Während CTC, TC, OTC und DMTC nur unvollständig resorbiert werden, eine geringe Plasmaproteinbindung und Serumhalbwertszeiten zeigen, ergibt sich für Doxycyclin und Minocyclin aus ihren vergleichsweise hydrophoberen Eigenschaften eine fast vollständige, enterale Resorption, eine höhere Eiweißbindung, eine bessere Diffusion in die Gewebe und eine längere Wirkungsdauer [48, 49, 63]. Das Wirkungsoptimum liegt für TC, OTC, CTC und DC in einem pH-Bereich von 6,1-6,6, für DMTC zwischen pH 6,6 - 7,3 [2, 50, 337]. Die Komplexbildungseigenschaften der Tetracycline führen sowohl beim Menschen als auch bei Tieren zur Anreicherung als Calciumphosphat-Komplexe in Gewebe, die reich an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind, wie Knochen und Zähnen. Insbesondere bei Kindern in der Wachstumsphase können hohe Tetracyclindosen zu Wachstumsverzögerungen und Schädigungen von Knochen und Zähnen führen [37, 64, 65]. Die Menge der eingelagerten Tetracycline nimmt mit steigender Dosis zu, wobei als limitierender Faktor die mögliche Resorptionsrate zu berücksichtigen ist, was insgesamt zu keinem linearen Zusammenhang zwischen verabreichter Dosis und Tetracyclinegehalt in den Knochen führt. Im humanmedizinischen Bereich wird wegen der günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften bei gleichwertiger antibiotischen Wirksamkeit Doxycyclin der Vorzug gegeben [129, 337].

Im veterinärmedizinischen Bereich kommen überwiegend die Tetracyclin-Derivate TC, OTC und CTC zur Anwendung, wobei aufgrund der Behandlung ganzer Tierbestände in der Massentierhaltung die



Applikation meist oral über das Futter erfolgt. Nach oraler Gabe werden Serummaxima von TC, OTC und CTC nach 3-4 Stunden, von DMTC erst nach 5-6 Stunden erreicht. Eine bei oraler Gabe gleichzeitige Aufnahme von Metallionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit der Nahrung führt zu einer Komplexierung der Tetracycline und verhindert die Resorption. Die Unsicherheit der Resorption aus dem Magen-Darm-Kanal kann durch parenterale (intravenös, intramuskulär) Gabe vermieden werden, wobei eine Reduzierung der Dosis auf 25 % der oralen Dosis möglich ist. Es werden schnell und zuverlässig hohe Serumkonzentrationen erreicht. Zur intravenösen Anwendung eignen sich die in wäßrigen Lösungsmittel gut löslichen hydrophilen Wirkstoffe wie Rolitetraacyclin und Oxytetraacyclin. Von einer intramuskulären Gabe ist aufgrund von Entzündungen des Gewebes und daher schmerzhaften Anwendung abzusehen [48, 337]. Neben der intravenösen Anwendung von Tetracyclinen spielt trotz schlechterer Resorption die orale Applikation aufgrund der einfach durchführbaren Anwendung die größte Rolle. Hohe Konzentrationen werden in Leber, Lungen, Niere, Milz und Skelettmuskulatur erreicht, geringe Konzentrationen in Fettgewebe und Speichel [48]. Während Tetracycline die Placenta passieren und in die Muttermilch übergehen, können sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren [2].

Die pharmakokinetischen Eigenschaften hängen dabei stark vom Tetracyclinderivat ab, siehe **Tab. 1** [2, 66-72].

*Tab. 1: Pharmakokinetische Kennndaten der Tetracycline bei Tieren [2, 48, 49, 50]*

<b>Wirkstoff</b>	<b>Enterale Resorption [%]</b>	<b>Eliminationshalbwertszeit [h]</b>	<b>Proteinbindung [%]</b>	<b>Ausscheidung im Urin [%]</b>
Tetracyclin	50-80	5-10	40-80	50-85
Chlortetracyclin	30	5-9	45-60	20
Oxytetraacyclin	60	8-11	30-40	30
Doxycyclin	70-90	8-18	80-90	40
Minocyclin	90	12-18	70-80	10-15

In den veterinärmedizinischen Lehrbüchern gibt es widersprüchliche Angaben über eine mögliche Metabolisierung von Tetracyclinen. Während in einigen Lehrbüchern kaum von einer Metabolisierung ausgegangen wird [2], wird in anderen Büchern angegeben, daß Tetracycline in unterschiedlichem Ausmaß zwischen 30 % und 50 % im tierischen Organismus „metabolisiert“ und inaktiviert werden [48]. Es erfolgt jedoch keine genaue Angabe über mögliche Metabolisierungsreaktionen. Daher ist davon auszugehen, daß bei den in veterinärmedizinischen Lehrbüchern angegebenen pharmakokinetischen Kennndaten [2, 48, 49, 50] mögliche Metabolite wie Epimere, Isomere und Anhydroverbindungen unberücksichtigt bleiben. In neueren Veröffentlichungen von KENNEDY et al. [143] und ZURHELLE et al. [178, 229] werden als Hauptmetabolite von Chlortetracyclin neben dem Epimeren auch iso-CTC und e-iso-CTC beschrieben, wobei jedoch bis heute Uneinigkeit über die Mechanismen der Metabolisierung herrscht. Während einige Autoren eine rein pH-Wert abhängige Inaktivierung ohne enzymatischen Einfluß beschreiben [73, 337], gehen andere Arbeitsgruppen wie ZURHELLE et al. von einer tatsächlichen enzymatischen Metabolisierung aus [153].

Die den Tieren applizierten Tetracycline werden aber auch in hohem Maße unverändert wieder ausgeschieden [73, 74]. Die Exkretion der Tetracycline erfolgt dabei durch glomeruläre Filtration über die Niere und über die Galle. In der Galle sind die Konzentration hoch und betragen bis zum 10fachen der Plasmawerte. Die über Faeces ausgeschiedenen Tetracycline stammen aus der Galle und, insbesondere bei oraler Gabe, aus dem nicht resorbierten Anteil. Die Ausscheidungsquoten für Urin sind unabhängig vom pH-Wert des Urins. Nach intravenöser Injektion werden nur 6 % der applizierten Wirkstoffe über Faeces und 20-70 % über Urin, dagegen nach oraler Gabe nur 10-25 % über Urin und zwischen 50 % und 70 % über Faeces ausgeschieden [48, 337]. Maximale Urinspiegel werden bei einer Einzeldosierung nach 8-9 h erreicht.

### 3.4 Resistenzmechanismen, Gefährdung des Verbrauchers und Rechtliche Bewertung

#### 3.4.1 Resistenzmechanismen

##### 3.4.1.1 Definition und Möglichkeiten der Resistenzentstehung

Mikroorganismen entwickeln Antibiotikaresistenzen als Teil ihres genetischen Anpassungsmechanismus an wechselnde Umweltbedingungen unter Dauereinwirkung subletaler Antibiotikakonzentrationen. Ein pathogener Mikroorganismus wird dann als resistent bezeichnet, wenn die *in vitro* ermittelte minimale Hemmkonzentration (MHK) höher ist als die *in vivo* am Infektionsort erreichbare Serum- bzw. Gewebekonzentration [48]. Ein ursprünglich empfindlicher Keim wird also durch den Wirkstoff in Höhe der MHK nicht mehr inhibiert. Während einer Antibiotikabehandlung erreicht die Wirksubstanz die Mikroorganismen in Form eines Konzentrationsgradienten. Nur im sogenannten selektiven Bereich werden sensitive Bakterien abgetötet bzw. gehemmt [75]. In subinhibitorischen Konzentrationsbereichen finden Mikroorganismen ideale Bedingungen vor, um verschiedene Resistenzstrategien zu entwickeln. Eine Resistenz entwickelt sich dann, wenn Genkomplexe vorhanden sind, die eine Resistenzsteigerung bewirken oder wenn Organismen Fremdgene aufnehmen und exprimieren. Ist ein diesbezüglicher Selektionsdruck vorhanden, so erhalten diese resistenten Krankheitserreger Wachstumsvorteile und können sich dementsprechend ausprägen. Durch die Anwendung von Chemotherapeutica bei Mensch oder Tier wird dieser Selektionsdruck ausgeübt, so daß jede Anwendung antibakteriell wirksamer Substanzen Resistenzentwicklungen fördert [2]. Ein allgemeines Dogma besagt, daß Resistenzen solange erhalten bleiben, wie entsprechende Antibiotika einwirken und verloren gehen, wenn kein Selektionsdruck mehr vorliegt. In vielen Fällen zeigt sich jedoch die Ungültigkeit dieses Dogmas. So ist heute eine bekannte Tatsache, daß viele Resistenzen auch nach Absetzen des Antibiotikums nicht bzw. kaum verschwinden [13].

Der Begriff der Resistenz beschreibt eine graduell variierende Unempfindlichkeit eines Keimes gegenüber Antibiotika, wobei das Resistenzniveau abhängig ist vom Bakterium selbst, vom Resistenzmechanismus und von der Art des Antibiotikums. Grundsätzlich lassen sich intrinsische und erworbene Resistenzen unterscheiden. Eine *intrinsische, also natürliche Resistenz* basiert auf den spezifischen Eigenschaften eines Antibiotikums selbst. So sind z. B. Penicilline gegen gramnegative Bakterien kaum wirksam, da sie die äußere Zellmembran nicht passieren können [2]. Durch solche Eigenschaften entstehen Lücken im Wirkungsspektrum eines Antibiotikums. Im Gegensatz dazu beruhen *erwor-*

*bene* Resistenzen auf Mutationen des chromosomalen oder extrachromosomalen Erbgutes oder dem Erwerb resistenzvermittelnder mobiler genetischer Elemente [13]. Zu den erworbenen Resistenzen gehören die *Primär- und Sekundäresistenz* sowie die *infektiöse übertragbare Resistenz*. Primärresistent sind Einzelorganismen aus einer Antibiotika-empfindlichen Kultur, die ohne vorherigen Kontakt mit einem Antibiotikum eine verringerte oder fehlende Empfindlichkeit zeigen. Die sekundäre und infektiös übertragbare Resistenz tritt durch Selektion und Mutation unter Antibiotikaeinwirkung auf [48, 50]. Die übertragbare Resistenz basiert auf der Übertragung genetischen Materials von einer Bakterienzelle auf eine andere. Diese Resistenz geht von sogenannten Resistenz (R)-Faktoren aus, die auch als Resistenzplasmide bezeichnet werden. Die größeren dieser Plasmide enthalten neben den *r*-Genen (Resistenzgenen) einen Resistenzübertragungsfaktor (RTF, Resistance Transfer Factor). Die RTF-Region des Plasmids ermöglicht die interzelluläre Übertragung. Auf einem R-Faktor können mehrere Gene für eine Resistenz gegen verschiedene Antibiotika lokalisiert sein, so daß dann eine multiple Resistenz vorliegt [76]. Der Transfer eines solchen Plasmids führt dann zur Weitergabe der multiplen Resistenz. Durch enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums können auch Resistenzeigenschaften vermittelt werden. Hierfür verantwortlich sind ebenfalls die R-Faktoren, da die in diesen Plasmiden enthaltenen *r*-Gene Enzyme codieren, die bestimmte Medikamente durch chemische Modifikation inaktivieren, z.B. durch Phosphorylierung, Acetylierung oder hydrolytische Spaltung [77]. Eine weitere Möglichkeit der Resistenzentstehung besteht in einer verminderten intrazellulären Konzentration des Antibiotikums, hervorgerufen durch eine verminderte Wirkstoffaufnahme oder einen verstärkten Efflux durch die Zytoplasmamembran. Resistenz kann also auf unterschiedliche Art und Weise vermittelt werden, wobei in der Zelle oft eine Kombination verschiedener Resistenzmechanismen vorliegt: Die durch R-Faktoren übertragenen Resistenzeigenschaften können nach mehreren Generationen in einer Population durch Austausch von Plasmiden wieder verloren gehen.

Die aus einer Resistenzentwicklung gegenüber einem ersten Antibiotikum resultierende gleichzeitige Resistenz gegen ein zweites oder mehrere andere Antibiotika wird als Kreuz- oder Parallelresistenz bezeichnet. Eine Kreuzresistenz zwischen Antibiotika gibt einen Hinweis auf ähnliche chemische Struktur oder einen ähnlichen Wirkungsmechanismus [48, 50]. Kreuzresistenz zeigen dementsprechend verwandte Substanzen einer Antibiotikaklasse. Zwischen den klassischen Tetracyclinen Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin besteht vollständige Kreuzresistenz [47, 48, 50, 78].

#### 3.4.1.2 Resistenzeigenschaften gegenüber Tetracyclinen

Resistenzeigenschaften gegenüber Tetracyclinen können sowohl chromosomal als auch extrachromosomal, auf R-Plasmiden in Form von DNA-Nukleotidsequenzen, bedingt sein. Bezüglich der bakteriellen Resistenz gegenüber Tetracyclinen sind bisher drei Mechanismen bekannt.

Das wichtigste Resistenzkriterium ist die *Reduktion der intrazellulären Tetracyclinkonzentration*, die entweder durch eine verminderte Permeabilität der Zytoplasmamembran oder durch einen verstärkten Efflux aus der Zelle verursacht werden kann [79]. Im ersteren selteneren Fall gelangen die Tetracycline erst gar nicht ins Zellinnere. Auslöser für den wichtigeren zweiten Mechanismus sind membrangebundene Resistenzgene, die einen aktiven energieabhängigen Transport aus der Zelle bewirken und damit den Wirkmechanismus umkehren. Die Wirkung von Tetracyclinen beruht darauf, daß eine Akkumulation von Tetracyclinen im Zellinneren stattfindet, so daß schließlich die Proteinbiosynthese völlig zum Erliegen kommt, siehe **Kap. 3.1.3.3**. Entwickelt die Zelle Mechanismen, mit der das Tetra-

cyclin wieder aus der Zelle heraustransportiert werden kann, so wird die Wirkung der Tetracycline aufgehoben.

Der *Schutz der Ribosomen vor einem Angriff der Tetracycline* wurde erstmals von BURDETT et al. beschrieben [80]. Er entdeckte, daß resistente Streptokokken ein Protein produzieren, welches die bakteriellen Ribosomen vor der Tetracyclineinwirkung bewahrt. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, daß eine Funktion als Tetracyclin-resistenter Verlängerungsfaktor oder die kompetitive Hemmung der Bindung von Tetracyclin an das Ribosom eine Rolle spielt. Eine *Inaktivierung der Tetracycline durch modifizierende Enzyme* ist relativ selten, erscheint aber möglich. GUINEY et al. übertrugen ein Resistenzgen von *Bacteroides fragilis* auf *Escherichia coli*, mit der Folge, daß diese Stämme Tetracycline inaktivieren können [81]. SPEER et al. zeigten, daß dieses Protein Tetracyclin in Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH chemisch verändert [82].

Untersuchungen von **Tetracyclinen und deren Umwandlungs- und Abbauprodukten** auf eine Resistenzentwicklung geben Hinweise darauf, daß die Intensität der antibiotischen Aktivität nicht zwangsläufig mit dem Ausmaß der Resistenzausbildung konform geht. So ist die Bindungsfähigkeit von *epi*-Tetracyclin an den entsprechenden Tet Repressor um den Faktor 300 höher als von Tetracyclin selbst. Das Anhydrotetracyclin zeigt zwar eine geringere antibiotische Aktivität, aber eine 30-fach höhere Bindungsfähigkeit an den Tet Repressor [83, 84].

### 3.4.2 Gefährdung des Verbrauchers durch den Einsatz von Antibiotika

Um das Risiko einer Resistenzentstehung beim Menschen durch den Einsatz von Antibiotika in der landwirtschaftlichen Tierhaltung abschätzen zu können, ist es notwendig, mögliche Beeinflussungen und Interaktionen zwischen Mensch, Tier und Umwelt zu berücksichtigen. Obwohl schwer zu beurteilen ist, inwieweit die in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika zur allgemeinen Resistenzentwicklung beitragen, gibt es Untersuchungen, die einen ursächlichen Zusammenhang zwischen resistenten vom Tier stammenden Erregern und Infektionskrankheiten beim Menschen belegen [85, 86].

Eine Resistenzentwicklung beim Menschen durch in der Tiermast eingesetzte Chemotherapeutica ist auf zwei Wegen möglich. Zum einen kann eine *direkte Übertragung resistenter Mikroorganismen* stattfinden, zum anderen ist durch *Aufnahme von Antibiotikarückständen* die Auslösung einer Resistenzbildung möglich. Im letzteren Fall ist das Tier lediglich das Übertragungsmedium von Antibiotikarückständen, Ort der Resistenzentstehung ist der Mensch selbst [13]. Die möglichen Gefährdungspotentiale des Menschen durch die in der Tiermast eingesetzten Antibiotika sind in **Abb. 6** dargestellt.

Bei der *Aufnahme von Antibiotikarückständen* ist die Übertragung durch tierische Lebensmittel in Betracht zu ziehen [87, 88]. GROßKLAUS et al. berichten über die Entstehung plasmidbedingter Resistenz bei sensibilisierten Personen nach dem Genuß penicillinhaltiger Milch [89]. WOLTERSDORF et al. weisen auf mögliche Antibiotikarückstände in Fleisch hin, die nach ungenügender Erhitzung erhalten bleiben [87]. Darüber hinaus können nach veterinärmedizinischer Applikation die verabreichten Antibiotika in aktiver Form über Urin und Faeces wieder ausgeschieden werden. Die ausgeschiedenen Wirkstoffe und Metabolite können über den Austrag von Gülle auf landwirtschaftlich genutzte Felder gelangen und dadurch aquatische und terrestrische Umweltkompartimente belasten. Es wird zunehmend diskutiert, ob Arzneimittelrückstände in Güllebeaufschlagten Böden für Nutzpflanzen bioverfügbar sind und auf diesem Wege in die Nahrungskette eingetragen werden können [90-93]. Das Vorkommen, die Ausbreitung und der Abbau der in die Umwelt eingebrachten Antibiotika ist abhängig

von deren chemophysikalischen Eigenschaften [13]. Während bei einigen bisher untersuchten antibiotisch wirksamen Substanzen biologische Abbaubarkeit bzw. Photodegradation beobachtet wurde, scheinen andere biologisch schwer abbaubar zu sein [25, 94]. Zu den schwer abbaubaren Antibiotika gehören Cefotiam, Ciproflaxin, Sulfamethoxazole und Tetracycline. Über eine mögliche Resistenzentstehung hinaus sind durch die dauerhafte Aufnahme von Tetracyclinspuren auch mögliche Risiken wie Allergien, Lichtdermatosen bzw. Photosensibilisierung, Schwindel, Gleichgewichtsstörungen sowie die Unwirksamkeit oraler Kontrazeptiva zu nennen.

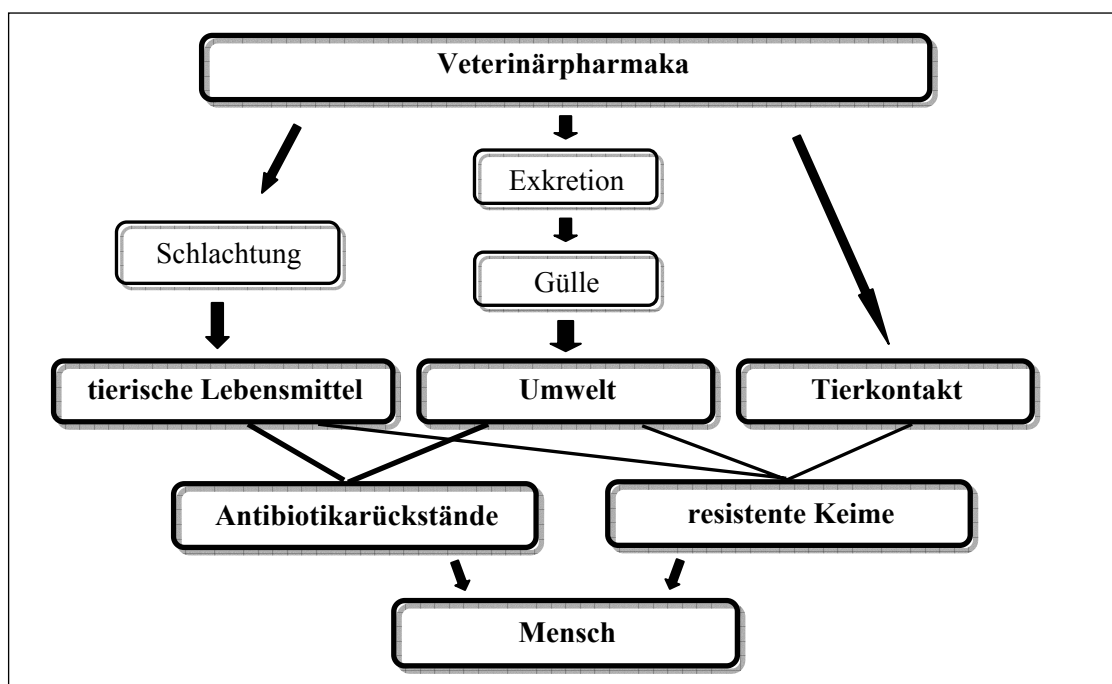


Abb. 6: Gefährdungspotentiale des Menschen durch den veterinärmedizinischen Einsatz von Antibiotika

Eine Übertragung resistenter Mikroorganismen ist wie die Übertragung von Antibiotikarückständen auch über kontaminierte tierische Lebensmittel sowie nach Gülleausbringung und Umwelteintrag durch Trinkwasser und Pflanzen möglich [13, 95]. Darüberhinaus können resistente Mikroorganismen auch über direkten Tierkontakt übertragen werden. Das Vorkommen resistenter Mikroorganismen auch in aquatischen Systemen konnte bereits mehrfach belegt werden [96-98]. Allerdings ist nichts über deren Bedeutung hinsichtlich einer Resistenzentwicklung bei Mensch oder Tier bekannt. Entgegen der allgemeinen Meinung, daß Resistenzen einzig bei Mensch und Tier gebildet werden können, beschreiben FARNLEITNER et al. darüberhinaus die Möglichkeit einer *in situ* Resistenzentwicklung in aquatischen Systemen [13]. Die im Wasser enthaltenen Antibiotika besitzen in bestimmten Anlagenbereichen, in denen aufgrund des vorhandenen Konzentrationsgradienten subinhibitorische Konzentrationen vorliegen, das Potential, mikrobielle Resistenzbildung im aquatischen Milieu zu fördern. Damit können auch aquatische Systeme in bestimmten Bereichen zu einer verstärkten Resistenzgenerierung beitragen.

Ein weiterer Beitrag zur Resistenzbildung wird von KAMPHUES et al. beschrieben [99]. Da im Bereich der landwirtschaftlichen Tierhaltung viele Tierarzneimittel über das Futter verabreicht werden, besteht die Gefahr einer Arzneimittelverschleppung in den Tierbeständen. Die Herstellung von Misch-

futter ist aus technischen Gründen (Nutzung desselben Mischers für antibiotikahaltiges und antibiotikafreies Mischfutter) ebenfalls eine potentielle Quelle für Wirkstoffverschleppung, wodurch es zu Arzneimittelrückständen bei unbehandelten Schweinen kommen kann [100, 101]. Diese subtherapeutischen Arzneimittelgehalte leisten in erhöhtem Maße einer Resistenzentwicklung Vorschub.

Aufgrund der dargestellten komplexen Resistenzproblematik und der vielfältigen Risikofaktoren für den Verbraucher, kann basierend auf dem derzeitigen Wissensstand keine eindeutige Antwort auf die Frage der Bedeutung des veterinärmedizinischen und landwirtschaftlichen Einsatzes von Antibiotika und der daraus resultierenden Resistenzentwicklung beim Menschen gegeben werden.

### **3.4.3 Rechtliche Bewertung von pharmakologisch wirksamen Stoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs**

Aufgabe des Gesetzgebers und der für die Lebensmittelüberwachung zuständigen Behörden ist, zu gewährleisten, daß Lebensmittel keine gesundheitsbeeinträchtigenden Rückstandskonzentrationen enthalten [102]. Nach § 4 des Fleischhygienegesetzes (FHG) sind Rückstände Stoffe mit pharmakologischer Wirkung und deren Umwandlungsprodukte sowie von anderen Stoffen, die in Lebensmittel übergehen und gesundheitlich bedenklich sein können [103]. Früher sind zur Vermeidung von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln lediglich die Festsetzung und Einhaltung von Wartezeiten herangezogen worden. Nach § 4 Abs. 12 des Arzneimittelgesetzes (AMG) ist die Wartezeit 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 [104]. Die hieraus resultierende Forderung nach Rückstandsfreiheit tierischer Lebensmittel ließ sich dabei mit dem schnellen Fortschritt der instrumentellen Analytik, die den Nachweis immer geringerer Rückstandskonzentrationen ermöglicht, nicht mehr aufrechterhalten. So wurde diese Regelung im Jahre 1990 durch die Einführung der Höchstmengenregelung innerhalb der EU abgelöst. Anstelle der Forderung nach Rückstandsfreiheit ist vielmehr eine Rückstandsbewertung getreten. Wartezeiten werden nach der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) durch den Zeitpunkt bestimmt, nach dem die Rückstandskonzentration unterhalb eines zulässigen Höchstwertes liegt [105, 106].

Für einen wirksamen Verbraucherschutz müssen daher folgende Bedingungen erfüllt sein [102]:

- Beurteilung der Rückstände der in Tierarzneimitteln verwendeten pharmakologischen Wirkstoffen
- Bestimmung einer zulässigen für den Verbraucher ungefährlichen Aufnahmemenge sowie von Höchstmengen für zum Verzehr bestimmte Nahrungsmittel
- Festlegung von Wartezeiten, um sicherzustellen, daß die von behandelten Tieren gewonnenen Nahrungsmittel keine über den festgelegten Höchstwerten liegenden Rückstände enthalten
- Durchführung von Routinekontrollen, um zu gewährleisten, daß die Rückstandshöchstwerte nicht überschritten werden und verbotene oder nicht zugelassene Stoffe keine Anwendung finden

Bereits bei der Zulassung eines Tierarzneimittels müssen innerhalb der EG folgende Voraussetzungen erfüllt sein: Der Antragsteller hat den Nachweis der Qualität, der Unbedenklichkeit und der Wirksamkeit des Arzneimittels zu erbringen [102]. Insbesondere der Nachweis der Unbedenklichkeit umfaßt den Menschen als Verbraucher von Lebensmitteln tierischen Ursprungs, die Tierart, den Tierhalter, den Tierarzt und seit 1992 vor allem auch Umweltaspekte. Darüberhinaus müssen für alle Nahrungsmittel tierischen Ursprungs nach der Verordnung Nr. 2377/90 EWG vom 26.06.1990 Höchstmengen

für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe, die in Tierarzneimitteln Anwendung finden, festgesetzt werden [107]. Die Festlegung von Rückstandshöchstmengen ist EU-einheitlich geregelt und wird von der EMEA vorgenommen. Die internationale Fachkommission für Tierarzneimittel CVMP (Committee for Veterinary Medicinal Products) der EMEA beurteilt die meist von der pharmazeutischen Industrie eingehenden Gutachten [116]. Diese Unbedenklichkeitsprüfung eines Tierarzneimittels erfolgt in mehreren Stufen. Zunächst werden die durchgeführten pharmakologischen und toxikologischen Studien, die insbesondere Untersuchungen zur Mutagenität, Toxizität, Cancerogenität und Teratogenität umfassen, bewertet. In der nächsten Stufe wird die Wirkstoffdosis ermittelt, die keine substanzspezifische Wirkung mehr hervorruft, also den „no-observed-effect-level“ (NOEL). Der NOEL wird dann zur Berechnung des ADI-Wertes, der zulässigen täglichen Aufnahmemenge (acceptable daily intake), herangezogen. Der ADI-Wert ist eine Rückstandsmenge, angegeben in g oder mg pro kg Körpergewicht, die zeitlebens ohne erkennbares Risiko aufgenommen werden kann [108]. Aus dem ADI-Wert wird unter Berücksichtigung der relativen Verteilung der Gesamtrückstände auf die eßbaren Gewebe und die täglich verzehrte Menge dieser Gewebe die Rückstandshöchstwerte, MRLs (MRL = maximum residue limit), in  $\mu\text{g/kg}$  für das jeweilige Zielgewebe abgeleitet. Da die verabreichten Substanzen im Stoffwechsel der Tiere verändert werden können, bezieht sich der festgesetzte MRL-Wert immer auf einen geeigneten „Marker“. Dieser kann entweder die Ursprungssubstanz, ein Metabolit oder auch die Summe aus beiden beinhalten.

Nach den Ergebnissen der MRL-Verfahren werden die pharmakologischen Wirkstoffe in die Anhänge I bis IV der Verordnung Nr. 2377/90 EWG eingeordnet [109]. Bei Lebensmittel liefernden Tieren dürfen seit dem 1.1.2000 in der gesamten EU nur noch Arzneimittel angewendet werden, die ausschließlich Wirkstoffe enthalten, die in den Anhängen I bis III dieser Verordnung aufgeführt sind [110]. Für Stoffe in Anhang I ist die Bewertung und Festlegung endgültiger MRL-Werte abgeschlossen. Für Stoffe im Anhang II gelten aufgrund ihrer für den Verbraucher in allen Konzentrationen eingestuften Unbedenklichkeit keine MRL-Werte. Im Anhang III sind Stoffe mit vorläufigen MRL-Werten mit einer Gültigkeit von maximal fünf Jahren aufgeführt. Gemäß § 15 Abs. 1 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) ist es verboten, vom Tier gewonnene Lebensmittel in den Verkehr zu bringen, wenn Stoffe mit pharmakologischer Wirkung nachweisbar sind, die die festgesetzten Höchstmengen überschreiten [111]. Für Stoffe in Anhang IV können keine für den Verbraucher unbedenklichen Höchstmengen festgelegt werden. Ihre Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren ist daher verboten [112, 113]. Um eine einheitliche Beurteilung nachweisbarer Rückstände in Lebensmitteln zu gewährleisten, wird eine EU-weite Festlegung der minimal zu bestimmenden Wirkstoffmenge angestrebt, wobei unterhalb dieses Grenzwertes ein Lebensmittel tierischer Herkunft als rückstandsfrei gilt. Von den Europäischen Gemeinschaften sind für einige Substanzen bereits Richtlinien verfaßt worden, in denen minimal zu erreichende Wirkstoffkonzentrationen, auch MRPL-Werte (minimum required performance limits) angegeben werden, welche als Ergänzung der Richtlinie 2002/657/EC zu verstehen sind [114].

**Tetracycline** waren bis zum Jahre 1976 nach dem *Futtermittelrecht* als Leistungsförderer in Form von Futtermittelzusatzstoffen für Saugferkel zugelassen. Aufgrund mehrfacher Diskussionen über die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung bei humanpathogenen Mikroorganismen wurde die subtherapeutischer Anwendung von Tetracyclinen über das Futter EU-weit gestoppt. Seitdem werden Tetracycline nur noch nach tierärztlicher Verschreibung auf Grundlage des Arzneimittelrechtes angewendet [106, 107, 115]. Nach dem *Lebensmittelrecht* galt in der Bundesrepublik Deutschland bis zum Jahre 1992 ein „Beurteilungswert“ von  $10 \mu\text{g/kg}$  Muskulatur, der lediglich zur Entscheidung diente, ob die

nach dem Arzneimittelrecht festgelegten Wartezeiten eingehalten wurden. Diese Regelung wurde durch die Einführung der strengeren EU-weiten Höchstmengenregelung abgelöst. Basierend auf einem NOEL von 2 mg/Person/Tag wurde daraus unter Zugrundelegung der gleichen antimikrobiellen Wirkintensität ein für alle Tetracycline gültiger ADI-Wert von 0-3 µg/kg/Tag ermittelt [116]. In der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 sind daraus für die Tetracycline CTC, TC, OTC und DC folgende MRL-Werte festgelegt worden, die für alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Tiere gelten (**Tab. 2**) [109].

*Tab. 2: MRL-Werte für die Tetracycline CTC, TC, OTC und DC in unterschiedlichen Matrices nach VO (EWG) Nr. 2377/90*

Zielgewebe	Muskulatur	Leber	Niere	Milch	Eier
MRL [µg/kg]	100	300	600	100	200

Diese Werte beziehen sich auf die Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimeren und gelten für CTC, TC, OTC und DC allein oder in Kombination. Die WHO schlug aufgrund weitergehender Studien 1999 vor, diese Werte zu verdoppeln [117]. In den USA gelten bereits deutlich höhere von der FDA festgelegte MRL-Werte für eßbares Gewebe vom Rind, von nicht laktierenden Milchkühen, Kälbern, Schweinen, Schafen und Geflügel, die für Muskulatur bei 2000 µg/kg, für Leber bei 6000 µg/kg und für Niere und Fett bei 12000 µg/kg liegen [118, 170].

### 3.5 Eigenschaften der Tetracycline

#### 3.5.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

Tetracycline sind gelbe, kristalline, geruchlose Substanzen. Die UV-Spektren der Tetracycline sind charakteristisch und vom pH-Wert anhängig. Der BCD-Chromophor, siehe **Abb. 5**, absorbiert bei 225, 285, 320 und 360 nm, der A-Chromophor bei 260 nm. Eine Bande bei 275 nm setzt sich aus mehreren Absorptionen zusammen. OTC und TC haben zusätzlich eine Bande bei 360 nm, CTC bei 370 nm [37, 57], zu dem nur das BCD-Ringsystem beiträgt, wobei dieses Absorptionsmaximum allerdings eine deutlich geringere Intensität zeigt als das bei 275 nm.

Die freien Basen der Tetracycline sind in wäßriger Lösung im physiologischen pH-Bereich nur sehr wenig löslich (ca. 1 mg/mL) [49, 37, 57]. Aufgrund der sauren Gruppen und des basischen Dimethylamino-Restes besitzen sie amphotere Eigenschaften und bilden mit Säuren und Basen in Wasser lösliche, stabile Salze. Insbesondere die Tetracyclin-Hydrochloride zeigen als Festsubstanz eine hohe Stabilität. Der pH-Wert der rein wäßrigen Lösungen liegt zwischen 2-3 [50, 37, 57]. Die freien Basen sowie die Hydrochloride sind in Alkoholen gut, in anderen organischen Lösungsmitteln weniger gut löslich.

Tetracycline sind in wäßrigen Lösungen instabil und verlieren rasch einen Teil oder die gesamte antibiotische Wirksamkeit. Die Stabilität in wäßrigen Lösungsmitteln hängt in hohem Maße vom pH-Wert und der Temperatur ab und ist für die einzelnen Tetracycline sehr unterschiedlich. Im sauren bis neutralen Milieu sind TC und OTC deutlich stabiler als CTC. Während OTC im alkalischen Medium die höchste Stabilität zeigt, ist CTC besonders alkaliempfindlich. DMTC ist wie auch die anderen 6-



Desmethyltetracycline im Vergleich zu den anderen Tetracyclinen auch bei extremen pH- und Temperaturverhältnissen am stabilsten [119-122].

Tetracycline reagieren als Säuren mit einem  $pK_{a1}$ -Wert von 3,3 aufgrund der OH-Gruppe am C-3-Atom [49, 123]. Eine zweite Deprotonierung erfolgt an der OH-Gruppe des C-12-Atoms der vinylogenen Carbonsäurestruktur ( $pK_{a2}$ -Wert = 7,6). Basische Eigenschaften beruhen auf dem Dimethylamino-Restes, so daß der dritte  $pK_{a3}$ -Wert von 9,7 einem protonierten N-4-Atom zuzuordnen ist [124, 125]. DUARTE et al. ordnen einen weiteren  $pK_{a4}$ -Wert von 12 der phenolischen OH-Gruppe am C-10-Atom zu [126].

In Abhängigkeit von den Substituenten, der Metallkomplexierung und dem Lösungsmittel, insbesondere dem pH-Wert des Lösungsmittels, können Tetracycline in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. In saurem und neutralen Medium nehmen Tetracycline eine „twisted“ Konformation an, bei der die protonierte Dimethylaminogruppe aus sterischen Gründen oberhalb des BCD-Ringsystems liegt. In basischem Milieu oder nichtwäßrigen Lösungsmitteln verschiebt sich das Gleichgewicht zu einer „extended“ Konformation, wobei die Dimethylaminogruppe unterhalb des planaren BCD-Ringsystems liegt [127]. Möglicherweise beeinflusst die Konformation auch die pharmakokinetischen Eigenschaften der Tetracycline [124, 128].

### 3.5.2 Komplexbildung

Tetracycline zeigen eine große Tendenz zur reversiblen Bildung antibiotisch inaktiver Komplexe mit Kationen und Anionen sowie nieder- und hochmolekularen Stoffen (siehe **Tab. 3**) [37]. Während die hydrophoben Tetracycline Doxycyclin und Minocyclin kaum komplexieren, neigen die hydrophileren Tetracycline OTC, TC und Rolitetracyclin stark, CTC und DMTC sehr stark zur Komplexbildung [129].

Tab. 3: Komplexbildner für Tetracycline

<b>Metall-Kationen</b>	$Fe^{2+/3+}$ , $Cu^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Be^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Zr^{3+}$ , $Zr^{4+}$
<b>Anionen</b>	Phosphat, Citrat, Salicylat, $\beta$ -Hydroxybenzoat
<b>Neutralstoffe</b>	Coffein, Harnstoff, Thioharnstoff, Polyvinylpyrrolidon
<b>Makromolekulare Substanzen</b>	Serumalbumine, Lipoproteine, Globuline, RNA

In Abhängigkeit von der Art und Ladung des Kations und dem pH-Wert der Lösung bilden Tetracycline mit *Metall-Kationen* Komplexe im stöchiometrischen Metall:Ligand-Verhältnis von 1:1, 2:1 und 1:2 [130-134]. Unterhalb pH 3 komplexieren Tetracycline nicht. Im pH-Bereich zwischen 3 und 7,5 bindet das Phenol-Diketon-System der Ringe BCD ein Kation. Oberhalb von pH 7,5 wird die Dimethylaminogruppe deprotoniert und es kann so ein weiteres Kation von dieser Gruppe und der dazu *cis*-ständigen 12a-Hydroxygruppe gebunden werden. Anhydrotetracycline, 4-*epi*-Tetracycline, deren 4- und 12a-Substituenten *trans*-ständig sind, sowie die iso-Tetracycline (zur Bildung von Abbau- und Umwandlungsprodukten von Tetracyclinen siehe **Kap. 3.5.3.1-3.5.3.2**) bilden nur 1:1-Komplexe [37, 124, 135]. Oxytetracyclin bildet oberhalb pH 7 aufgrund ihres zusätzlichen Liganden mit Metallkationen zwischen der 5- und 12a-Hydroxygruppe ein Chelat.

Tetracyclinkomplexe mit Metallkationen zeigen charakteristische UV-Spektren und besitzen Maxima

bei 275 nm und in Abhängigkeit von der Metallkationenkonzentration zwischen 370-390 nm. Eine Besonderheit fanden WESSELS et al., die die UV-Spektren von TC-Komplexen mit unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen untersuchten. Sie fanden zwei isosbestische Punkte, einen bei 366 nm für ein molares Verhältnis TC:  $\text{Ca}^{2+} \geq 15,8$  und einen zweiten bei 382 nm für TC:  $\text{Ca}^{2+} < 15,8$ , d.h. trotz Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration blieb der Extinktionskoeffizient bei diesen Wellenlängen gleich [124]. Darüberhinaus zeigen Tetracycline eine Fluoreszenz, die durch Komplexbildung mit Kationen verstärkt wird, was zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Tetracyclinen ausgenutzt werden kann.

Mit *Anionen* wie Phosphat und Citrat sowie *Naturstoffen* wie Coffein und Harnstoff bilden Tetracycline schwache Komplexe, die die Löslichkeit der Tetracycline erhöhen. Die reversible Bindung der Tetracycline an *makromolekulare Substanzen* im Blut und Gewebe ist von großer Bedeutung für die Pharmakokinetik und die Wirksamkeit im Körper. Solche Gleichgewichte sind mit Ausnahme der Plasmaproteinbindung, die durch Methoden wie Dialyse, Ultrafiltration und Elektrophorese bestimmt werden können, schwer quantitativ zu erfassen. Tetracycline binden sowohl an Albumin, dem Hauptprotein des Serums, als auch an Globuline und Lipoproteine. Die Proteinbindung ist pH-Wert- und Temperaturabhängig. Der Einfluß der Serumbindung auf die chemotherapeutische Wirksamkeit ist bis heute nicht bekannt [37]. Ein positiver Effekt einer hohen, reversiblen Eiweißbindung an Serumproteine könnte in ihrer Transportfunktion für den Wirkstoff in das Gewebe gesehen werden. Dennoch gilt nach bisherigem Kenntnisstand, daß nur das ungebundene Antibiotikum in der unmittelbaren Umgebung des Bakteriums im infizierten Bereich eine antibiotische Wirkung ausübt [50].

### 3.5.3 Umwandlungs- und Abbaureaktionen

Tetracycline gehen in Lösung in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, von der Temperatur und insbesondere vom pH-Wert eine Reihe von Abbau- und Umwandlungsreaktionen ein, wobei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern dieser Substanzklasse zu beobachten sind [50, 57]. Unter den Umwandlungsreaktionen werden Isomerisierungen verstanden, die zu einer Veränderung der Konfiguration bei gleicher Summenformel führen. In der Literatur beschränkt sich üblicherweise der Begriff Isomerisierung auf die alkalische Umwandlung der Tetracycline zu den iso-Tetracyclinen und wird so von der Epimerisierung und Keto-Enol-Tautomerie unterschieden. Zum leichteren Verständnis werden diese in der Literatur konventionell verwendeten Begriffsbestimmungen übernommen. Neben diesen Umlagerungsreaktionen können Tetracycline einer Dehydratation, also einer Abbaureaktion, unterliegen.

#### 3.5.3.1 Epimerisierung

In schwach saurer Lösung zwischen pH 2 und 6 unterliegen Tetracycline einer Isomerisierung am asymmetrischen C-4-Atom (siehe **Abb. 7**). Derartige Isomerisierungen, bei denen eine Konfigurationsänderung an einem von mehreren asymmetrischen C-Atomen stattfindet, werden als Epimerisierung bezeichnet [49, 57, 136]. Diese Epimerisierung verläuft nach einer Reaktion erster Ordnung, ist reversibel und wird durch Phosphat, Citrat, mehrwertige Kationen und Neutralstoffe wie Harnstoff katalysiert [37, 137]. Sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Gleichgewichtslage hängt in hohem Maße vom pH-Wert ab. Während unterhalb von pH 1,5 keine Epimerisierung stattfindet, stellt sich je nach den gewählten Bedingungen das Gleichgewicht bei einer Epimerisierungsrate zwischen 40 % und 68 % ein, wobei die Geschwindigkeit mit steigendem pH-Wert zunimmt [138-140].

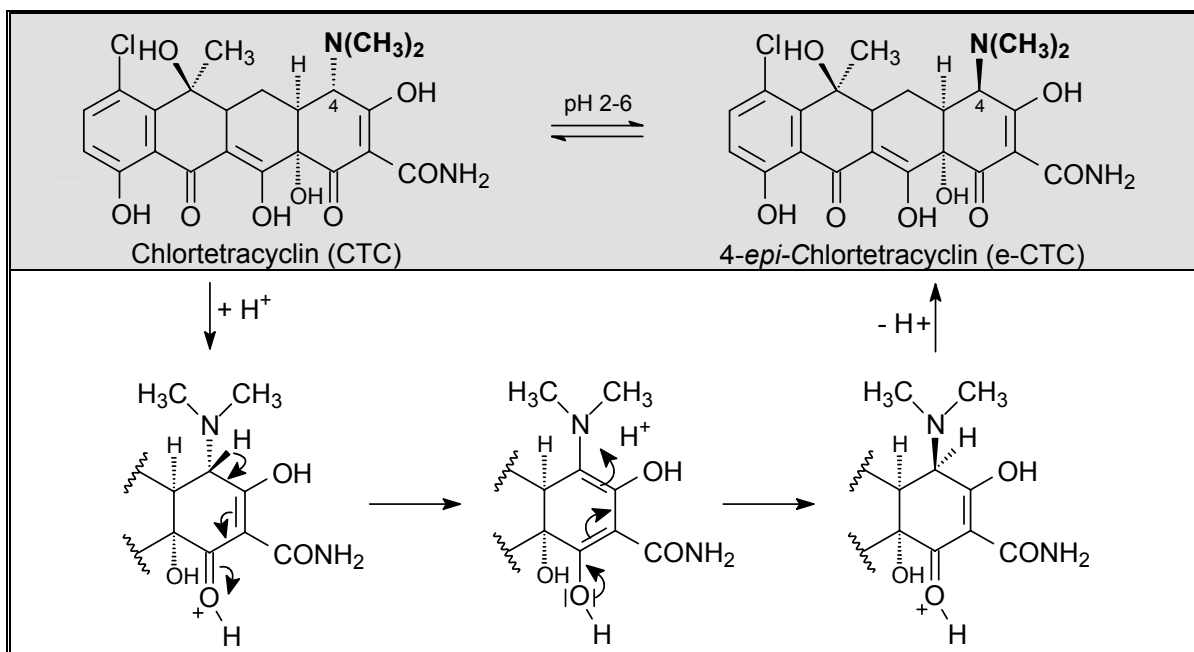


Abb. 7: Epimerisierung von Chlortetracyclin in schwach saurer Lösung [136, 141]

Die epimeren Verbindungen weisen im Vergleich zu den jeweiligen Muttersubstanzen eine bessere Löslichkeit in den meisten Lösungsmitteln auf und sind beständiger gegenüber saurer oder alkalischer Einwirkung [57]. Darüberhinaus wirkt sich die Konfigurationsänderung an der C-4-Position erheblich auf die antibiotische Aktivität aus. Verschiedene Autoren beschreiben entweder gar keine oder eine um 90-99 % verminderte antibiotische Wirksamkeit der Epimere in Bezug auf die Muttersubstanz, wobei unklar ist, ob die Epimere überhaupt antibiotisch wirksam sind oder die antibiotische Aktivität auf eine Rückepimerisierung zurückzuführen ist [49, 57, 138].

Die Epimere zeigen in dem Wellenlängenbereich, in dem die chromophore Gruppe A ihren Beitrag leistet, einen signifikanten Unterschied zum Ausgangsprodukt. Während eine Unterscheidung vom Epimer zum Ausgangsprodukt bei einer Wellenlänge von 275 nm möglich ist, kann eine Quantifizierung des Epimers auch über die Ausgangssubstanz im Wellenlängenbereich von 350-370 nm erfolgen, da dieser Teil der Absorption trotz Epimerisierung unverändert bleibt [57, 137, 142].

### 3.5.3.2 Isomerisierung

Die alkalische Behandlung von Tetracyclinen mit einer Hydroxygruppe am C-6-Atom führt durch Aufbrechen des Ringes C zu decyclisierten Produkten mit einer Lactonen entsprechenden Phthalidstruktur, den iso-Tetracyclinen, über [37, 57, 122] (siehe **Abb. 8**). Während TC und OTC erst oberhalb von pH 9-10 isomerisieren, zeigt sich CTC besonders labil und geht bereits ab pH 7 ins Isochlortetracyclin über. Auch die Isotetracycline können analog den Tetracyclinen im schwach sauren Bereich zwischen pH 2 und pH 6 zu den 4-*epi*-Isotetracyclinen epimerisieren. Bei der Isomerisierung der Tetracycline spielen mehrere konkurrierende Reaktionen wie Epimerisierung und Isomerisierung eine Rolle. Bei der Isomerisierung im alkalischen Milieu handelt es sich um eine irreversible Reaktion, die zu Produkten mit gar keiner oder sehr geringen antibiotischen Aktivität führt [143-146].

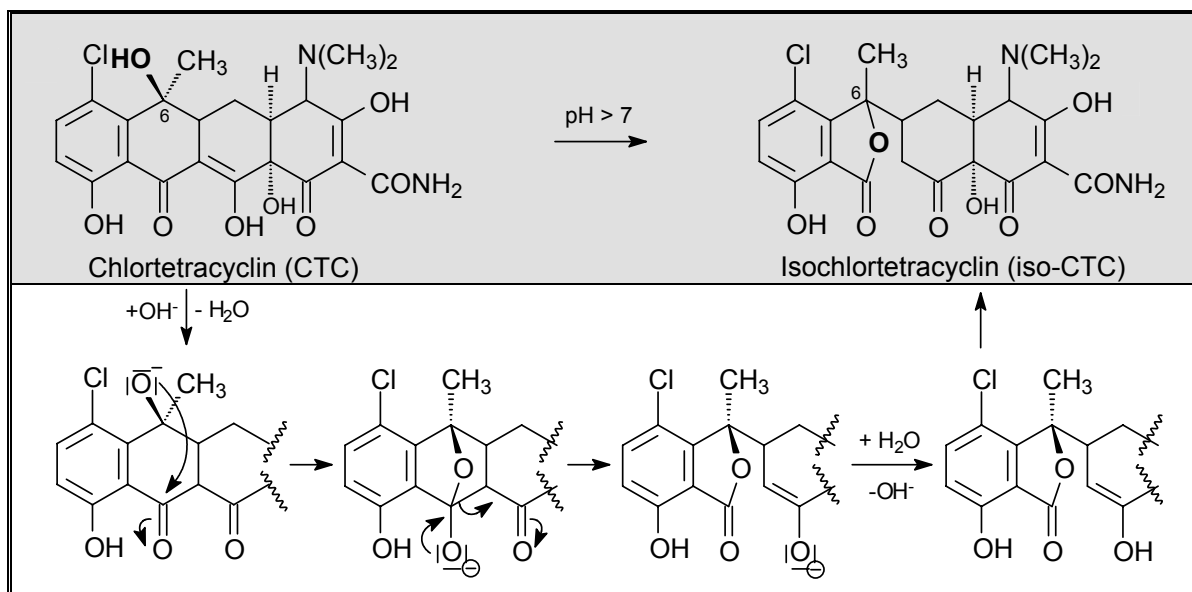


Abb. 8: Isomerisierung von Chlortetracyclin im alkalischen Milieu [136, 141]

Die Bildung von Isotetracyclinen geht einher mit einer pH-abhängigen Änderung der UV-Absorption bei 320-380 nm. Isotetracycline besitzen nur im alkalischen Milieu eine UV-Absorption im Bereich von 320-380 nm [137, 143]. Durch die Isomerisierung von Tetracyclinen wird die natürliche Fluoreszenz deutlich verstärkt, was zur analytischen Bestimmung der Tetracycline ausgenutzt werden kann [136, 147, 148].

### 3.5.3.3 Keto-Enol-Tautomerie

In Abhängigkeit vom pH-Wert und der Polarität des Lösungsmittels können Tetracycline verschiedene tautomere Formen annehmen. Je nach Dissoziationsgrad sind unter Zugrundelegung von vier den  $\text{pK}_a$ -Werten entsprechenden Protonierungen bzw. Deprotonierungen 64 tautomere Formen möglich. Für vollständig protonierte Tetracycline beschreiben DUARTE et al. neun verschiedene Tautomere, wobei die tatsächliche Struktur als Gleichgewicht aller möglichen Keto-Enol-Tautomeren aufzufassen ist [126].

Tautomere Umlagerungen können am C1-, C2- und C3-Atom des Ringes A, am C10-, C10a- und C11-Atom der Ringe CD sowie am C11-, C11a- und C12-Atom der Ringe BC stattfinden. NAIDONG et al. gelangen erstmals die chromatographische Trennung von Tautomeren des CTC und DC an Polymerphasen, wobei mittels NMR nachgewiesen werden konnte, daß diese Tautomerie am C11-, C11a- und C12-Atom stattfindet (Abb. 9) [149, 150].

Durch Ausbildung der Ketoform kann das H-Atom des C11a-Atoms sowohl *cis*- als auch *trans*-ständig zum H-Atom des C5a-Atoms stehen, woraus sich eine *cis*-Ketoform und eine *trans*-Ketoform ableiten läßt. Grundsätzlich kann die Keto-Enol-Tautomerie durch Säuren oder Basen katalysiert werden, wobei für CTC nur der säurekatalysierte Prozeß eine Rolle spielt, da im alkalischen Milieu Isochlortetracyclin entsteht und somit eine Tautomerie am C11-, C11a- und C12-Atom nicht mehr möglich ist.

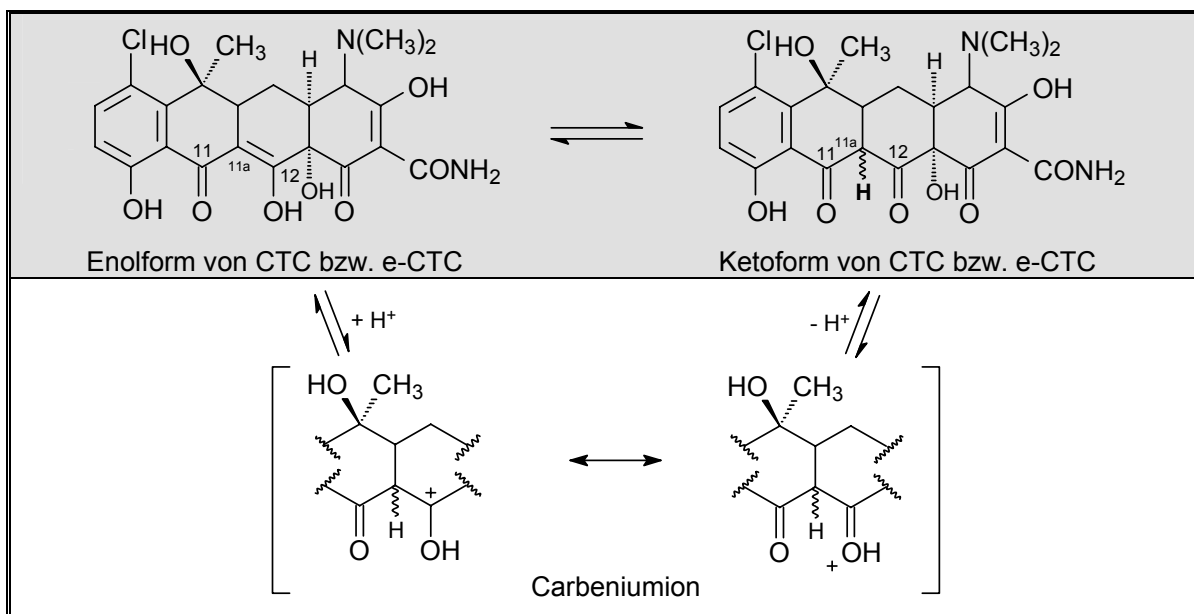


Abb. 9: Keto-Enol-Tautomerie von Chlortetracyclin [149]

### 3.5.3.4 Dehydration

Bei Tetracyclinen mit einer Hydroxygruppe am C-6-Atom wie Chlortetracyclin spaltet sich unterhalb pH 1,5 leicht Wasser ab und es entstehen unter Aromatisierung von Ring C Anhydrotetracycline (siehe Abb. 10).

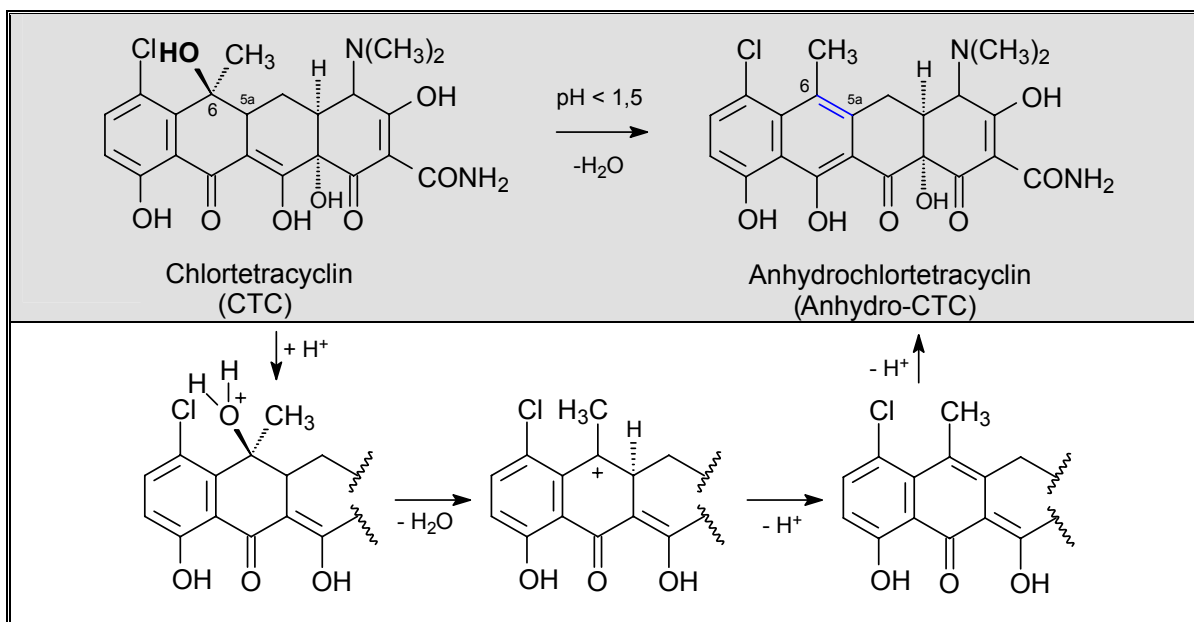


Abb. 10: Dehydration von Chlortetracyclin in stark saurem Medium [136, 141]

Diese Eliminierungsreaktion wird durch die *trans*-Stellung der tertiären Hydroxylgruppe am C-6-Atom zum Wasserstoffatom des C-5a-Kohlenstoffs ermöglicht und stellt eine irreversible Reaktion zweiter Ordnung dar [37, 122, 136]. Die Anhydrotetracycline können ihrerseits analog den Tetracyclinen im schwach sauren Bereich zwischen pH 2 und 6 zu den 4-*epi*-Anhydrotetracyclinen epimerisieren. Die Zersetzung der Tetracycline kann durch konkurrierende Abbaureaktionen der primären Zer-

setzungsprodukte überlagert sein. So verläuft die Epimerisierung der Anhydrotetracycline schneller und die Dehydrierung der 4-*epi*-Tetracycline langsamer als die entsprechende Reaktion der unveränderten Tetracycline [122].

Die Anhydroverbindungen besitzen eine gegenüber den Ausgangsverbindungen um 70 % reduzierte antibiotische Aktivität. Trotz ihrer antibiotischen Aktivität finden sie jedoch wegen ihrer deutlich toxischeren Eigenschaften gegenüber den Tetracyclinen keine klinische Anwendung. Anhydrotetracycline rufen schwere Nebenwirkungen hervor, die auf ihrer nicht selektiven Wirkung auf alle Zellmembranen, also auch auf die von eukaryontischen Zellen, beruhen [151, 124].

Die durch die Dehydratation hervorgerufene Veränderung des BCD-Ringsystems wirkt sich in erheblichem Maße auf die UV-Absorption aus und führt zu einer deutlichen Verminderung der Absorptionsintensität im Wellenlängenbereich zwischen 320-380 nm. Die Quantifizierung der Anhydroverbindungen wird bei unterschiedlichen Wellenlängen durchgeführt, da die Absorptionsprofile von den gewählten Bedingungen abhängig ist [151-154].

---

## 4 Stand der Tetracyclin-Analytik

Zum Nachweis von Tetracyclinen existieren eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden und Verfahren, weshalb in diesem Zusammenhang nur ein kurzer Überblick gegeben werden soll. Die Strukturauflösung der Tetracycline erfolgte durch die Aufnahme von Massen-, Kernresonanz-, Infrarot- und UV-Spektren [47]. Von mehr historischem Interesse sind Verfahren zur Messung des Zirkulardichroismus, volumetrische, kolorimetrische und polarographische Verfahren ebenso wie dünn-schicht- und papierchromatographische Methoden [122]. Heutzutage werden vor allem mikrobiologische Verfahren wie der Agardiffusionstest und der PREMI-Test als Screening-Test eingesetzt [155, 156, 157]. Die Vorteile dieser Verfahren liegen in der einfachen und schnellen Durchführung der Tests, wobei allerdings keine Unterscheidung der einzelnen Tetracyclinderivate möglich ist. Darüber hinaus werden auch immunologische Verfahren wie ELISA [158] und Rezeptortests wie der Charm®-Test beschrieben [122].

### Chromatographische Methoden

Die gaschromatographische Bestimmung von Tetracyclinen ist zwar nach Derivatisierung zu den Trimethylsilyl-Derivaten möglich [159], hat aber wegen der hohen Siedepunkte der Tetracycline keine praktische Bedeutung. Seit Anfang der 90er Jahre werden außerdem verschiedene kapillarelektrophoretische [160, 161, 162] und mizellarelektrokinetische chromatographische [163, 164] Methoden, die zur pharmazeutischen Reinheitsbestimmung eingesetzt werden, beschrieben. Neuere Veröffentlichungen beschreiben die Bestimmung der Tetracycline mittels Chemilumineszenz [165, 166, 167].

Das in den letzten Jahren dominierende Verfahren ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), welches gegenüber den anderen chromatographischen Methoden den Vorteil einer wesentlich höheren Trennleistung und Nachweisempfindlichkeit aufweist [122, 168]. In der Literatur werden zahlreiche Säulenmaterialien und Fließmittelgemische zur chromatographischen Trennung beschrieben, wobei die Reversed-Phase-Verfahren überwiegen und die Fließmittel in der Regel Säuren oder EDTA-Zusätze enthalten. Als Säulenmaterialien kommen vor allem auf Silicagel basierende Phasen wie C18- [169, 170, 171], C8- [172, 173] und Phenyl-Materialien [174, 175] sowie organische Polymermaterialien, häufig auf Basis von Polystyrol-Divinylbenzol (PS-DVB), [176, 177, 178] zum Einsatz. Als zugrunde liegender Retentionsmechanismus wird für diese Trennverfahren eine Wechselwirkung zwischen der stationären Phase und einem Tetracyclin-EDTA-Ionenpaar, entstanden durch Komplex- bzw. Ionenpaarbildung zwischen dem protonierten Tetracyclin und dem EDTA- bzw. Säureanion, diskutiert. Bei den Phenyl- und organischen Polymermaterialien wird zusätzlich die Bildung von  $\pi$ - $\pi$ -Komplexen zwischen den Phenylresten bzw. dem Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer und den Tetracyclinen angenommen [122, 149]. Die chromatographische Trennung der Tetracycline kann bei Verwendung von alkyl- oder phenylmodifizierten Umkehrphasen wegen des möglichen Metallionengehaltes durch die ausgeprägten Komplexbildungseigenschaften mit Metallkationen gestört werden. Da Tetracycline nur in einem pH-Wert-Bereich von 3-7,5 komplexieren, kann zur Vermeidung einer Komplexbildung entweder der pH-Wert der Fließmittel kleiner als drei eingestellt werden oder es können die Metallionen durch den Einsatz von Komplexbildnern wie Oxalsäure, Phosphorsäure und EDTA-Zusatz abgefangen werden [179]. Da Tetracycline zudem eine hohe Tendenz haben, sich irreversibel an die verbleibenden Silanol-Gruppen zu binden, kann es bei Einsatz von silica-basierenden stationären Phasen durch sekundäre Wechselwirkungen zu einem Peak-Tailing kommen. Diese Wechselwirkungen können durch einen Zusatz von Oxalsäure zum Fließmittel unterbunden werden oder

durch den Einsatz von organischen Polymerphasen als stationäre Phase von vornherein vermieden werden [11].

### Detektion

Die Detektion der Tetracycline kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen, wobei die am häufigsten verwendete Methode die UV-Detektion mittels Diodenarray-Detektor ist [180-185]. Obwohl die Tetracycline im Wellenlängenbereich von 270-280 nm ein höheres UV-Absorptionsmaximum aufweisen, siehe **Kap. 3.5.1**, bietet die Detektion bei Wellenlängen von 350-370 nm den Vorteil einer höheren Selektivität. Deutlich empfindlichere Detektionsmethoden stellen die elektrochemische [186] und die fluorimetrische Detektion dar. Da Tetracycline selbst nur eine geringe Fluoreszenz zeigen, ist für diese Detektionsart eine Nachsäulenderivatisierung zur Überführung der Tetracycline in die stark fluoreszierenden Tetracyclin-Metallkation-Komplexe oder iso-Tetracycline notwendig. Hierbei werden die Tetracycline entweder mit Calcium-, Aluminium- oder Zirkoniumsalzlösungen in schwach saurer Lösung in die entsprechenden Komplexe [187, 188] oder im alkalischen Milieu in die iso-Tetracycline [189, 190] überführt. Letztgenannte Methode ist besonders für CTC geeignet, da es unter diesen Bedingungen leicht isomerisiert. Beide Methoden eignen sich nur für die Nachsäulenderivatisierung, da zum einen Komplexierungen die chromatographische Trennung negativ beeinflussen und zum anderen die iso-Tetracycline nur in alkalischem Medium fluoreszieren.

In den letzten Jahren hat sich vor allem die Detektion mittels Massenspektrometrie durchgesetzt [191-200]. Diese Detektionsart hat gegenüber den anderen Methoden zum einen den Vorteil einer höheren Selektivität und zum anderen in den meisten Fällen eine höhere Empfindlichkeit. Aufgrund der Möglichkeit, nur bestimmte Massen „isolieren“ zu können, kann hierbei häufig auf eine aufwendige Probenvorbereitung verzichtet werden [201, 202]. Daher ist besonders die Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) im MRM-Mode (Multiple Reaction Monitoring) ein hoch selektives und sensitives Verfahren zum quantitativen Nachweis von Antibiotika in komplexen biologischen Matrices [203, 204]. Vor allem ist mit diesem Verfahren die Bestimmung mehrerer, auch co-eluierender, Substanzen nebeneinander mit kurzen Analysenzeiten möglich [205, 206, 207, 208]. Die Ionisation der Tetracycline ist mit verschiedenen Techniken möglich: Atmospheric pressure chemical ionization (APCI), Particle Beam Ionization (PB), Fast Atom Bombardment (FAB) und Electrospray Ionization (ESI). Die am häufigsten eingesetzte Technik ist die Electrospray Ionization, die sowohl im positiven als auch im negativen Mode betrieben werden kann. Vorwiegend wird die Electrospray-Technik im positiven Mode ( $\text{ESI}^+$ ) genutzt, da die Tetracycline in den meisten Fällen in Abhängigkeit von den gewählten chromatographischen Bedingungen bei dieser Ionisierung im Vergleich zu den anderen Techniken die höchste Sensitivität aufweisen [172, 209, 210].

### Probenvorbereitung

Für die Aufarbeitung biologischer Proben zur Bestimmung von Tetracyclinen werden in der Literatur eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden beschrieben: Flüssig-Flüssig-Extraktion [211-213], Festphasenextraktion (SPE) [12, 214-221], Festphasenmikroextraktion (SPME) [222, 223] Metall-Chelat-Affinitäts-Extraktion [224-227], Matrix-Solid-Phase-Dispersion (MSPD) [168, 228] und Extraktion mit Dialyse [177, 229, 230].

Zunächst ist bei allen Methoden eine Homogenisierung der entnommenen Proben vorzunehmen. Dies geschieht bei festem Probenmaterial wie Gewebeproben in einem ersten Schritt durch Einsatz einer Moulinette. Anschließend erfolgt in einem zweiten Schritt, mit Ausnahme der MSPD, eine Fest-



Flüssig-Extraktion der Tetracycline mit einem wäßrigen Lösungsmittel aus der zerkleinerten Probe, wobei in den meisten Fällen der EDTA-McIlvain-Puffer verwendet wird, der als Chelatisierungsreagenzien Citronensäure und EDTA enthält und damit eine Komplexierung der Tetracycline an Kationen aus der Matrix verhindert [170, 231, 239, 243, 232]. Hierbei wird, um eine vollständige Homogenisierung der Probe zu gewährleisten und eine quantitative Extraktion zu erzielen, ein Ultra-Turrax eingesetzt. Im Anschluß daran kann eine Aufreinigung dieses so gewonnenen Extraktes mit den oben erwähnten Methoden erfolgen. Die klassische Flüssig-Flüssig-Extraktion ist durch verschiedene Festphasenextraktions-Methoden (SPE, SPME) verdrängt worden, wobei für die Tetracyclinanalytik als Sorbentien ebenso wie für die chromatographische Bestimmung sowohl Reversed-Phase-Systeme, basierend auf Silicagel, wie C18-, C8-, die zum Teil speziell zur Tetracyclinbestimmung modifiziert sind [217], organische Polymermaterialien [192, 233-237] als auch Kationenaustauschersäulen [219, 238] von Bedeutung sind. Genauso wie bei der chromatographischen Trennung können freie Silanolgruppen bei alkylmodifizierten Säulenmaterialien die Elution der Analyten verhindern. Bei der Metall-Chelat-Affinitäts-Extraktion wird die Eigenschaft der Tetracycline, mit verschiedenen Metallionen Komplexe zu bilden, zur selektiven Aufarbeitung genutzt, beispielsweise setzen FARRINGTON et al. [224, 225] eine mit Kupfer beladene Chelating-Sepharose-Säule zur Komplexierung der Tetracycline ein. Häufig werden auch zwei verschiedene Aufreinigungsmethoden, gekoppelt, um saubere Meßproben zu erhalten. So umfaßt die amtliche Untersuchungsmethode nach § 35 LMBG sowohl eine Metall-Chelat-Affinitäts-Extraktion als auch eine Festphasenextraktion [226]. Die Aufarbeitung mit MSPD bietet den Vorteil, daß die zerkleinerte Probe direkt mit dem Festphasenmaterial gemischt wird und daher keine Fest-Flüssig-Extraktion erforderlich ist, um die Analyten in einem ersten Schritt aus der Probe herauszuextrahieren. Die Aufreinigung mit Dialyse hat den Nachteil, daß das erhaltene Dialysat aufgrund des hohen Extraktvolumens zusätzlich aufkonzentriert werden muß, wobei hier meist ein Festphasenextraktionsschritt nachgeschaltet wird. Eine Automatisierung der Probenvorbereitungsmethoden SPE, SPME, Metall-Chelat-Affinitäts-Extraktion und Dialyse in Form einer On-line-Kopplung mit dem HPLC-System ist zwar grundsätzlich möglich und wird auch von verschiedenen Autoren beschrieben [177, 225, 229, 239], ist aber bei der Aufarbeitung komplexer biologischer Proben oft schwer zu realisieren.

Von den beschriebenen Probenvorbereitungstechniken ist die Festphasenextraktion die am häufigsten eingesetzte Methode, wobei zunehmend organische Polymermaterialien als Sorbentien verwendet werden [192, 233-235]. Bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren, die häufig auch zur Bestimmung mehrerer Tetracyclinderivate dienen, umfaßt die Quantifizierung der Tetracycline meist lediglich die jeweiligen Wirkstoffe. Verfahren, die Abbau- oder Umwandlungsprodukte der Tetracycline berücksichtigen, beschränken sich dabei auf die Epimere. Auf die besondere Bedeutung der Epimere bei der Bestimmung von Tetracyclinen in Lebensmitteln tierischer Herkunft weisen verschiedene Autoren wie BERGNER-LANG et al. [240] und KÜHNE et al. [322] hin. Da die Epimere entweder bereits im Probenmaterial vorhanden sein können oder auch während der Probenvorbereitung entstehen können, ist die Berücksichtigung der Epimere unbedingt erforderlich. Vor allem bei der Extraktion mit McIlvain-Puffer, der meist auf pH 4 eingestellt wird, ist von einer Epimerisierung auszugehen. Aufgrund der besonders großen pH-Instabilität von CTC im Vergleich zu den anderen Tetracyclinen ist besonders bei der Bestimmung von CTC auf mögliche Abbau- und Umwandlungsreaktionen zu achten. Neben den epimeren Verbindungen können in Abhängigkeit vom pH-Wert auch Isomere, Keto-Enol-Tautomere sowie Anhydroverbindungen, siehe **Kap. 3.5.3**, auftreten.

Es gibt jedoch nur wenige Untersuchungen zu weiteren Metaboliten von CTC in biologischen Proben. ZURHELLE et al. und KENNEDY et al., die Hühnereier auf CTC und mögliche Abbau- und Umwandlungsprodukte untersuchten, belegen, daß neben den Epimeren auch iso-CTC und e-iso-CTC vorkommen [143, 229].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein HPLC-UV-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von CTC in Urin, Faeces, Plasma, Knochen und Schlachtproben entwickelt und validiert werden, wobei ein besonderes Augenmerk den möglichen Metaboliten von CTC galt. Dieses Verfahren sollte die Extraktion der Proben mit EDTA-McIlvain-Puffer und einen anschließenden Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsschritt durch eine off-line Festphasenextraktion beinhalten. Die Kopplung dieser beiden Detektionsarten hat den Vorteil, einerseits die hohe Selektivität und Empfindlichkeit der Massenspektrometrie und andererseits die hohe Reproduzierbarkeit und Präzision der UV-Detektion auszunutzen. Insbesondere werden bei der UV-Detektion auch matrixbedingte signalsuppressive oder -verstärkende Detektionseffekte vermieden.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Untersuchungsmethodik und Projektverlauf

Die Zielsetzungen des vom MUNLV gegründeten Projektes „**Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung**“ resultierten aus der ungenügenden Datenlage über die Aufnahme, der Metabolisierung und Verbleib von Arzneimitteln, die in der Tiermast eingesetzt werden. Zum Zeitpunkt des Projektbeginns war keine sichere Aussage über den durch die in der Tiermast eingesetzten Arzneimittel verursachten Eintrag in die Nahrungskette und Expositionspfad in die Umwelt sowie das damit verbundene Verbraucherrisiko möglich. Von zentraler Bedeutung war dabei die Frage, in welchem Maße neben den Wirkstoffen auch Metabolite sowie Abbau- und Umwandlungsprodukte vorkommen und inwieweit diese ein Verbraucherrisiko darstellen können. Die besondere Verbraucherschutzrelevanz dieser Fragestellung wird durch die zunehmende Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen verstärkt. Das hier beschriebene Projekt sollte einen Beitrag zur Aufklärung der Eintragspfade antibiotisch wirksamer Pharmakarückstände in die Nahrungskette und zur Abschätzung der Umweltbelastung liefern, um das Gefährdungspotential für den Verbraucher besser beurteilen zu können. In diesem Projekt wurde das Verhalten der auf Grund ihrer Anwendungsbreite bei Schweinen besonders relevanten Antiinfektiva Chlortetracyclin (CTC) und Sulfadiazin (SFD) kombiniert mit Trimethoprim (TMP) als potenziertem Sulfonamid untersucht. Auf die Analyse der Sulfadiazin- und Trimethoprim-Gehalte wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

In einer ersten Medikationsstudie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Landwirtschaftszentrum Haus Düsse, Bad Sassendorf (Haus Düsse-Studie) die Durchführung eines Mastdurchganges mit definierter Medikation unter praxisnahen Bedingungen. Es wurden 40 Schweine in einer Gruppe gehalten und den Tieren über Längströge eine definierte Menge an CTC, SFD und TMP verfüttert. Die Schlachtung der Tiere erfolgte drei Monate nach der Arzneimittelfütterung. Diese Studie diente dazu, das Ausscheidungsverhalten der applizierten Antiinfektiva in Urin zu untersuchen und anhand der entnommenen Schlachtproben festzustellen, mit welchem Eintrag in die Nahrungskette unter landwirtschaftlich üblichen Bedingungen zu rechnen ist.

Da unter diesen Bedingungen nicht beurteilt werden kann, wieviel der applizierten Wirkstoffe ausgeschieden werden und welche Menge im Tierkörper verbleibt, war in einer zweiten Medikationsstudie in Kooperation mit der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode (FAL-Studie) und der Universität Paderborn im Projekt: „Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“, die Durchführung eines Mastdurchganges von fünf Schweinen unter definierteren Bedingungen in Einzelhaltung geplant. In dieser Studie wurden Schweine während der Medikation in Stoffwechselkäfigen gehalten, wobei eine individuelle Arzneimittelfütterung und eine individuelle Sammlung von Kot und Urin erfolgte. Die Arzneimittelfütterung erfolgte in zwei Medikationsphasen. Die in diesem Versuch anfallende Gülle wurde für weitergehende Freilandversuche im Rahmen des „Antiinfektiva“-Projektes der Universität Paderborn [93, 277], eingesetzt. Die Schlachtung der Tiere erfolgte mit Ausnahme eines Tieres nach Ablauf der Wartezeit von vierzehn Tagen, wobei die Tiere nach der Arzneimittelfütterung ebenfalls in einer Gruppe gehalten wurden. Anhand dieser Studie sollte beurteilt werden, wieviel des applizierten Wirkstoffes wieder ausgeschieden wird und wie hoch die Wirkstoffgehalte in den Schlachtproben nach Ablauf der Wartezeit sind. Eines dieser Tiere wurde direkt nach der Arzneimittelfütterung geschlachtet, um eine Bilan-

zierung vorzunehmen.

Besonderes Augenmerk galt dem Metabolismus von CTC. In einem ersten Schritt wurde der CTC-Gehalt in den bei den Medikationsstudien entnommenen Proben, entsprechend der EU-Verordnung EWG Nr. 2377/90, als Summe von CTC und e-CTC ermittelt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, inwieweit neben dem Epimeren weitere Abbau- und Umwandlungsprodukte in den einzelnen Matrices nachzuweisen sind und ob diese bei der Ermittlung des CTC-Gehaltes mit berücksichtigt werden müssen. In den Schlachtproben sowie aller entnommen Proben des „Bilanzierungstieres“ der FAL-Studie sollte eine Quantifizierung weiterer Metabolite von CTC erfolgen.

Die im Rahmen des Projektes gewonnenen Erkenntnisse dienen dazu, den Eintragspfad der den Schweinen applizierten Wirkstoffe sowie deren Metabolite in die Nahrungskette und die daraus resultierende Gefährdung für den Verbraucher besser abschätzen zu können.

### 5.1.1 Haus Düsse-Studie

Zu Beginn des Mastdurchganges wurden 80 nicht medikamentiv vorbehandelte Schweine im Alter von zwei Monaten im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse aus deren eigener Sauenhaltung aufgestellt. Die Tiere standen in Ställen mit Spaltenboden und das Stallabteil war mit einer Zwangslüftungsanlage versehen. Von diesen Tieren erhielten 40 Tiere (Versuchsgruppe) über einen Zeitraum von zwei Wochen Antibiotika über das Trockenfutter (Getreide-Sojamischung), wobei den Tieren das Futter trocken von Hand vorgelegt wurde. Es wurde insgesamt 1 t antibiotikahaltiges Mischfutter hergestellt, wovon 852 kg an die Tiere der Versuchsgruppe verfüttert wurde. Die 40 Versuchstiere haben eine Arzneimittelwirkstoffmenge von 369 g CTC aufgenommen, womit sich pro Versuchstier eine durchschnittliche Aufnahmemenge über den gesamten Medikationszeitraum von 9,21 g ergeben hat. Auf die zusätzlich verabreichten Sufadiazin- und Trimethoprim-Mengen wird in dieser Arbeit nicht eingegangen. Für die 40 medikamentiv unbehandelten Tiere (Kontrollgruppe) wurde ebenfalls 1 t Mischfutter ohne Antibiotika erstellt und über den gleichen Zeitraum bei gleicher Vorlagesystematik verfüttert. Die Kontrolltiere hatten hiervon 751 kg aufgenommen. Nach Medikationsende wurden beide Gruppen mit einem Flüssigfutter aus einer zentral steuerbaren Futteranlage weitergefüttert.

Die 40 Tiere wurden mit einer Ohrmarkennummer gekennzeichnet und in Buchten zu je acht Tieren rechts und links von einem Kontrollgang aufgestellt und an Längströgen gefüttert. Eine Seite erhielt das Kontrollfutter, die andere das Versuchsfutter. Bei der ersten Urinprobenahme wurden willkürlich auf jeder Seite Tiere beprobt, bis die Anzahl der am Versuch beteiligten Tiere erreicht war. Anschließend wurden die am Versuch beteiligten Tiere zusätzlich gekennzeichnet. Damit ergab sich ein Versuchskollektiv von 24 Tieren, zwölf Kontrolltiere und zwölf Versuchstiere. Vor Beginn der Medikation sowie im Anschluß an die Medikation erfolgten mit Unterstützung des Personals vom LEJ, Düsseldorf (Landesamt für Ernährungswirtschaft und Jagd) über einen Zeitraum von drei Monaten in Abständen von vierzehn Tagen Probenahmen von Urin. Versuchstier 3 ist während des Mastdurchganges erkrankt und mußte mehrfach zusätzlich medikamentiert werden (s. **Kap. 7.4**). Im Alter von fünf Monaten erfolgte die Schlachtung der Tiere, wobei den Tieren am Schlachttag außer Urinproben, dies war allerdings nicht bei allen Tieren möglich, zusätzlich Muskel-, Leber-, Nieren-, Knochen- und Blutproben entnommen wurden. In **Abb. 11** ist die Durchführung der Medikationsstudie schematisch dargestellt.

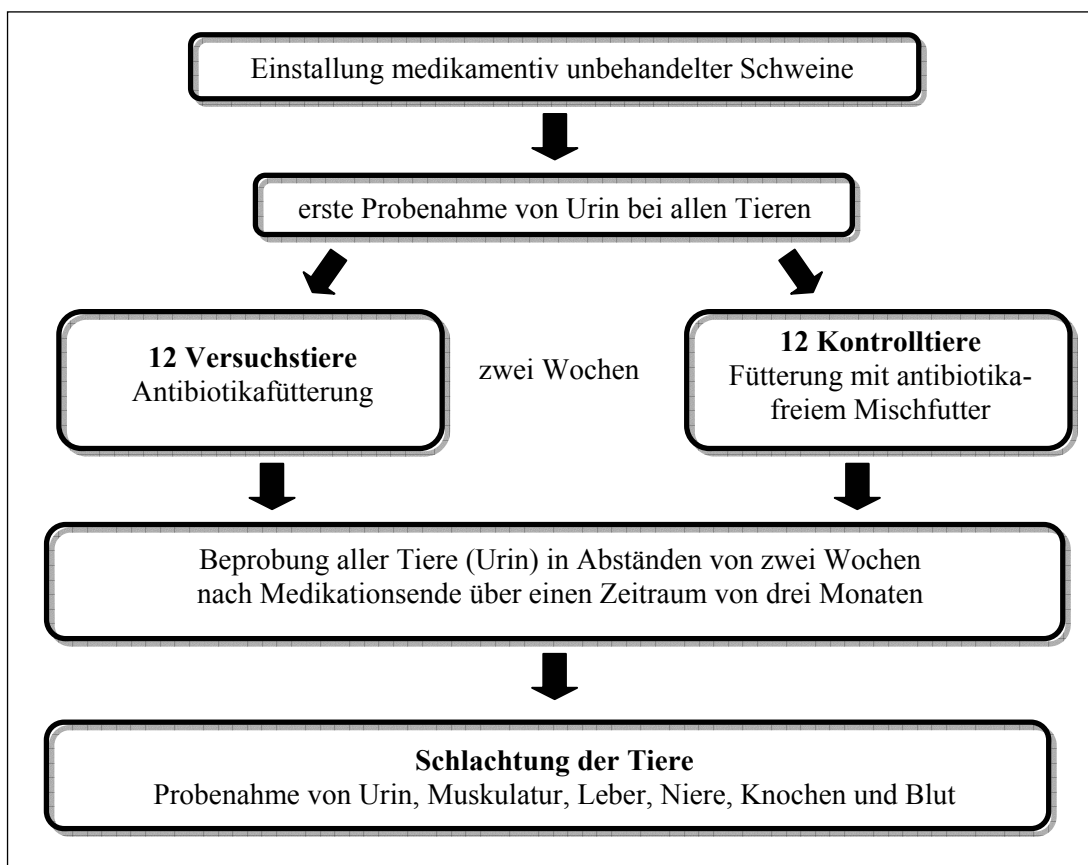


Abb. 11: Schematischer Ablauf des Mastdurchganges im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse

### 5.1.2 FAL-Studie

Fünf medikamentiv unbehandelte Börgen, also Kastraten, mit einem Gewicht von 71-89 kg wurden in Stoffwechselkäfigen aufgestellt. Zur Erfassung des Grundstatus wurden am 1. Versuchstag vor Beginn der Medikation Urin-, Faeces- und Blutproben genommen. Nach der Einstellung der Tiere in Stoffwechselkäfigen erfolgten zwei Medikationsphasen von jeweils zehn Tagen (Versuchstag 1-10 und 22-31), unterbrochen von einer aus Tierschutzgründen notwendigen Pause von elf Tagen (Versuchstag 11-21). Die Medikation der Tiere erfolgte unter therapieüblichen Bedingungen. Dabei wurden den Tieren das Arzneimittel Chlortetracyclin 100 (Wirkstoff: Chlortetracyclin, 1000 g Präparat enthalten 100 g Chlortetracyclin) oral über das Trockenfutter verabreicht. Die Dosierung entsprach der maximal üblichen therapeutischen Anwendung. Die Applikationsmenge des Wirkstoffes richtete sich nach dem Körpergewicht der Tiere, wobei die Dosierung jeden zweiten Tag unter Berücksichtigung der Gewichtszunahme erhöht wurde. Die Dosierung der Arzneimittel ist im einzelnen in **Tab. A. 3** und **Tab. A. 4** im Anhang aufgeführt. Neben Chlortetracyclin sind den Tieren noch Sulfadiazin und Trimethoprim verabreicht worden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mitberücksichtigt wurden. In **Abb. 12** ist der Ablauf der Studie schematisch dargestellt.

In den Stoffwechselkäfigen wurden Urin und Faeces separat aufgefangen und täglich tierweise zu Gülle zusammengeführt. Es erfolgten tägliche Probenahmen von Urin und Faeces. Zusätzlich wurden am Anfang, in der Mitte und am Ende jeder Medikationsphase Blutproben entnommen. Während der Medikationspause wurden die fünf Tiere in einem separaten Stall in Einzelbuchten gehalten. Der in

dieser Zeit angefallene Kot und Urin wurde verworfen. Am Ende der Studie, also nach der zweiten Medikationsphase, wurden die täglichen Güllesammlungen der ersten und zweiten Medikationsphase jeweils zu einem Güllepool zusammengeführt.

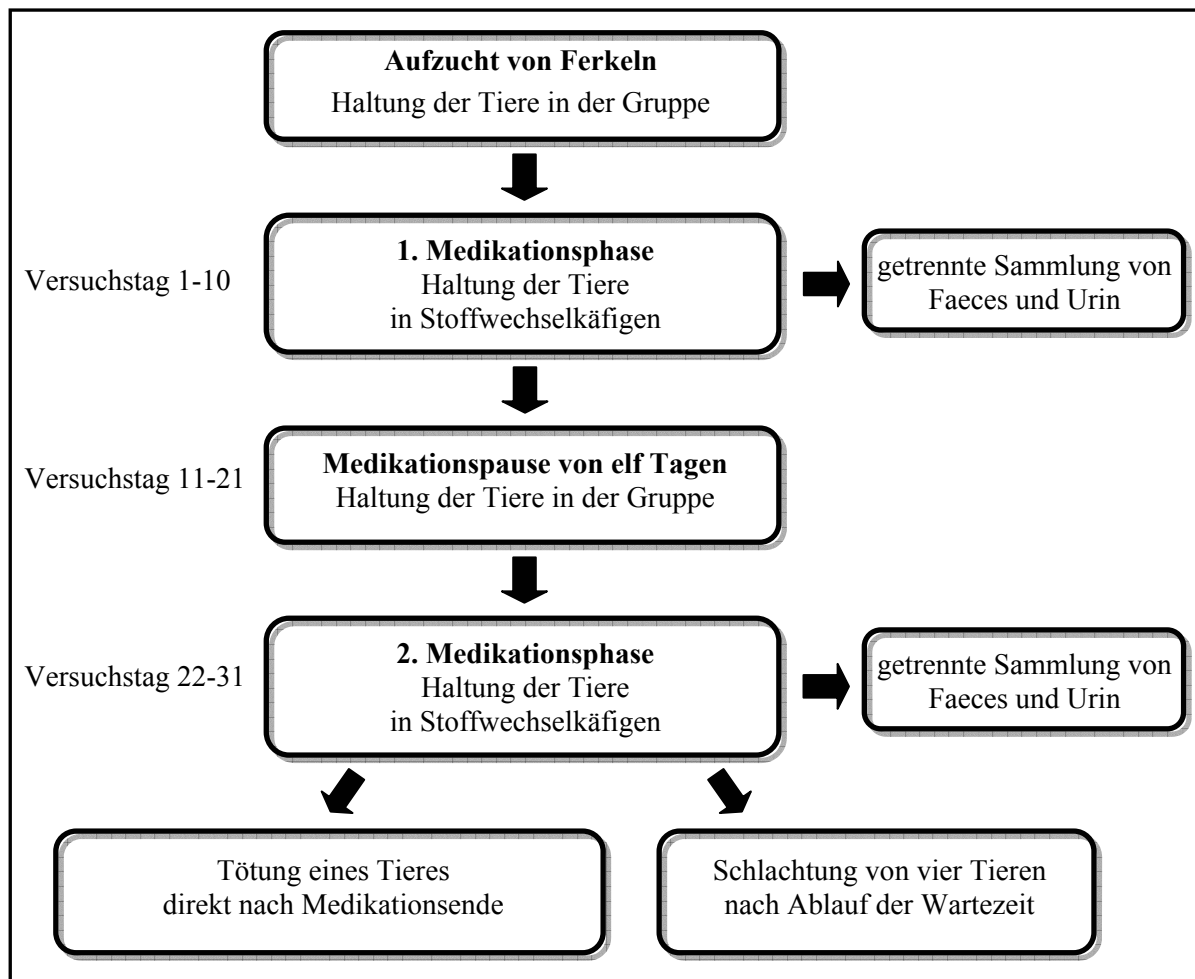


Abb. 12: Schematischer Ablauf der Medikationstudie an der FAL

Tier 95 wurde zur Durchführung einer Bilanzierung etwa drei Stunden nach der letzten Antibiotikafütterung der zweiten Medikationsphase am Versuchstag 31 geschlachtet. Bei der Schlachtung wurde dem Tier Urin-, Faeces-, Blut-, Muskulatur-, Leber-, Niere- und Knochenproben entnommen. Die übrigen vier Tiere wurden während der Wartezeit von vierzehn Tagen in einem separaten Stall in Einzelbuchten gehalten und am 46. Versuchstag geschlachtet. Die Tiere wurden entsprechend dem Tier 95 beprobt.

## 5.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von CTC und Metabolite in biologischen Proben

### 5.2.1 Entwicklung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens

Ziel war es, ein chromatographisches Verfahren mit HPLC-UV-MS/MS für die quantitative Bestimmung von CTC und e-CTC in den Matrices Urin, Plasma, Faeces, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen zu entwickeln. Neben diesen Verbindungen sollte zusätzlich zunächst nur eine qualitative Bestimmung von iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC möglich sein. Die zur Methodenentwicklung eingesetzten Standardsubstanzen wiesen eine minimale Reinheit von 97 % auf. Außer e-iso-CTC sind die Verbindungen CTC, e-CTC, iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC kommerziell erhältlich. Das nicht erhältliche e-iso-CTC wurde durch Epimersierung von iso-CTC in schwach saurer Lösung hergestellt (siehe **Kap. 7.10.1**).

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen durchgeführt:

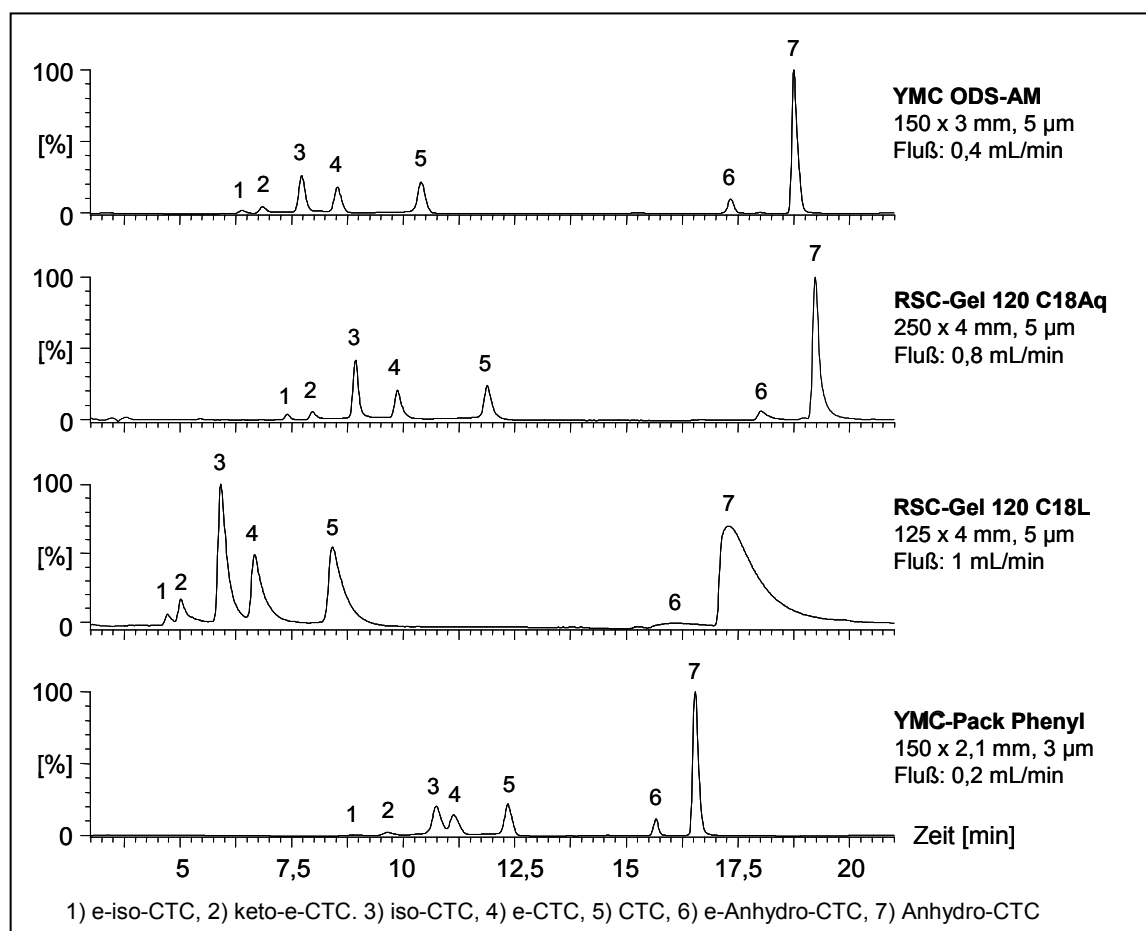
- Aufnahme der UV-Spektren von CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen (Lösungsmittel: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/0,5 % HCOOH (v/v), pH 2,5): Für CTC und e-CTC wurden zwei UV-Absorptionsmaxima ermittelt, die bei 275 nm und 370 nm liegen, wobei die erste Bande die intensivere ist, siehe auch **Abb. 29**. Bei allen übrigen Verbindungen konnte nur ein Absorptionsmaximum bei 275 nm festgestellt werden, da bei ihnen eine Modifikation des BCD-Ringes erfolgt ist, die zur Auslöschung der UV-Absorption im Wellenlängenbereich oberhalb von 300 nm führt, siehe **Kap. 3.5.1**. Die jeweiligen Epimere zeigen weitestgehend identische UV-Spektren.
- Auswahl der mobilen und stationären Phase zur chromatographischen Trennung von CTC und Metabolite
- Entwicklung der MS/MS-Detektion durch Aufnahme von Precursor- und Produkt-Ionen-Scans aller Verbindungen
- Untersuchung der Stabilität der zu quantifizierenden Substanzen CTC und e-CTC in Lösung im Hinblick auf die Herstellung und Lagerung von Kalibrierlösungen

#### 5.2.1.1 Auswahl der mobilen und stationären Phase

In Abhängigkeit von der Detektionsart sind in der Literatur eine Vielzahl verschiedener **mobiler Phasen** beschrieben worden. Sowohl für die UV-Detektion als auch für die Fluoreszenzdetektion werden in den meisten Fällen Gemische aus Acetonitril-Methanol-Oxalsäure pH 2 verwendet, wobei manchmal der mobilen Phase EDTA zugesetzt wird [142, 180, 183, 187]. Des weiteren wird auch der Einsatz von Acetat-Puffer und Phosphat-Puffer beschrieben [186, 188, 189]. Puffer-Lösungen sowie EDTA-Zusätze eignen sich aufgrund ihrer schweren Verdampfbarkeit und möglichen Clusterbildungen nicht für die massenspektrometrische Detektion. Zudem kann es zum Auskristallisieren der Puffersalze im Interface und Ablagerungen im MS-Analysatorteil kommen. Daher kommen für diese Detektionsart Gemische aus Acetonitril-Methanol-Oxalsäure pH 2 [170], Trifluoressigsäure-Acetonitril [172], Essigsäure-Acetonitril [209] oder Ameisensäure-Acetonitril [195] in Frage. Für die eigenen Untersuchun-

gen wurde als mobile Phase das von LOCK et al. [195] beschriebene Gemisch aus Ameisensäure-Acetonitril ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCOOH}$ , 0,5 %  $\text{HCOOH}$ , (v/v), pH 2,8) ausgewählt. Dieses Fließmittelgemisch hat zum einen den Vorteil einer einfachen Herstellung und zum anderen sind aufgrund des niedrigen pH-Wertes ( $< 3$ ) keine Komplexbildner erforderlich. Die Elution der Tetracycline erfolgt in den in der Literatur beschriebenen Verfahren je nach Fragestellung entweder isokratisch oder mit einer Gradientenmethode. Die Elution kann wegen der ähnlichen chromatographischen Eigenschaften von CTC und seiner Metabolite nicht isokratisch erfolgen. Daher wurde für die Bestimmung von CTC und seiner Metabolite eine Gradientenmethode entwickelt, mit der eine chromatographische Trennung aller Verbindungen, insbesondere der schwer trennbaren Verbindungen e-CTC und iso-CTC, möglich ist.

Zur Auswahl einer stationären Phase wurden verschiedene analytische Säulen auf ihre Eignung zur Trennung von CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC hin überprüft. Es wurden vier verschiedene analytische Säulen eingesetzt: YMC-ODS-AM (150 x 3 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), RSC-Gel C18 Aq (250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), RSC-Gel 120 C18 L (125 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), YMC-Phenyl (150 x 2,1 mm, 3  $\mu\text{m}$ ). Die mit diesen analytischen Säulen erhaltenen Chromatogramme sind in **Abb. 13** abgebildet.



**Abb. 13:** Trennung von CTC und seiner Metabolite mit verschiedenen analytischen Säulen ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) (HPLC-UV, 275 nm)

Die YMC-ODS-AM-Säule zeichnet sich sowohl durch ein besonders gutes end-capping als auch einen sehr geringen Metallionen-Gehalt aus und wird zum Einsatz für die Tetracyclinbestimmung bereits



von OKA et al. beschrieben [170]. Da bei der Retention der Tetracycline sekundäre Wechselwirkungen und damit das end-capping eine große Rolle spielt, wurde zum einen die Trennung auf einer Säule mit hydrophilem end-capping, RSC-Gel C18 Aq, und zum anderen mit hydrophobem end-capping, RSC-Gel 120 C18 L, untersucht. Während letztgenannte Säule für alle Verbindungen zwar zu einer Trennung aller Verbindungen, aber zu einem starken Peak-Tailing, besonders für Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC, führte, ergab sich mit RSC-Gel C18 Aq eine mit der YMC-ODS-AM-Säule vergleichbar gute Trennung mit basisliniengetrennten, schmalen und symmetrischen Peaks für alle Substanzen. HELLER et al. und JÜRGENS et al. beschreiben den Einsatz einer Säule mit Alkyl-Phenyl-Belegung, die vor allem bei Verbindungen mit höherer Retentionszeit wie Anhydro-CTC zu einer geringeren Bandenverbreiterung führen soll [174, 175]. Der Einsatz der YMC-Phenyl-Säule führte zwar zu einer Verkürzung der Retentionszeiten um zwei Minuten und schmalen, symmetrischen Peaks für Anhydro- und e-Anhydro-CTC, jedoch konnte keine Trennung von e-CTC und iso-CTC mehr erzielt werden. Von den erprobten Säulen erwies sich neben der YMC-ODS-AM-Säule mit einer Dimension von 150 x 3 mm, 5  $\mu$ m nur die RSC-Gel C18 Aq für die Trennung von CTC und seiner Abbau- und Umwandlungsprodukte als geeignet. Da mit der RSC-Gel C18 Aq-Säule keine wesentlich bessere Trennung als mit der YMC-ODS-AM-Säule erzielt wurde, ist der Einsatz der YMC-Säule beibehalten worden.

### 5.2.1.2 Entwicklung der MS/MS-Detektion

Zur Entwicklung der MS/MS-Detektionsmethode mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer wurde zunächst überprüft, welche der Ionisationstechniken APCI oder ESI sich bei den gewählten chromatographischen Bedingungen am besten eignet. In Übereinstimmung mit den Literaturverfahren zeigten alle Verbindungen bei der Electrospray-Ionisation eine bessere Sensitivität. Die höchste Sensitivität konnte bei der ESI-Detektion im positiven Mode ( $\text{ESI}^+$ ) erzielt werden. CTC und e-CTC bilden mit einer Molmasse von 478 g/mol das Precursor-Ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$  mit  $m/z$  479 ( $^{35}\text{Cl}$ -Isotop). Das Fragmentierungsmuster dieses Precursor-Ions ist in **Abb. 14 a** dargestellt, wobei dieser Zerfallsweg, basierend auf verschiedenen Angaben in der Literatur, postuliert wurde. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Das Molekülion zerfällt in einem ersten Schritt unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$  in das Produkt-Ion mit  $m/z$  462 ( $[\text{M} + \text{H} - \text{NH}_3]^+$ ), welches dann im nächsten Schritt unter Wasserabspaltung zum Produkt-Ion mit  $m/z$  444 ( $[\text{M} + \text{H} - \text{NH}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$ ) fragmentiert [143, 172, 194, 195].

Für das CTC- und e-CTC-Molekül, welches das  $^{37}\text{Cl}$ -Isotop enthält, mit  $m/z$  481 als Precursor-Ion finden sich dieselben Fragmentierungsmuster, denn es entstehen als Produkt-Ionen die Fragmente mit  $m/z$  464 und  $m/z$  446. Das Isotopenverhältnis des Chlors kann somit zusätzlich zur Identifizierung herangezogen werden. Neben diesen Hauptfragmenten bilden CTC und e-CTC die Produkt-Ionen mit  $m/z$  371 und 154 aus dem Precursor-Ion mit  $m/z$  479. Während das Produkt-Ion mit  $m/z$  371 ein Folgefragment des Produkt-Ions 444 ist, stellt die Bildung von  $m/z$  154 über  $m/z$  171 eine eigenständige Zerfallsreaktion dar [175, 241-243]. Iso-CTC und e-iso-CTC lassen sich nur mit hoher Energie fragmentieren und bilden aus dem Precursor-Ion mit  $m/z$  479 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ) von den für CTC und e-CTC typischen Fragmenten hauptsächlich nur das Produkt-Ion mit  $m/z$  462 ( $[\text{M} + \text{H} - \text{NH}_3]^+$ ), geringfügig auch  $m/z$  154. Wegen der Phthalidstruktur von Ring C kann das Produkt-Ion  $m/z$  444 ( $[\text{M} + \text{H} - \text{NH}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$ ) nicht, dagegen bei höherer Kollisionsenergie ein charakteristisches Fragment mit  $m/z$  197 gebildet werden, dessen Struktur nicht bekannt ist. Das Fehlen des Produkt-Ions mit  $m/z$  444 ist also ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal für iso-CTC und e-iso-CTC [143].

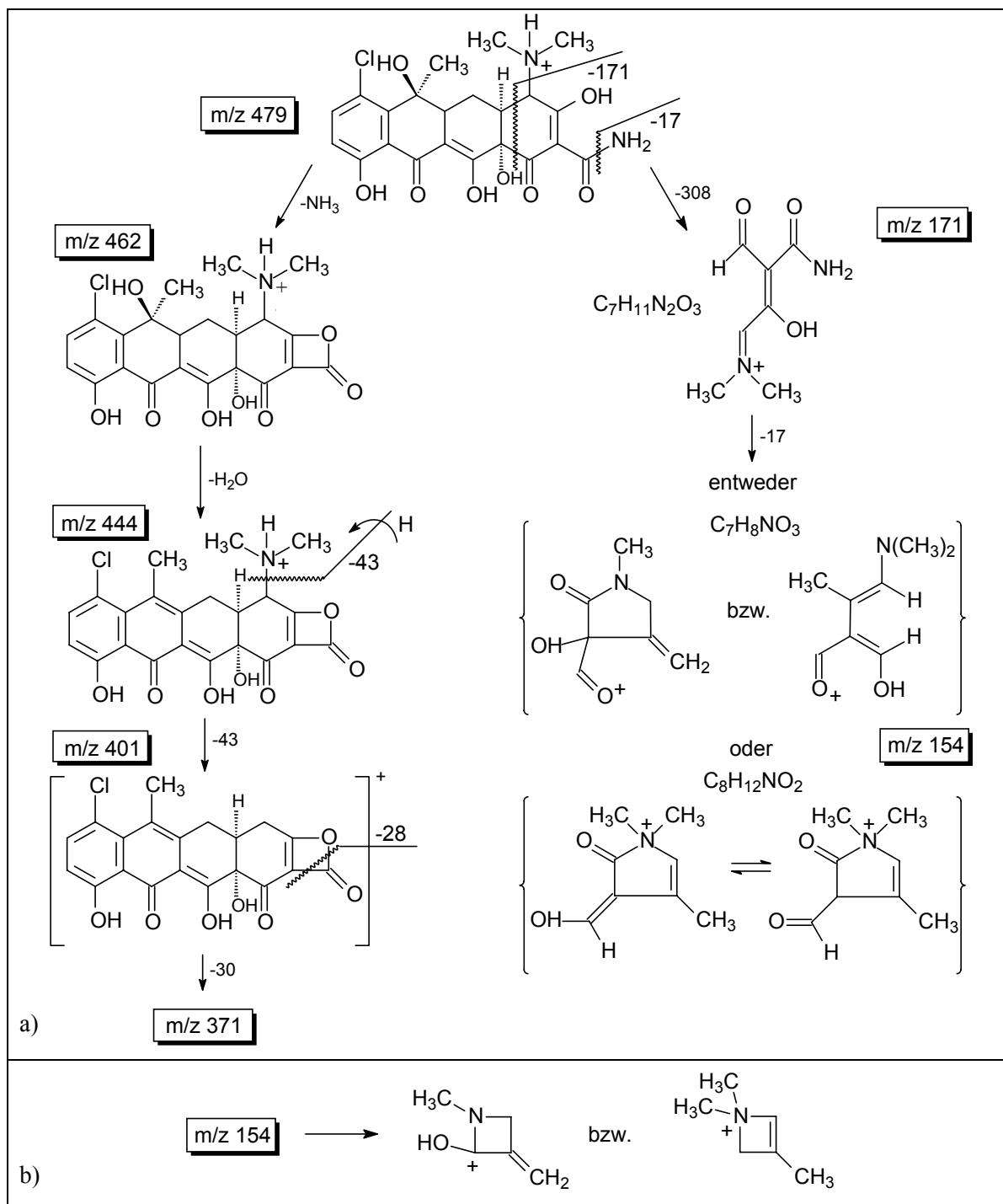


Abb. 14: a) Fragmentierungsreaktionen von CTC und e-CTC [102, 241, 242], b) Struktur des Produkt-Ions von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit  $m/z$  98 [242]

Der Zerfall der Abbauprodukte Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit einem Precursor-Ion von  $m/z$  461 ( $[M + H]^+$ ) erfolgt im ersten Schritt in einer  $NH_3$ -Abspaltung und führt zu dem für CTC und e-CTC charakteristischen Fragment mit  $m/z$  444 ( $[M + H - NH_3]^+$ ). Ebenso entsteht das Produkt-Ion mit  $m/z$  154, dagegen nicht das Produkt-Ion mit  $m/z$  371. Neben diesen für CTC und e-CTC typischen Fragmenten bilden Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC ein zusätzliches Produkt-Ion mit  $m/z$  98, für das die in Abb. 14 b dargestellten Strukturen angenommen werden [242].

Zur **Identifizierung** der Substanzen wurden die Retentionszeiten, die UV-Spektren und die bei der

massenspektrometrischen Detektion mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer im MRM-Modus erhaltenen Fragmentierungsmuster, insbesondere die relativen Intensitäten der einzelnen Fragmentionen herangezogen. Die **Quantifizierung** erfolgte für CTC und e-CTC mit der UV-Detektion aus Gründen der Selektivität bei 370 nm, für alle übrigen Verbindungen bei 275 nm, da diese im Bereich von 320-380 nm keine UV-Absorption aufweisen. Bei der massenspektrometrischen Detektion erfolgte die Quantifizierung über den Totalionenstrom (TIC) der einzelnen Fragmentionen, da der TIC im Vergleich zur höchsten Massenspür eine höhere Intensität aufwies. Die zur Identifizierung und Quantifizierung herangezogenen Retentionszeiten, UV-Maxima und Fragmentierungsmuster sind für alle Substanzen in **Tab. 4** zusammengefaßt.

Tab. 4: Retentionszeiten, UV-Maxima und Fragmentierungsmuster von CTC und Metabolite

Substanz	R <sub>t</sub> [min]	UV-Maxima [nm]	Fragmentierungsmuster (MS/MS-Detektion)				
			Precursor-Ion [m/z]	Produkt-Ionen [m/z]			
				Peakintensitäten [%]			
CTC	9,9	275 370	479	<b>462</b>	<b>444</b>	<b>371</b>	<b>154</b>
				60	100	13	48
			481	<b>464</b>	<b>446</b>	--	--
				47	100	--	--
e-CTC	8,2	275 370	479	<b>462</b>	<b>444</b>	<b>371</b>	<b>154</b>
				63	100	2	7
			481	<b>446</b>	<b>464</b>	--	--
				52	100	--	--
iso-CTC	7,4	275	479	<b>462</b>	<b>371</b>	<b>197</b>	<b>154</b>
				100	--	2	4
			481	<b>464</b>	--	--	--
				100	--	--	--
e-iso-CTC	6,2	275	479	<b>462</b>	<b>371</b>	<b>197</b>	<b>154</b>
				100	--	4	2
			481	<b>464</b>	--	--	--
				100	--	--	--
Anhydro-CTC	18,5	275	461	<b>444</b>	<b>154</b>	<b>98</b>	
				100	55	3	
			463	<b>446</b>	--	--	
				100	--	--	
e-Anhydro-CTC	16,7	275	461	<b>444</b>	<b>154</b>	<b>98</b>	
				100	5	4	
			463	<b>446</b>	--	--	
				100	--	--	

Die dargestellten Fragmentierungsmuster der jeweiligen Epimere lassen erkennen, daß jeweils beide Substanzen zwar dieselben Produkt-Ionen bilden, sich aber in ihrem Intensitätsverhältnis unterscheiden, was zur Identifizierung der beiden Epimere genutzt werden kann. Von den in **Tab. 4** dargestellten Substanzen werden nachfolgend CTC und e-CTC quantifiziert, alle übrigen Verbindungen vorerst nur qualitativ bestimmt.

### 5.2.1.3 Stabilität von CTC und e-CTC in Lösung

Bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren werden häufig keine genauen Angaben darüber ge-

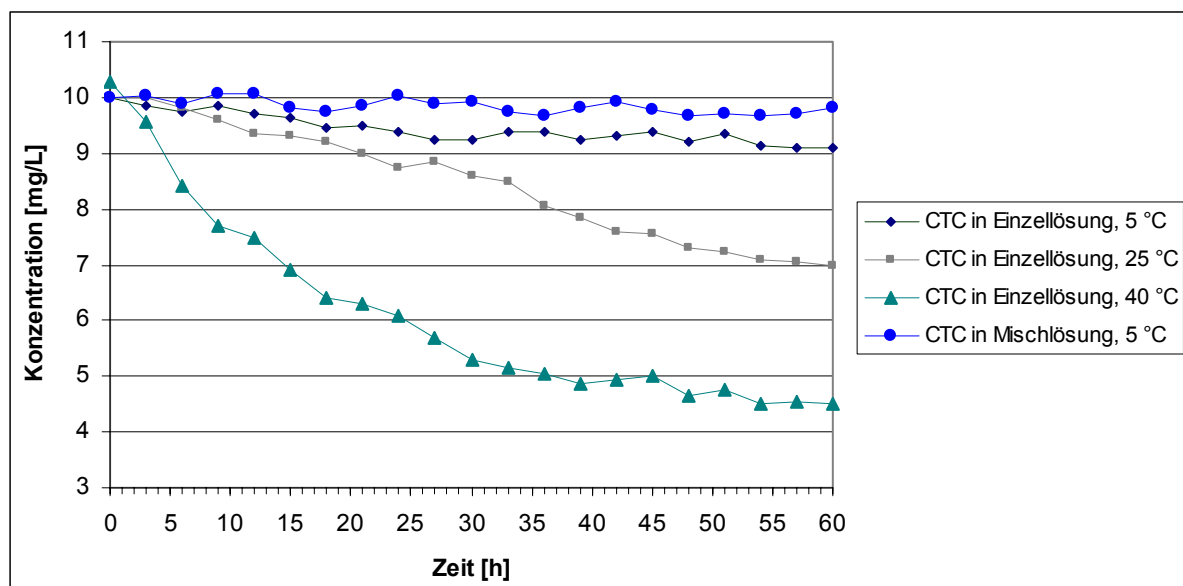
macht, wie die Kalibrierung durchgeführt wurde, vor allem fehlen Angaben über die Bildung möglicher Abbau- und Umwandlungsprodukte in Kalibrierlösungen. Insbesondere ist in wäßrigen Lösungen bei schwach saurem pH-Wert mit einer Epimerisierung zu rechnen. Ziel war es daher, nach Auswahl des Lösungsmittels die Stabilität der Analyten in Lösung im Hinblick auf die Kalibrierung zu überprüfen. Es wurden die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen durchgeführt:

- Untersuchung der Epimerisierung von CTC in Lösung bei verschiedenen Temperaturen
- Vergleich der Stabilität von CTC in Einzelstandardlösung mit der von CTC in Mischstandardlösung zusammen mit e-CTC
- Langzeitstabilität von CTC und e-CTC in Kalibrierlösung

Zunächst galt es, das optimale Lösungsmittel zur Herstellung der Kalibrierlösungen für CTC und e-CTC auszuwählen. Dabei zu berücksichtigen waren die Löslichkeit der Analyten, die chromatographischen Bedingungen im Hinblick auf die Peakform sowie die Stabilität der Substanzen in dem gewählten Lösungsmittel. Als Lösungsmittel erwies sich MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) (Fließmittel A:  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCOOH}$  (10 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  (v/v), 0,5 %  $\text{HCOOH}$ , (v/v)) als geeignet. Aufgrund einer möglichen Epimerisierung bei diesem pH-Wert wurde vermutet, daß bei Einsatz von Einzelstandardlösungen die Gefahr der Epimerisierung besteht und somit undefinierte Mengen an CTC und e-CTC in den jeweiligen Kalibrierlösungen vorliegen. Neben der Untersuchung der Stabilität sollte daher auch bewußt eine Epimerisierung herbeigeführt werden, um das Massenverhältnis von CTC und e-CTC zu ermitteln, bei dem sich keine Konzentrationsänderung von CTC und e-CTC ergibt. Ziel war es, Mischstandardlösungen herzustellen, da CTC und e-CTC in Mischstandardlösungen im Vergleich zu Einzelstandardlösungen eine höhere Stabilität aufweisen sollten. In Mischstandardlösungen sollten beide Verbindungen ein deutlich geringeres Bestreben ausweisen, zu epimerisieren, da sie sich näher am Gleichgewichtszustand befinden. Daher wurde zunächst die Stabilität von CTC in diesem Lösungsmittelgemisch bei Temperaturen von 5 °C, 25 °C und 40 °C untersucht. In **Abb. 15** ist der Konzentrationsverlauf von CTC bei den verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 60 h dargestellt. In Einzelstandardlösungen zeigt CTC bei allen Temperaturen unter Zugrundelegung der Wiederholpräzision [244] nach 60 h eine signifikante Konzentrationsabnahme. Während bei einer Temperatur von 5 °C CTC über einen Zeitraum von 24 h stabil ist, ist bereits bei einer Temperatur von 25 °C eine wesentlich höhere Konzentrationsabnahme über einen Zeitraum von 60 h zu beobachten. Bei einer Temperatur von 25 °C sind CTC-Lösungen nur 12 h stabil, bei 40 °C kommt es schon nach 3 h zu Umwandlungsreaktionen.

Das Massenverhältnis von CTC und e-CTC, bei dem sich keine Konzentrationsänderung mehr ergibt, wurde bei einer Temperatur von 40 °C zu 1:1 ermittelt. Erst bei dieser Lagerungstemperatur nimmt die CTC-Ausgangskonzentration exponentiell ab und nach einem Zeitraum von 50 h ergab sich bei einer Konzentrationsabnahme von etwa 50 % keine Konzentrationsänderung. Neben der erwarteten Epimerisierung sind allerdings bei dieser Temperatur noch weitere Umwandlungsreaktionen aufgetreten (siehe **Kap. 5.6.1**). Aus diesem Grund und wegen der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten konnte der Gleichgewichtszustand bei einer Temperatur von 5-25 °C, entsprechend der Arbeitsbedingungen, nur vermutet werden. In der Literatur wird das Ausmaß der Epimerisierung bei einem pH-Wert von 3,2 zu 55 % angegeben [138, 139, 140], so daß in guter Übereinstimmung das Gleichgewicht unter diesen Bedingungen bei einer Epimerisierungsrate von 50 % angenommen wurde.

Nachfolgend wurde die Stabilität von CTC in einer Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) über einen Zeitraum von 60 h untersucht und mit der Stabilität von CTC in der Einzelstandardlösung verglichen. In Mischstandardlösungen aus CTC und e-CTC im Massenverhältnis 1:1 zeigt CTC bei einer Temperatur von 5 °C keine Konzentrationsabnahme, entsprechend dem in **Abb. 15** dargestellten obersten Kurvenverlauf. Die Stabilitätsuntersuchungen in diesem Lösungsmittel belegen die Vermutung, daß CTC und e-CTC in Mischstandardlösungen im Massenverhältnis 1:1 stabiler sind als in den entsprechenden Einzelstandardlösungen. Die Kalibrierung wird daher mit einer Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) im Massenverhältnis 1:1 durchgeführt.



*Abb. 15: Änderung der Konzentration von CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) als Funktion von Temperatur und Zeit ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) (CTC in Mischlösung: CTC: e-CTC = 1:1 (w/w)) (370 nm)*

Im Hinblick auf die Lagerung von Kalibrierlösungen wurde abschließend die Langzeitstabilität von CTC und e-CTC in Mischstandardlösungen in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) im Massenverhältnis 1:1 bei einer Lagerung von -80 °C und Konzentrationen von 1 und 10 mg/L über einen Zeitraum von sechs Monaten untersucht. Zum Vergleich wurden entsprechende Langzeitstabilitätsuntersuchungen mit CTC und e-CTC in Einzelstandardlösungen durchgeführt. Die für diese Untersuchungen hergestellten Lösungen wurden aliquotiert, bei -80 °C eingefroren, und in Zeitabständen von zwei Wochen wurde jeweils ein Aliquot entnommen und chromatographisch vermessen. In Mischstandardlösungen erwiesen sich CTC und e-CTC mit einer maximalen Konzentrationsabnahme von 2,5 % für CTC und 2 % für e-CTC unter Zugrundelegung der für beide gültigen Wiederholpräzision (Berechnung siehe **Kap. A. 2** im Anhang) von 7,2 % über den untersuchten Zeitraum von sechs Monaten als stabil (siehe **Abb. A. 1** und **Abb. A. 2** im Anhang). Die Stabilitätsuntersuchungen von CTC und e-CTC in den Einzelstandardlösungen ergaben, daß für beide Substanzen die maximalen Konzentrationsabnahmen nach sechs Monaten mit 3 % für CTC und 3,5 % für e-CTC etwas höher lagen als bei den entsprechenden Mischstandardlösungen. Es handelt sich jedoch nicht um eine signifikante Konzentrationsabnahme, so daß CTC und e-CTC auch unter diesen Bedingungen über diesen Zeitraum als stabil zu betrachten sind.

### 5.2.2 Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung

Ziel der Probenvorbereitung war, CTC und e-CTC aus den Matrices Urin, Plasma, Faeces, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen möglichst quantitativ zu extrahieren. Da hierbei meist eine Reihe von Probenbestandteilen mitextrahiert werden, ist sowohl für die UV-Detektion als auch für die MS/MS-Detektion zur Vermeidung von Matrixeffekten eine Aufreinigung der erhaltenen Extrakte notwendig. Dazu wurde der Extraktion aus der Matrix ein Festphasenextraktionsschritt nachgeschaltet. Eine Aufkonzentrierung der Extrakte war erforderlich, um im Rahmen der durchgeführten Medikationsstudien das Ausscheidungsverhalten von CTC und e-CTC in Urin und Faeces so weit wie möglich verfolgen zu können sowie auch geringe Gehalte in den Schlachtpuben im Hinblick auf eine mögliche Resistenzbildung nachweisen zu können. Das entwickelte Analysenverfahren schließt unter Zugrundelegung der Rückstandshöchstmengenverordnung [116] die quantitative Bestimmung von e-CTC mit ein, da eine Epimerisierung bereits während der Probenvorbereitung stattfinden kann. Daher wird bei allen nachfolgend beschriebenen Wiederfindungsversuchen, bei denen CTC zudosiert wurde, die Wiederfindung als Summe aus CTC und e-CTC angegeben. Da während der Probenvorbereitung neben einer Epimerisierung möglicherweise auch mit einer Isomerisierung zu rechnen war, wie die Stabilitätsuntersuchungen in **Kap. 5.2.1.3** gezeigt haben, war besonders auf mögliche Abbau- bzw. Umwandlungsreaktionen zu achten. Des weiteren war die hohe Tendenz zur Komplexbildung sowie in biologischen Proben eine Protein-Analyt-Bindung zu berücksichtigen.

In der Literatur wird von einigen Autoren der Einsatz eines internen Standards zur Bestimmung der Tetracycline OTC, TC und CTC in biologischen Proben beschrieben, wobei oft ein anderes Tetracyclinderivat, meist Demethylchlortetracyclin (DMCTC), als interner Standard verwendet [245, 246, 247] wird. Dies ist jedoch als kritisch zu betrachten, da sich DMCTC in seinen chemischen Eigenschaften bezüglich der Neigung zur Bildung von Metaboliten von den anderen Tetracyclinderivaten unterscheidet. DMCTC zeigt eine vergleichsweise hohe Stabilität hinsichtlich der Bildung von Epimeren und Isomeren, die während der Probenvorbereitung entstehen können. Damit verhält sich DMCTC nicht wie die anderen Tetracycline und ist daher als interner Standard ungeeignet. Darüber hinaus sollte bei der MS/MS-Detektion der interne Standard und der Analyt coeluiieren, da die Ionisation im Interface durch die Fließmittelzusammensetzung beeinflusst wird [248]. Dies ist jedoch meist nur bei isopenmarkierten Standards gegeben. Da isopenmarkierte Tetracyclin-Standardsubstanzen kommerziell nicht erhältlich sind, wurde auf den Einsatz eines internen Standards verzichtet.

Nach Extraktion der Analyten aus der zerkleinerten und homogenisierten Matrix mit McIlvain-Puffer (pH 4) erfolgte die Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Extraktes mit SPE. Das hierbei erhaltene Eluat wurde zur weiteren Aufkonzentrierung in einem sogenannten „TurboVap“ eingeeengt. Hierbei wurde das in spezielle Reagenzgläser aufgefangene Eluat in einem Wasserbad unter Stickstoff- oder Luftstrom in Abhängigkeit von der Stabilität der Analyten entfernt. Einengen im Stickstoffstrom ist nicht notwendig, da festgestellt wurde, daß die Wiederfindung sowohl bei einer Temperatur von 30 °C als auch 40 °C unabhängig von dem gewählten Gas ist und in beiden Fällen bei ca. 95 % liegt. Die Temperatur des Wasserbades darf jedoch 40 °C nicht überschreiten, um zu gewährleisten, daß keine Verluste der Analyten auftreten. Zur Aufnahme des Rückstandes nach Einengen des Eluates erwies sich eine Mischung aus MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) als geeignet.

In **Abb. 16** ist der Analysenablauf zur Bestimmung von CTC und e-CTC in biologischen Proben schematisch dargestellt.

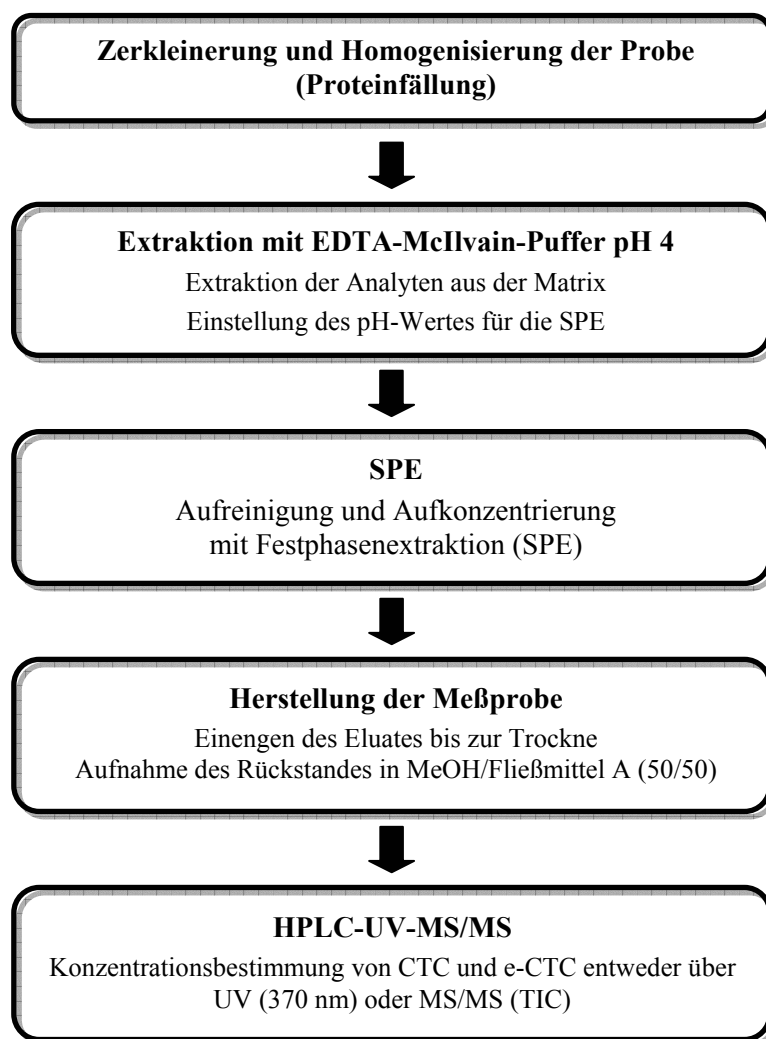


Abb. 16: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung zur Bestimmung von CTC und e-CTC in biologischen Proben

Bei der Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Auswahl des SPE-Materials ohne biologische Matrix mit dotiertem Extraktionsmittel, dem EDTA-McIlvain-Puffer
- Einfluß des pH-Wertes des Extraktionsmittels und eines EDTA-Zusatzes zum Extraktionsmittel auf die Wiederfindung
- Überprüfung der Übertragbarkeit des entwickelten Verfahrens für CTC und e-CTC auf die Bestimmung der weiteren Abbau- und Umwandlungsprodukten iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro CTC
- Ermittlung des Einflusses einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung
- Entwicklung der Probenvorbereitung für Urin, Plasma, Faeces, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen, wobei der Schwerpunkt der Methodenentwicklung auf der zur Lebensmittelgewinnung dienenden wichtigsten Matrix Muskulatur liegen sollte.

### 5.2.2.1 Auswahl des SPE-Materials

Es wurden drei verschiedene Sorbentien auf ihre Eignung zur Bestimmung von CTC und e-CTC überprüft: Chromabond Tetracycline, Oasis HLB und Nexus. Bei dem Sorbens der Chromabond Tetracyclin-Kartusche handelt es sich um eine für die Tetracyclinanalytik modifizierte C18-Umkehrphase, das Oasis HLB- und Nexus-Material basiert auf einem Copolymer. Zur Ermittlung der Wiederfindung von CTC mit diesen SPE-Materialien wurde zu 10 mL EDTA-McIlvain-Puffer (pH 4) 2 µg bzw. 20 µg CTC zudosiert und aufgearbeitet, wobei die Elution in drei Fraktionen von jeweils 2 mL erfolgte und das Endvolumen der Meßproben 200 µL betrug. Die erzielten Wiederfindungen sind in **Tab. 5** zusammengefaßt, wobei sich die Wiederfindungen auf die Summengehalte ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) beziehen.

Tab. 5: Wiederfindungen ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) mit verschiedenen SPE-Phasen (dotierter EDTA-McIlvain-Puffer pH 4, Fraktionsvolumina: 2 mL, 370 nm,  $n = 3$ )

SPE-Kartusche	stationäre Phase	Wiederfindung [%] 2 µg ( $V_{\text{End}} = 200 \mu\text{L}$ )		Wiederfindung [%] 20 µg ( $V_{\text{End}} = 200 \mu\text{L}$ )	
		1. Fraktion	2. Fraktion	3. Fraktion	$\Sigma$
Chromabond Tetracycline	C 18	75	7	0	82
		79	8	0	87
Oasis HLB	Copolymer	106	0	0	106
		103	2	0	105
Nexus	Copolymer	89	10	0	99
		87	15	0	102

Während mit dem Chromabond-Tetracycline-Material nur Wiederfindungen zwischen 82 % und 87 % erreicht wurden, konnten mit den anderen beiden Säulenmaterialien quantitative Werte um 100 % erzielt werden. Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen ergab, daß bei Einsatz der NEXUS-Kartusche ein größeres Elutionsvolumen notwendig war, so daß die Oasis-HLB-Kartusche am besten geeignet war. Ein Elutionsvolumen von 2 mL reicht bei dieser SPE-Kartusche aus, um CTC und e-CTC fast vollständig zu eluieren. Da jedoch bei der höheren Konzentration ein Restgehalt an CTC und e-CTC in der zweiten Fraktion festgestellt wurde, wurden zur Gewährleistung einer vollständigen Elution bei den weiteren Analysen 3 mL verwendet.

### 5.2.2.2 Einfluß der Zusammensetzung des Extraktionsmittels

Bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren wird zur Extraktion von Tetracyclinen aus biologischen Materialien meist McIlvain-Puffer pH 4 mit einem EDTA-Zusatz verwendet [170, 172, 180]. Systematische Untersuchungen des Einflusses vom pH-Wert und des EDTA-Zusatzes sind jedoch nicht bekannt. Da die Wiederfindung der Tetracycline einerseits aufgrund ihres amphoteren Charakters stark pH-Wert-abhängig sein sollte und andererseits wegen einer möglichen Komplexbildung auch der EDTA-Zusatz einen Einfluß ausüben könnte, wurden McIlvain-Puffer der pH-Werte 2, 3, 4, 5 und 6 ohne und mit einem EDTA-Zusatz (0,01 mol/L) hergestellt, zu 10 mL dieser Lösungen CTC zudosiert und mit SPE aufgearbeitet.



Tab. 6: SPE-Wiederfindung ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) mit der Oasis HLB-Kartusche in Abhängigkeit vom pH-Wert und EDTA-Zusatz des McIlvain-Puffers (dotierter McIlvain-Puffer, 370 nm,  $n = 3$ )

McIlvain-Puffer	CTC-Zusatz [ $\mu$ g] ( $V_{\text{End}} = 200 \mu\text{L}$ )	Wiederfindung [%]				
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
ohne EDTA	2	105	92	80	60	0
0,01 mol/L EDTA	2	110	108	101	67	30

Die in **Tab. 6** dargestellten Wiederfindungen zeigen, daß die Extraktion mit McIlvain-Puffer im pH-Bereich von 2-4 mit EDTA-Zusatz zu Wiederfindungen von etwa 100 % führten. Ohne EDTA-Zusatz zeigte sich jedoch bereits ab pH 3 eine deutlich verringerte Wiederfindung. Maximale Wiederfindungen von 110 % konnten bei der SPE-Extraktion mit McIlvain-Puffer pH 2 mit 0,01 mol/L EDTA erreicht werden.

Tetracycline liegen, entsprechend der  $pK_s$ -Werte, siehe **Kap. 3.5.1**, bei pH 2 als Kation, bei pH 5,5 als Zwitterion und bei pH 8,7 als Monoanion vor [123, 152, 179]. Eine zunehmende Deprotonierung der OH-Gruppen am C3- und C12-Atom führt offenbar zu einer Schwächung der Wechselwirkung zwischen der ionisierten Tetracycline und der unpolaren Festphase und damit zu einem geringeren Sorptionsgrad. Die Dimethylaminogruppe liegt dagegen im pH-Bereich von 2-6 weitgehend protoniert vor. Mit sinkendem pH-Wert und abnehmendem Dissoziationsgrad verschiebt sich die bevorzugte Konformation von der „extended“-Form zur „twisted“-Form. Möglicherweise trägt eine Abschirmung der positiven Ladung in der „twisted“-Konformation zu einer verstärkten Wechselwirkung zwischen Tetracyclinmolekül und unpolarer Festphase bei. Ein EDTA-Zusatz wirkt sich ebenfalls günstig auf die Wiederfindung aus. Ursächlich hierfür könnte der von JÜRGENS et al. angenommene Retentionsmechanismus sein, der auf einer Komplex- bzw. Ionenpaarbildung zwischen dem protonierten Tetracyclin und dem anionischen EDTA-Molekül beruht [174]. Es bleibt zu überprüfen, ob sich ähnliche Abhängigkeiten der Wiederfindung auch bei der Aufarbeitung von Realproben ergeben.

### 5.2.2.3 Wiederfindungsstudien mit CTC und e-CTC

Da während der Probenvorbereitung eine Epimerisierung stattfindet, wurde überprüft, ob sich das SPE-Verfahren für e-CTC ebenso wie für CTC eignet. Hierzu wurden jeweils 10 mL Puffer mit 2  $\mu$ g bzw. 20  $\mu$ g CTC oder e-CTC dotiert, diese Lösungen mit SPE aufgearbeitet und die Konzentrationen der zudotierten Substanz und dem jeweiligen Epimeren ermittelt. Die hierbei erhaltenen Wiederfindungen sind in **Tab. 7** dargestellt.

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß sich sowohl CTC als auch e-CTC mit diesem SPE-Verfahren quantitativ extrahieren lassen. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Epimers wurden Wiederfindungen zwischen 97 % und 104 % ermittelt. Neben einer Epimerisierung konnten keine weiteren Abbau- und Umwandlungsreaktionen festgestellt werden. Die Epimerisierungsraten sind unabhängig von der zugesetzten Konzentration und liegen für CTC bei durchschnittlich 17 % und für e-CTC bei 20 %, wobei sich die Epimerisierungsrate als Quotient aus dem Gehalt von dem jeweiligen Epimeren und der Summe von Muttersubstanz und Epimer ergab.

Tab. 7: Wiederfindung von CTC und e-CTC nach der SPE-Aufarbeitung von dotierten EDTA-McIlvain-Puffern (Oasis HLB, McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA, 370 nm,  $n = 6$ )

dotierte Substanz	Wiederfindung [%] Zusatz: 2 µg, $V_{\text{End}} = 200 \mu\text{L}$			Wiederfindung [%] Zusatz: 20 µg, $V_{\text{End}} = 200 \mu\text{L}$		
	CTC	e-CTC	$\Sigma$ (CTC+e-CTC)	CTC	e-CTC	$\Sigma$ (CTC+e-CTC)
CTC	83	16	99	80	17	97
e-CTC	e-CTC	CTC	$\Sigma$ (e-CTC+CTC)	e-CTC	CTC	$\Sigma$ (e-CTC+CTC)
	81	23	104	80	18	98

#### 5.2.2.4 Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung

Um zu überprüfen, in welchem Schritt der Probenvorbereitung die Epimerisierung stattfindet, wurden einzelne Schritte der Probenvorbereitung simuliert und in den hierbei erhaltenen Proben der Gehalt der zudosierten Substanz und dem entsprechenden Epimeren ermittelt. Aus diesen Gehalten wurden anschließend die Epimerisierungsraten berechnet. Die Untersuchungen erfolgten sowohl für CTC als auch für e-CTC. Die einzelnen Versuchsbedingungen und die ermittelten Epimerisierungsraten sind in **Tab. 8** zusammengestellt.

Tab. 8: Epimerisierung von CTC und e-CTC unter verschiedenen simulierten Extraktions- und SPE-Bedingungen (Oasis HLB, 370 nm,  $n = 4$ )

Simulierter Schritt der Probenvorbereitung		Versuch	Epimerisierung [%]	
			CTC	e-CTC
1	Extraktion aus der Matrix	10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 + 20 µg Substanz, 2 h Stehenlassen bei RT	8	12
2	SPE	10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 + 20 µg Substanz, SPE, Verdünnung des Eluates mit 3 mL Fließmittel A	5	8
3	Weiterverarbeitung des Eluates	3 mL MeOH + 2 µg Substanz, Einengen des Eluates durch Lyophilisierung, Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	~ 0	~ 0
4	Weiterverarbeitung des Eluates	3 mL MeOH + 2 µg Substanz, Einengen im TurboVap (30 °C) (Dauer: 30 min), Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	10	8
5	Weiterverarbeitung des Eluates	3 mL MeOH + 2 µg Substanz, Einengen im TurboVap (40 °C) (Dauer: 20 min), Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	10	8
6	SPE + Weiterverarbeitung des Eluates	10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 + 2 µg Substanz, SPE, Einengen des Eluates durch Lyophilisierung, Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	5	6
7	SPE + Weiterverarbeitung des Eluates	10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 + 2 µg Substanz, SPE, Einengen des Eluates im TurboVap (30 °C), Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	12	13

Die Ergebnisse des ersten Versuches zeigen, daß eine Epimerisierung besonders durch die Einwirkung des schwach sauren McIlvain-Puffers bei der Extraktion aus der Matrix begünstigt wird, da alleine das Stehenlassen eines dotierten McIlvain-Puffers über einen Zeitraum von 2 h eine Epimerisierung von 8 % für CTC und 12 % für e-CTC verursacht. Ein Vergleich des ersten Versuches mit dem zweiten Versuch zeigt, daß offensichtlich die Dauer der Puffer-Einwirkung eine große Rolle spielt. Die Durchführung der SPE im zweiten Versuch, bei der McIlvain-Puffer dotiert und sofort weiterverarbeitet wurde, führt zwar bereits zu einer Epimerisierung, die Werte liegen jedoch mit 5 % für CTC und 8 % für e-CTC niedriger als die ermittelten Epimerisierungen des ersten Versuches.

Die Simulation der Weiterverarbeitung des Eluates in den Versuchen 3-5 ergab, daß eine Epimerisierung nur durch Lyophilisierung des Eluates vermieden werden kann. Ein Einengen im TurboVap unter erhöhter Temperatureinwirkung führt unabhängig von der Temperatur (30°C, 40 °C) zu einer Epimerisierung von 8 % bis 10 %. Der fünfte und sechste Versuch umfaßt sowohl die SPE als auch die Weiterverarbeitung des Eluates. Die Ergebnisse dieser Versuche verdeutlichen, daß die Epimerisierung während der Probenvorbereitung dadurch minimiert werden kann, indem die Weiterverarbeitung des Eluates durch Lyophilisierung anstatt durch Eineengen im TurboVap erfolgt.

Insgesamt kann gesagt werden, daß eine Epimerisierung vor allem durch die Extraktion mit dem schwach sauren McIlvain-Puffer (pH 4) verursacht wird. Die Durchführung der SPE ohne einen weiteren Aufkonzentrierungsschritt führt daher bereits zu einer Epimerisierung. Erfolgt die Weiterverarbeitung des Eluates durch Einengen im TurboVap, so erhöht sich die Epimerisierungsrate nochmals. Daher kann eine Epimerisierung während der Probenvorbereitung nicht vollständig vermieden werden. Dies bestätigt die Notwendigkeit, den CTC-Gehalt als Summe von CTC und e-CTC zu ermitteln. Weiterhin zeigt ein Vergleich der Epimerisierungsraten von CTC und e-CTC in den durchgeführten Versuchen, daß sich beide Verbindungen weitgehend identisch verhalten.

### 5.2.2.5 Urin, Plasma und Faeces

#### Urin

In der Literatur werden verschiedene Verfahren für die Bestimmung von Tetracyclinen in *Urin* beschrieben, wobei die Urinproben entweder direkt ohne Aufarbeitung zur HPLC-Analyse eingesetzt werden, eine Aufreinigung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Festphasenextraktion erfolgt oder Säulenschaltssysteme verwendet werden [249-252, 257]. Bei der Aufarbeitung von Urin mit Festphasenextraktion wird als Festphasenmaterial meist eine herkömmliche C18-Phase eingesetzt.

Das für Urin entwickelte eigene Extraktionsverfahren umfaßt eine pH-Wert-Einstellung der Probe und eine Festphasenextraktion mit der Oasis HLB-Kartusche, welches als Sorbens ein Copolymer enthält. Zu 5 mL Urin werden zur Einstellung des pH-Wertes 5 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 gegeben und mittels SPE weiter aufgearbeitet. Wiederfindungsversuche mit Urinproben, die auf Gehalte von 10 µg/L und 100 µg/L dotiert wurden, haben gezeigt, daß mit diesem Extraktionsverfahren durchschnittliche Wiederfindungen von 97 % für CTC mittels LC-MS/MS erzielt werden. Eine Quantifizierung von CTC und e-CTC mit UV-Detektion ist aufgrund der geringen Spezifität der UV-Absorption nicht möglich, da der CTC- und e-CTC-Peak von Peaks anderer störender Substanzen überlagert wird.

#### Plasma

Bei der Bestimmung von Tetracyclinen in *Plasma* ist vor allem die Protein-Analyt-Bindung zu berücksichtigen. Plasma-Proteine können durch unspezifische Bindung an der stationären Phase oder

durch organische Lösungsmittel hervorgerufene Ausfällungen zu Störungen sowohl bei der Probenvorbereitung als auch bei der chromatographischen Bestimmung führen. Daher war nach **Gewinnung des Plasmas** vor der weiteren Aufarbeitung zunächst eine **Abtrennung der Proteine** notwendig. Nachteil einer Proteinfällung ist jedoch, daß möglicherweise auch Analyten mit den Proteinen ausgefällt werden.

Die **Gewinnung des Plasmas** erfolgt durch Abzentrifugieren des Vollblutes. Plasma ist dabei der annähernd zellfreie Überstand des zentrifugierten Vollblutes, dessen Gerinnungsfähigkeit sofort bei der Blutentnahme durch Zusätze von  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  oder Li-Heparin gehemmt wird [253]. Heparin verhindert die Blutgerinnung, indem es die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin und damit dessen Wirkung auf Fibrinogen sowie die Aggregation der Thrombozyten hemmt. EDTA komplexiert die an der Bildung des Thrombins beteiligten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und verhindert so die Koagulation des Blutes [254]. Bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren [152, 258, 259, 262] wird in den meisten Fällen nicht angegeben, wie die Plasmaproben gewonnen wurden und welches Antikoagulantium eingesetzt wurde. EDTA sollte besser geeignet sein, da es mit Komplexbildungskonstanten in Abhängigkeit vom Zentralatom zwischen  $K = 10^{8,7}$  und  $K = 10^{10,7}$  [255] die im Plasma vorhanden Metallkationen abfängt und damit eine Komplexierung der Tetracycline, deren Komplexbildungskonstanten mit Werten zwischen  $K = 10^{5,8}$  bis  $K = 10^{9,4}$  [130, 131] für das jeweilige Zentralatom niedriger liegen, verhindert. Das in den nachfolgenden Versuchen eingesetzte Plasma stammte aus der Medikationsstudie im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse und wurde aus den genannten Gründen aus EDTA-Vollblut gewonnen.

Zur **Abtrennung der Proteine** gibt es verschiedene Möglichkeiten. Durch Erhitzen oder Einwirkung von Säuren, Laugen oder hohen Salzlasten lassen sich Proteine ausfällen. Denaturierende Agentien wie starke Säuren, z.B. Perchlorsäure und Metaphosphorsäure, oder saure Pufferlösungen, die häufig zur Entfernung von Proteinen aus biologischen Proben eingesetzt werden, führen zu einer irreversiblen Ausfällung der Proteine. Durch Anlagerung von Protonen an das Protein bildet sich ein Polykation, wodurch es zu starken intramolekularen Abstoßungen kommt und die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine verloren gehen. Das Säureanion lagert sich zusätzlich an das Protein, so daß ein unlösliches, nach außen neutrales, Salz entsteht und die Proteine vollständig ausfallen. Schonendere Ausflockungen ohne Denaturierung werden durch Alkohole, Acetonitril und Ammoniumsalze erreicht. Bei diesen Ausfällungen erfolgt eine Schwächung der Hydrathülle der Proteine, die zu einer Herabsetzung der Löslichkeit führt [54, 256]. Während bei einigen Literaturverfahren zur Bestimmung von Tetracyclinen in Plasma auf eine Proteinabtrennung vollständig verzichtet [257-259] wird, verwenden andere Autoren zur Proteinfällung saure Pufferlösungen [260-263], Ammoniumsalze [264] oder Acetonitril [265-268]. Bei der Entscheidung, welches Reagenz zur Proteinfällung eingesetzt wird, ist die Stabilität in dem jeweiligen Fällungsreagenz zu berücksichtigen.

Um zu überprüfen, welches Fällungsreagenz sich für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Plasma am besten eignet, wurden als Fällungsreagenzien Acetonitril, Methanol, 6%  $\text{HClO}_4$  (w/w) sowie eine Mischung aus Perchlorsäure und Metaphosphorsäure, 6%  $\text{HClO}_4$  (w/w)/2%  $\text{HPO}_3$  (w/w), eingesetzt. Anhand der SPE-Aufarbeitung von dotierten Acetonitril- bzw. Methanol-McIlvain-Puffer-Gemischen wurde zunächst nachgewiesen, daß der organische Anteil im McIlvain-Puffer 25 % nicht überschreiten darf, damit die Analyten vollständig auf der SPE-Phase retardieren. Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte, indem zu 5 mL mit CTC dotiertem Plasma 5 mL Fällungsreagenz gegeben, die Proben geschüttelt, die ausgefällten Proteine abzentrifugiert und zum Überstand zur pH-Wert-Einstellung

EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 gegeben wurde. Der so erhaltene Extrakt wurde durch SPE mit Oasis HLB aufgereinigt. Die mit den unterschiedlichen Fällungsreagenzien erhaltenen Wiederfindungen sind in **Tab. 9** dargestellt.

*Tab. 9: Wiederfindung ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Plasma nach Proteinabtrennung durch verschiedene Fällungsreagenzien und anschließender SPE mit Oasis HLB ( $\beta = 400 \mu\text{g CTC/L Plasma}$ ,  $370 \text{ nm}$ ,  $n = 4$ )*

Fällungsreagenz	CH <sub>3</sub> CN	MeOH	6% HClO <sub>4</sub> (w/w) / 2% HPO <sub>3</sub> (w/w)	6% HClO <sub>4</sub> (w/w)
Wiederfindung [%]	46	51	61	68

Die mit den untersuchten Fällungsreagenzien erzielten Wiederfindungen lagen für Acetonitril bei 46 % und für Methanol bei 51 %. Die höchsten Wiederfindungen wurden mit 6 % HClO<sub>4</sub> als Fällungsreagenz erzielt und lagen mit 68 % etwas höher als die mit der Mischung aus 6 % HClO<sub>4</sub>/2 % HPO<sub>3</sub> erhaltenen Werte. Eine Säurefällung der Proteine ist damit günstiger als die schonende Ausflockung mit organischen Lösungsmitteln. Da CTC zwischen 45 % und 60 % an Plasma-Proteine gebunden wird, siehe **Kap. 3.3**, und die Wiederfindung von CTC nach Säurefällung zwischen 61 % und 68 % liegt, wird durch den Zusatz von Säure die Bindung der Tetracycline an den Proteinen zumindest teilweise gelöst. Es kann jedoch nicht beurteilt werden, ob der Säurezusatz eine bessere Lösung der Tetracyclin-Protein-Bindung als der Zusatz organischer Lösungsmittel bewirkt oder die Bedingungen bei der nachfolgenden Festphasenextraktion im Falle der Säurefällung bei der Plasmaaufarbeitung günstiger ist. Als optimales Fällungsreagenz zur Proteinabtrennung hat sich damit 6 % HClO<sub>4</sub> ergeben. Mit diesem Verfahren ist eine Quantifizierung von CTC und e-CTC in Plasma sowohl mit HPLC-UV als auch mit LC-MS/MS möglich.

### Faeces

Es gibt nur wenig Veröffentlichungen über die Bestimmung von Arzneimitteln in *Faeces* [269-271], wobei kein LC-MS/MS-Verfahren bekannt ist. SUNDERLAND et al. beispielsweise nutzen zur Bestimmung von CTC in Faeces vom Schwein die HPLC-UV [272]. Daneben wird die Quantifizierung von Tetracyclinen in Gülle bzw. güllegedüngten Böden beschrieben [273-277]. Diese Verfahren zur Probenvorbereitung umfassen die Extraktion der Gülleproben mit Citrat-Puffer und zur Aufreinigung die Flüssig-Flüssig-Extraktion. Die chromatographische Bestimmung erfolgt meist durch LC-MS/MS.

Bei dem eigenen entwickelten Verfahren erfolgt die Extraktion der Analyten, indem zu 0,5 g Faeces 10 mL McIlvain-Puffer zugegeben wurde. Anschließend wurden die Proben geschüttelt und zentrifugiert. Nach weiteren zwei Extraktionsschritten wurden die vereinigten Überstände mittels SPE mit Oasis HLB aufgereinigt. Da die ermittelten Konzentrationen von CTC in Faeces sehr hoch waren, erfolgte keine weitere Aufkonzentrierung, sondern das bei der SPE erhaltene Eluat wurde mit Fließmittel A im Verhältnis 1:2 verdünnt. Auf diese Art und Weise wurden Meßproben mit sehr geringen Matrixanteilen erhalten. Daher war eine Auswertung der Chromatogramme sowohl mittels UV- als auch MS/MS-Detektion möglich.

Zur Ermittlung eines geeigneten Extraktionsmittels wurde überprüft, ob die für Standardlösungen festgestellte Abhängigkeit der Wiederfindung vom pH-Wert des Extraktionsmittels, siehe **Kap. 5.2.2.2**,

auch bei Realproben auftritt, wurden EDTA-McIlvain-Puffer verschiedener pH-Werte als Extraktionsmittel auf ihre Eignung zur Extraktion von CTC und e-CTC aus Faeces untersucht. Analog **Kap. 5.2.2.2** wurde zusätzlich der Einfluß der EDTA-Konzentration im Extraktionsmittel auf die Wiederfindung bei der Bestimmung von CTC in Faeces überprüft. Dazu wurde Faeces (Nullprobe) aus der Medikationsstudie an der FAL Braunschweig, in denen kein CTC nachweisbar war, mit einer CTC-Lösung dotiert, mit dem jeweiligen Extraktionsmittel extrahiert und mittels SPE mit Oasis HLB aufgereinigt.

Tab. 10: Wiederfindung von ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Faeces nach Extraktion mit McIlvain-Puffer unterschiedlicher pH-Werte und anschließender SPE mit Oasis HLB ( $\beta = 500$  mg/kg Faeces, 370 nm,  $n = 4$ )

	McIlvain-Puffer			
	pH 2 0,01 mol/L EDTA	pH 3 0,01 mol/L EDTA	pH 4 0,01 mol/L EDTA	pH 4 0,1 mol/L EDTA
<b>Wiederfindung [%]</b>	85	83	88	92

Die in **Tab. 10** aufgeführten Wiederfindungen zeigen, daß sich als optimales Extraktionsmittel für Faeces der EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 mit einer EDTA Konzentration von 0,1 mol/L ergab.

#### 5.2.2.6 Muskulatur, Leber und Niere

Die Matrices *Muskulatur*, *Leber* und *Niere* werden in der Literatur meist zu *Gewebe* zusammengefaßt, da die Aufarbeitung dieser Matrices auf gleiche Art und Weise erfolgt. Bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren wird zur Extraktion von Gewebeproben entweder McIlvain-Puffer, pH 4 mit einem Zusatz von EDTA (0,1 mol/L) [173, 210, 221, 239], Glycin-HCl-Puffer [210], Succinat-Puffer [278, 279] oder Oxalsäure [176] als Extraktionsmittel eingesetzt. Einige Autoren verwenden zur Extraktion von Gewebeproben auch Pufferlösungen mit niedrigeren pH-Werten von 2-3 und einem geringeren oder gar keinem EDTA-Zusatz [280, 281]. Das von OKA et al. mehrfach beschriebene Extraktionsverfahren beinhaltet eine Extraktion mit McIlvain-Puffer, pH 4 und 0,1 mol/L EDTA [170, 172, 180, 221, 282, 283]. Von einigen Autoren wird außerdem ein Gemisch aus MeOH und McIlvain-Puffer pH 4 zur Extraktion eingesetzt [245, 284].

Zur Wahl des Extraktionsmittels wurde analog zum vorherigen Kapitel überprüft, ob es eine Abhängigkeit der Wiederfindung vom pH-Wert des McIlvain-Puffers gibt und ob die EDTA-Konzentration im Extraktionsmittel die Wiederfindung bei der Bestimmung von CTC in Gewebeproben beeinflusst. Zusätzlich wurden Mischungen aus Methanol und McIlvain-Puffer, MeOH/EDTA-McIlvain-Puffer (0,01 mol/L) (20/80, v/v), eingesetzt. Diese Wiederfindungsversuche erfolgten durch zweimalige Extraktion von 5 g CTC-dotiertem Probenmaterial (Muskulatur, Leber oder Niere) mit 15 mL des jeweiligen Extraktionsmittels und Homogenisierung der Proben mit einem Ultra-Turrax. Die erhaltenen vereinigten Überstände wurden mittels SPE mit Oasis HLB aufgereinigt. Die hierbei erzielten Wiederfindungen sind in **Tab. 11** dargestellt.

Tab. 11: Wiederfindung ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Leber, Niere und Muskulatur nach Extraktion mit unterschiedlichen McIlvain-Puffer-Gemischen und anschließender SPE mit Oasis HLB ( $\beta = 400 \mu\text{g CTC/kg Matrix}$ , LC-MS/MS,  $n = 4$ )

Extraktionsmittel			Wiederfindung [%]		
Puffer-Gemisch	pH-Wert	EDTA-Zusatz [mol/L]	Muskulatur	Leber	Niere
McIlvain-Puffer	2	0,01	32	13	35
McIlvain-Puffer	3	0,01	45	26	55
McIlvain-Puffer	4	---	49	33	64
McIlvain-Puffer	4	0,01	51	35	64
McIlvain-Puffer	4	0,1	55	43	72
MeOH/McIlvain-Puffer (20/80, v/v)	2	0,01	43	18	35
MeOH/McIlvain-Puffer (20/80, v/v)	3	0,01	57	27	43
MeOH/McIlvain-Puffer (20/80, v/v)	4	0,01	86	39	68

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß mit steigender EDTA-Konzentration im McIlvain-Puffer die Wiederfindung geringfügig steigt. Einen wesentlich höheren Einfluß hat der pH-Wert des Extraktionsmittels. Mit steigendem pH-Wert wurden deutlich höhere Wiederfindungen erzielt. Die entsprechenden Untersuchungen mit dotierten McIlvain-Puffern verschiedener pH-Werte, siehe **Kap. 5.2.2.2**, führte dagegen zu genau gegenteiligen Ergebnissen. Mit steigendem pH-Wert wurde eine Erniedrigung der Wiederfindung festgestellt. Als Ursache der sinkenden Wiederfindungen von CTC mit steigendem pH-Wert nach Extraktion dotierter McIlvain-Puffer wurde eine zunehmende Dissoziation und dadurch bedingte Konformationsänderung angenommen. Faktoren, die die Wiederfindung bei der Aufarbeitung von Matrixproben beeinflussen, sind sicherlich Proteine, Fette und Metallkationen. Denkbar ist, daß Matrixkomponenten die Konformation der Tetracycline beeinflussen. Darüber hinaus könnte es möglich sein, daß mit steigendem pH-Wert die Komplexbildungsfähigkeit von EDTA zunimmt und damit die in den Proben vorhandenen Metallkationen besser abgefangen werden, denn EDTA komplexiert am besten bei pH 10 [255].

Die Extraktion mit Methanol-McIlvain-Puffer-Gemischen führte für Leber und Niere im Vergleich zu den reinen McIlvain-Puffern zu keiner Verbesserung der Wiederfindung. Als optimales Extraktionsmittel ergab sich damit für Leber und Niere mit Wiederfindungen von 43 % und 72 % der McIlvain-Puffer, pH 4 mit einer EDTA-Konzentration von 0,1 mol/L. Für Muskulatur wirkt sich ein Methanol-Anteil im McIlvain-Puffer günstig auf die Extraktion aus. Es konnten mit dem Methanol-McIlvain-Puffer-Gemisch maximale Wiederfindungen von 86 % erzielt werden. Damit ergab sich für die Aufarbeitung von Muskulatur als optimales Extraktionsmittel MeOH/EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 (0,01 mol/L) (20/80, v/v). Der Einsatz dieses Extraktionsmittels hat gegenüber den Literaturverfahren, die Methanol-McIlvain-Puffer-Gemische zur Extraktion einsetzen, den Vorteil, daß keine zusätzliche wäßrige Verdünnung des Extraktes für die SPE erforderlich ist. In der Literatur beschriebenen Verfahren [245, 284] setzen Methanol im Überschuß ein, so daß dieses vor der Festphasenextraktion erst

wieder entfernt werden muß. Allerdings darf der Methanol-Anteil im McIlvain-Puffer 25 % nicht überschreiten, um eine vollständige Retardation der Analyten auf der SPE-Phase zu gewährleisten.

Um zu klären, ob die Ursache für die niedrige Wiederfindung für Leber an einer mangelnden Extraktionsausbeute oder einer starken Signal-Suppression bei der ESI-MS/MS-Detektion liegt, wurden nicht belastete Leberproben aufgearbeitet und der Endextrakt mit CTC-Standardlösungen auf einen Gehalt von 20 µg/kg, 100 µg/kg und 800 µg/kg dotiert, analysiert und mit den entsprechenden wäßrigen Standardlösungen verglichen. Bei allen Gehalten konnte eine starke Signal-Suppression von 50 % bis 60 % festgestellt werden, was beweist, daß die tatsächliche Extraktionsausbeute fast bei 100 % liegt und die Extraktion von CTC und e-CTC aus der Probe somit fast quantitativ erfolgt. Auf eine weitere Optimierung des Verfahrens für Leber zur Reduktion der Matrixeffekte wurde in diesem Rahmen verzichtet.

Mit der UV-Detektion ist zwar eine Quantifizierung von CTC in Leber und Niere möglich, aber der e-CTC-Peak ist von Peaks anderer Substanzen überlagert, somit kann eine Quantifizierung nur mit MS/MS erfolgen. In Muskulatur können CTC und e-CTC sowohl mit den durch UV-Detektion als auch MS/MS-Detektion erhaltenen Daten quantifiziert werden.

#### 5.2.2.7 Optimierung der Probenvorbereitung für Muskulatur

Für die zur Lebensmittelgewinnung dienende wichtigste Matrix Muskulatur wurde das Extraktionsverfahren weiter optimiert.

##### Extraktion

Einige Autoren wie OKA et al. führen bei der Aufarbeitung von Gewebeproben drei Extraktionsschritte mit McIlvain-Puffer, pH 4 durch [221]. Andere gebräuchliche Verfahren für die Bestimmung von Tetracyclinen in Muskulatur beschränken sich auf zwei Schritte. Zur Untersuchung, wie viele Extraktionsschritte notwendig sind, um CTC und e-CTC quantitativ aus der Matrix herauszuextrahieren, wurden Muskulaturproben dreimal mit MeOH/EDTA-McIlvain-Puffer pH 4 (0,01 mol/L) (20/80, v/v) extrahiert und die bei den einzelnen Extraktionsschritten erhaltenen Extrakte mit SPE aufgereinigt. Diese Untersuchung wurde, da es Unterschiede zwischen dotierten Kontrollproben und gewachsenen Proben geben kann, sowohl mit dotierten unbelasteten Muskulaturproben als auch mit CTC-haltigem Probenmaterial durchgeführt. In **Tab. 12** sind die hierbei erhaltenen Wiederfindungen zusammengefaßt.

*Tab. 12: Wiederfindung ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Muskulaturproben nach mehreren Extraktionsschritten, a) dotierte Kontrollproben (400 µg/kg), b) gewachsene Proben (Extraktionsmittel: MeOH/EDTA-McIlvain-Puffer pH 4 (0,01 mol/L) (20/80, v/v), SPE, 370 nm, n = 4)*

Extraktionsschritt	Wiederfindung [%] dotierte Muskulaturproben	CTC-Gehalt [µg/kg] gewachsene Muskulaturproben
1	67	82,3
2	23	54,7
3	6	12,3

Die Ergebnisse zeigen, daß zwei Extraktionsschritte ausreichen, um 90 % der zudotierten CTC-Menge



zu erfassen. Ein weiterer Extraktionsschritt erhöht die Wiederfindung um 6 % auf 94 %. Wird bei den Ergebnissen der Extraktionen gewachsener Proben als Bezugspunkt die Summe der Gehalte der drei Extraktionsschritte als 100 % gesetzt, so werden nach zwei Extraktionsschritten bereits 92 % der Gesamt-CTC-Menge erfaßt. Ein Unterschied der Extrahierbarkeit zwischen dotierten und gewachsenen Proben konnte damit nicht festgestellt werden. Da ein dritter Extraktionsschritt die Wiederfindung nur geringfügig erhöht, wurde aufgrund der ohnehin aufwendigen Probenvorbereitung, der Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax, bei den weiteren Analysen darauf verzichtet.

## SPE

Zur Erhöhung der Selektivität des SPE-Verfahrens wurde eine Wasch-Elutions-Studie durchgeführt. Diese Studie diente dazu, den erforderlichen Methanol-Anteil für den Wasch- und Elutionsschritt zu ermitteln. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, durch einen höheren Anteil an organischem Lösungsmittel während des Waschschruttes störende Interferenzen zu entfernen. Bei der Elution ist der organische Anteil möglichst gering zu halten, damit Matrixkomponenten auf der SPE-Kartusche retardieren und selektiv der Analyt eluiert wird.

Die Durchführung der Wasch-Elutions-Studie erfolgte, indem CTC-dotierte Muskulaturproben mit MeOH/EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 (0,01 mol/L) (20/80, v/v) extrahiert und der hierbei erhaltene Extrakt auf die Oasis HLB-Kartusche aufgegeben wurde. Anschließend wurde ein erster Wasch-Elutions-Schritt mit Methanol-Wasser-Gemischen, deren Methanol-Anteil von 0 % bis 100 % stufenweise erhöht wurde, durchgeführt. Hierdurch sollte ermittelt werden, wie hoch der Methanol-Anteil in der Waschlösung sein darf, damit die Analyten noch vollständig auf der Kartusche retardieren und wie hoch der Methanol-Anteil im Elutionsmittel sein muß, um die Analyten vollständig zu eluieren. Im Anschluß daran folgte ein zweiter Elutionsschritt mit reinem Methanol. Diese methanolischen Extrakte wurden mit HPLC-UV vermessen. Die hierbei erhaltenen Wiederfindungen sind in **Tab. 13** dargestellt.

*Tab. 13: Wiederfindung ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Muskulatur nach der Festphasenextraktion mit unterschiedlichen Wasch-Elutions-Lösungen ( $\beta = 400 \mu\text{g CTC/kg}$ , 370 nm,  $n = 4$ )*

Anteil an Methanol in der Wasch-Elutions-Lösung (v/v) [%]	Wiederfindung [%]
0	76
5	74
10	79
20	83
30	86
40	58
50	19
60	14
70	7
80	5
90	3
100	2

Die Ergebnisse zeigen, daß mit steigendem Methanol-Anteil in der Waschlösung von 0 % bis 30 % eine Erhöhung der Wiederfindung erreicht werden konnte. Ein höherer Methanol-Anteil führt jedoch zu einer deutlichen Verringerung der Wiederfindung. Der Einsatz von reinem Methanol als Waschlösung zeigte mit 2 % nachweisbaren Analyten im zweiten methanolischen Eluat, daß sich CTC und e-CTC schwer von der SPE-Kartusche eluieren lassen, so daß als Elutionsmittel 100 % Methanol beibehalten wurde.

#### 5.2.2.8 Knochen

Die Bestimmung von CTC in *Knochen* ist schwierig, da Tetracycline im Knochen als Calcium-Phosphat-Komplex vorliegen, siehe auch **Kap. 5.9.2** und diese deshalb erst aufgeschlossen werden müssen. KÜHNE et al. beschreiben [344, 285, 286] zum Aufschluß der Tetracycline aus dem Knochen im wesentlichen zwei verschiedene Methoden: Die Extraktion der Analyten erfolgt entweder mit Succinat-Puffer oder mit Salzsäure. Die anschließende Aufarbeitung der Extrakte ist in beiden Fällen gleich und umfaßt eine zweifache Aufreinigung mit SPE durch eine chelatisierenden Sepharose-Säule und eine C18-Säule. Mit steigender Affinität zur Chelatbildung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Reihenfolge  $\text{OTC} < \text{TC} < \text{CTC}$  [50] wird es schwieriger, die entsprechenden Komplexe aufzuschließen. Dies ist der Grund, warum KÜHNE et al. in ihren Untersuchungen mit dem Salzsäure-Aufschluß deutlich höhere CTC-Gehalte ermittelten als mit der Extraktion mit Succinat-Puffer.

Basierend auf dem Verfahren von KÜHNE et al. und dem selbst entwickelten SPE-Verfahren wurde eine Probenvorbereitung für die Bestimmung von CTC in Knochen entwickelt. Für die nachfolgenden Versuche wurde CTC-haltiges Probenmaterial der behandelten Versuchstiere aus der Medikationsstudie im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse eingesetzt. Auf eine Bestimmung der Wiederfindung wurde verzichtet, da durch Dotieren von Knochenproben keine annähernd realen Bedingungen nachgestellt werden können. In Anlehnung an die für die anderen Matrices durchgeführten Extraktionsversuche wurde überprüft, welchen Einfluß der pH-Wert des McIlvain-Puffers auf die Extraktion ausübt. Da Tetracycline unterhalb pH 3 nicht mehr komplexieren, siehe **Kap. 3.5.2**, wurde vermutet, daß die Extraktionsausbeuten mit sinkendem pH-Wert des McIlvain-Puffers steigen. Zusätzlich wurde überprüft, ob ein höherer EDTA-Zusatz zum McIlvain-Puffer die als Komplexe eingelagerten Tetracycline aus dem Knochen verstärkt herauslöst.

Der Aufschluß der Komplexe erfolgte, indem zu 1 g zerkleinertem Knochenmaterial das Extraktionsmittel, EDTA-McIlvain-Puffer unterschiedlicher pH-Werte oder 1 mol/L Salzsäure, zugegeben wurde und die Proben über Nacht stehen gelassen wurden. Im Falle des Salzsäureextraktes wurde der pH-Wert mit 2 mol/L Natronlauge auf pH 4 eingestellt. Alle Proben wurden nach der Extraktion zentrifugiert und die erhaltenen Überstände mittels SPE mit Oasis HLB aufgereinigt. Die Ergebnisse in **Tab. 14** entsprechen denen von KÜHNE et al. und belegen, daß maximale CTC-Gehalte durch den Aufschluß mit Salzsäure gefunden werden können.

Der Einsatz von McIlvain-Puffer eignet sich nicht zum Aufschluß, da zwar mit sinkendem pH-Wert höhere CTC-Konzentrationen gefunden wurden, jedoch auch mit McIlvain-Puffer pH 2 keine vollständige Extraktion von CTC aus dem Knochen erfolgt, obwohl unterhalb von pH 3 keine Komplexbildung der Tetracycline stattfinden soll [37]. Eine Erhöhung der EDTA-Konzentration im Extraktionsmittel wirkt sich zwar günstig aus, die ermittelten Gehalte mit dem EDTA-McIlvain-Puffer pH 4 (0,1 mol/L EDTA) liegen aber dennoch deutlich unterhalb der mit dem HCl-Aufschluß erhaltenen Werte.

Damit ergab sich als optimales Extraktionsmittel 1 mol/L Salzsäure zum Aufschluß der in Knochen eingelagerten Tetracycline. In den Extrakten können CTC und e-CTC sowohl durch UV-Detektion als auch MS/MS-Detektion quantifiziert werden.

Tab. 14: Ermittelte CTC-Gehalte in Knochenproben nach Aufschluß mit verschiedenen Extraktionsmitteln ( $\Sigma$  CTC + e-CTC, 370 nm,  $n = 4$ )

Extraktionsmittel		CTC-Gehalt [mg/kg]
McIlvain-Puffer	pH 2 mit 0,01 mol/L EDTA	7,92
	pH 3 mit 0,01 mol/L EDTA	5,48
	pH 4 mit 0,01 mol/L EDTA	4,59
	pH 5 mit 0,01 mol/L EDTA	2,70
	pH 4 mit 0,1 mol/L EDTA	7,08
1 mol/L HCl		16,32

Da unter den salzsauren Aufschlußbedingungen die Bildung von Anhydro-CTC zu erwarten ist, siehe **Kap. 3.5.3.4**, wurde die Stabilität von CTC und e-CTC in salzsaurer Lösung überprüft. Zur Überprüfung, ob neben einer Dehydratation auch eine Epimerisierung unter diesen Bedingungen stattfindet, wurde in einem ersten Schritt die Stabilität von CTC in 1 mol/L salzsaurer Lösung überprüft. Um zusätzlich die Stabilität von e-CTC zu prüfen, erfolgte anschließend die Stabilitätsuntersuchung von CTC und e-CTC in einer 1 mol/L salzsaurer Mischlösung. Diese Lösungen wurden bei einer Temperatur von 5 °C aufbewahrt und über einen Zeitraum von 12 h stündlich mit HPLC-UV vermessen. Die Stabilitätsuntersuchungen ergaben, daß sich CTC und e-CTC mit Konzentrationsabnahmen nach 12 h von 4,3 % für CTC und 6,8 % für e-CTC entgegen den Erwartungen unter Zugrundelegung der Wiederholpräzision von 7,2 % als stabil erwiesen. Es konnten nur geringe Anteile an Abbau- und Umwandlungsprodukten festgestellt werden. Deren Konzentrationsverlauf als Funktion der Zeit ist in **Abb. 17** dargestellt.

Die Stabilitätsuntersuchung von CTC in Einzellösung hat gezeigt, daß nach einem Zeitraum von 12 h bezogen auf die Ausgangskonzentration von 10 mg/L nur 1 % Anhydro-CTC entstanden ist. Bereits bei der ersten Messung konnte ein geringer e-CTC-Gehalt in Höhe von 1,8 % der Ausgangskonzentration festgestellt werden, der jedoch im Laufe der Untersuchung noch um 16 % abgenommen hat. Dies belegt, daß in 1 mol/L salzsaurer Lösung unterhalb von pH 1,5 keine Epimerisierung stattfindet, siehe auch **Kap. 3.5.3.1**.

Ein Vergleich der Stabilität von CTC und e-CTC in 1 mol/L salzsaurer Lösung zeigt, daß die Kurvenverläufe für die Bildung von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC ähnlich sind, sich aber in der erreichten Endkonzentration nach 12 h unterscheiden. Die Dehydratation von CTC ist nach einem Zeitraum von 12 h doppelt so hoch wie beim e-CTC. Da keine Epimerisierung bei diesem pH-Wert stattfindet, kann Anhydro-CTC nur aus CTC und e-Anhydro-CTC nur aus e-CTC entstanden sein. Während nach 12 h die Anhydro-CTC-Konzentration 1 % der Ausgangs-CTC-Konzentration beträgt, entstehen aus e-CTC nach diesem Zeitraum nur 0,5 % e-Anhydro-CTC. Neben den Anhydro-Verbindungen traten geringfügig noch weitere Isomere von CTC und e-CTC auf, auf dessen Identifizierung in **Kap. 5.5** eingegangen wird.

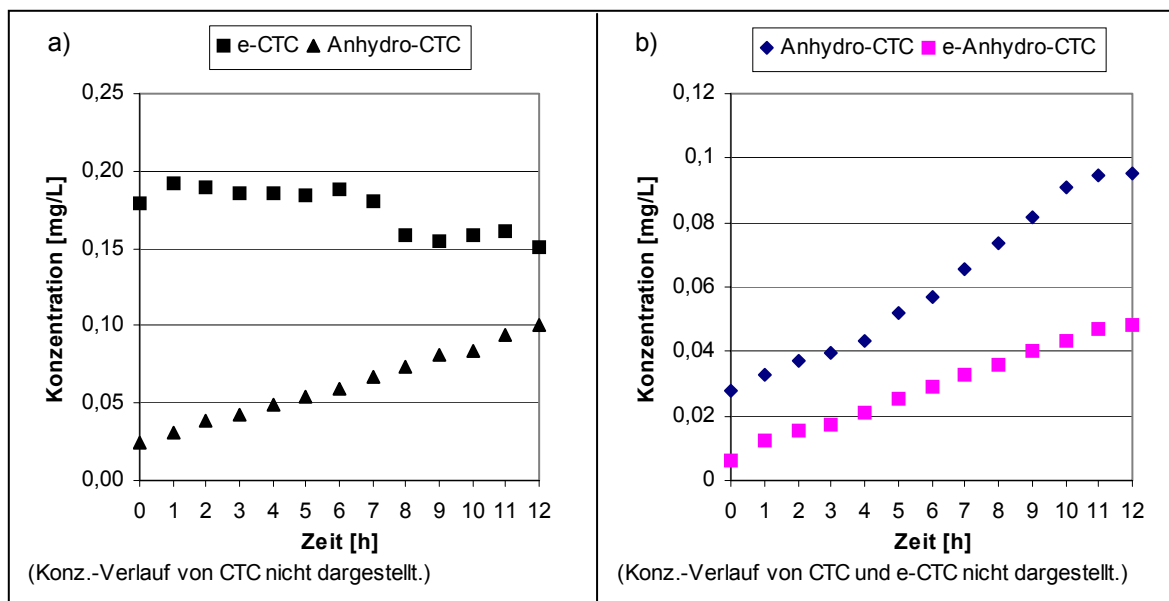


Abb. 17: Stabilität salzsaurer Standardlösungen: a) CTC-Standard; b) CTC/e-CTC-Standard - Bildung der Anhydroverbindungen als Funktion der Zeit (1 mol/L HCl,  $\beta = 10$  mg/L, 5 °C)

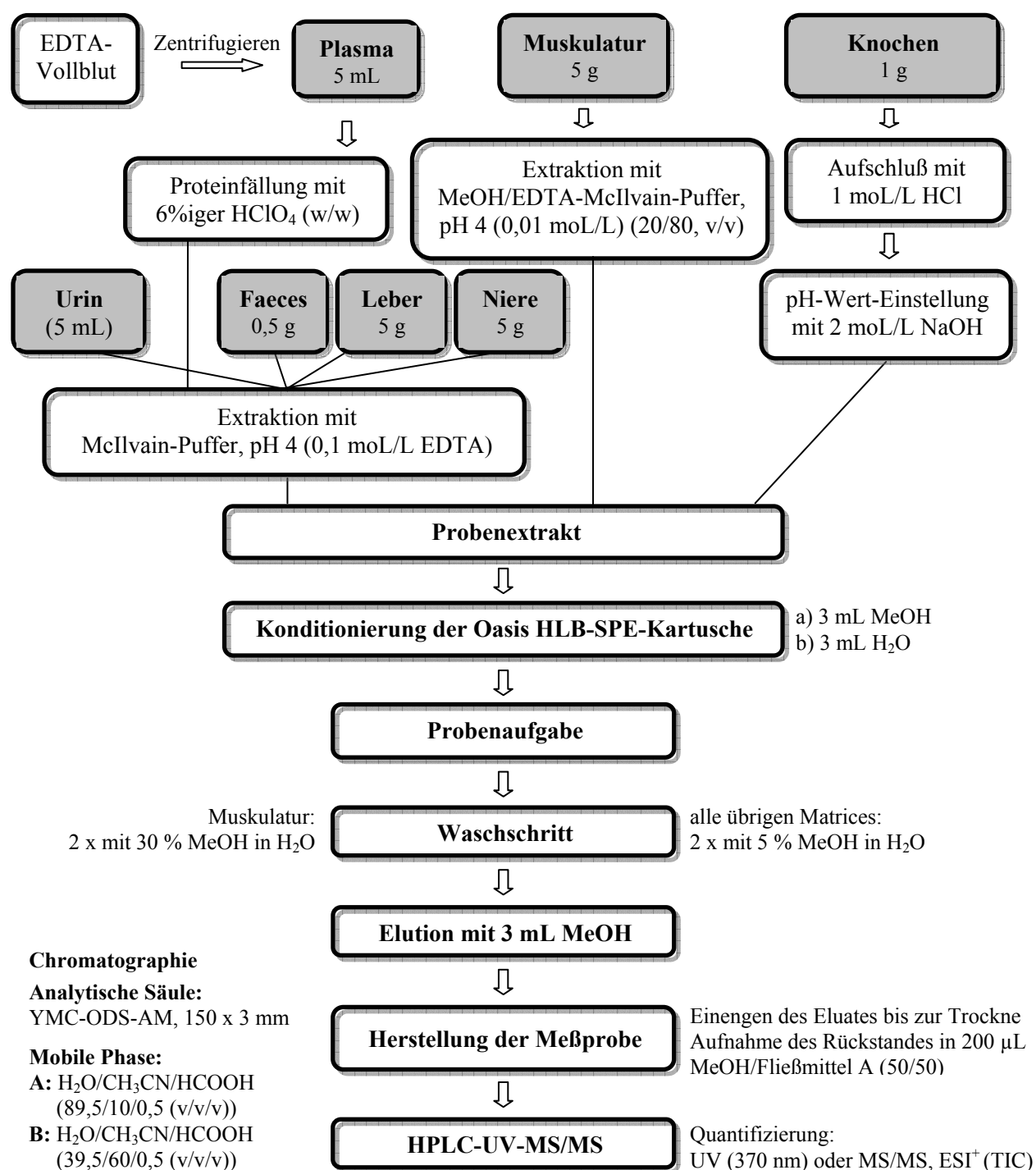
Insgesamt kann festgestellt werden, daß sich CTC und e-CTC trotz der geringfügigen Bildung von Metaboliten unter Zugrundelegung der Wiederholpräzision in 1 mol/L salzsaurer Lösung als stabil erwiesen. Da der Dehydratationsanteil maximal nur 1 % betrug, wurde auf eine zusätzliche Quantifizierung der Anhydro-Verbindungen nach der Aufarbeitung von Realproben verzichtet.

### 5.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Verfahrensentwicklung

Es wurde ein HPLC-UV-MS/MS-Verfahren entwickelt und optimiert, welches sich für die quantitative Bestimmung von CTC und e-CTC sowie den qualitativen Nachweis der Metabolite iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC eignet. Zur chromatographischen Bestimmung erwies sich als analytische Säule die YMC-ODS-AM (150 x 3 mm, 3  $\mu$ m) unter Einsatz von einem Gemisch aus Ameisensäure und Acetonitril ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCOOH}$ , 0,5 % HCOOH, (v/v)), pH 2,8 als mobile Phase als geeignet. Die zur Kalibrierung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens eingesetzten Standardlösungen wurden als Mischung aus CTC und e-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) im Massenverhältnis 1:1 hergestellt. Kalibrierlösungen können bei einer Temperatur von -80 °C sechs Monate aufbewahrt werden. Bei Temperaturen höher als 5 °C kommt es rasch zu Abbau- und Umwandlungsreaktionen. Für die Routineanalytik empfiehlt sich in jedem Fall, Kalibrierlösungen zu aliquotieren und einzufrieren, um häufiges Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Gegebenenfalls sind Regelkarten zur Kontrolle der Stabilität von CTC und e-CTC zu führen.

Zur Probenvorbereitung wurde ein Verfahren mittels Festphasenextraktion mit Oasis HLB-Kartuschen entwickelt. Das zunächst für Standardlösungen entwickelte SPE-Extraktionsverfahren wurde an die unterschiedlichen Matrices angepaßt. Dieses Verfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung von CTC und e-CTC in Urin, Plasma, Faeces, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen mit hoher Sensitivität mittels Tandemmassenspektrometrie im MRM-Mode. Während CTC und e-CTC in Muskulatur, Plasma, Faeces und Knochen zusätzlich in Abhängigkeit von der Höhe des CTC-Gehaltes auch mit den durch UV-Detektion erhaltenen Daten quantifiziert werden können, wird bei Leber und Niere der

e-CTC-Peak grundsätzlich durch andere Substanzen gestört. Die Aufarbeitung von Urin führt zu keiner ausreichenden Aufreinigung, so daß weder CTC noch e-CTC mit Daten der UV-Detektion auswertbar sind. Der schematische Ablauf des Verfahrens ist in **Abb. 18** dargestellt.



*Abb. 18: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC in biologischen Proben*

Das für Urin, Faeces, Plasma, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen entwickelte Analysenverfahren wurde im nächsten Schritt - vor Einführung in die Routineanalytik - zum Nachweis der Zuverlässigkeit einer ausführlichen Validierung unterworfen.

### 5.3 Validierung des Analysenverfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC

Eine Validierung dient der analytischen Qualitätssicherung eines Analysenverfahrens für den Einsatz in der Routineanalytik, zu dem die Probenahme, Probenvorbereitung, Analysenmethode, Kalibrierung sowie die Ergebnisauswertung und -darstellung gehört. Validierung bedeutet durch systematische Überprüfung und Dokumentation nachzuweisen, daß ein Analysenverfahren für die Erfüllung einer Aufgabe geeignet ist und den Anforderungen des Anwenders gerecht wird [244, 287, 288]. Die Validierung eines Analysenverfahrens ist eine fehlertheoretische Systemanalyse der angewendeten chemischen, physikalischen und mathematischen Grundlagen, der verwendeten Meßsysteme, der Datengewinnung und Datenverarbeitung einschließlich der notwendigen Kalibrierung. Je nach Anwendungsbereich werden an ein Analysenverfahren unterschiedliche Anforderungen gestellt, die in verschiedenen Richtlinien dokumentiert sind. Es gibt daher keine allgemeingültige Vorschrift, welche einzelnen Parameter eine Validierung umfassen muß. Bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren für die Bestimmung von Tetracyclinen [170, 173, 210] erfolgte keine Angabe, welche mathematischen Modelle zur Berechnung der angegebenen Validierungsparameter zugrunde liegen. Zudem werden Validierungsdaten nur in begrenztem Ausmaß beschrieben, wodurch die Vergleichbarkeit der Analysenverfahren erschwert wird. Die heute gültigen Richtlinien beziehen sich im Wesentlichen auf die von KROMIDAS und FUNK et al. beschriebenen Validierungsmethoden [244, 288, 289, 290]. Die Einführung neuer Vorschriften dient dazu, Validierungsmethoden zu vereinheitlichen und damit eine Vergleichbarkeit von Analysenverfahren zu ermöglichen. So ist im Jahre 2000 eine für alle europäischen Prüf- und Kalibrierlaboratorien international gültige Norm, die DIN EN ISO/IEC 17025 [291], verabschiedet worden. Weitere Richtlinien und Normen basieren auf Vorgaben der FDA [292] sowie den Richtlinien der DIN 32645 [293] und der ICH-Richtlinien Q2A und Q2B der Industrie [294, 295]. Darüber hinaus gelten für einzelne Anwendungsbereiche spezielle Richtlinien. Von den Europäischen Gemeinschaften ist im Jahr 2002 die EU-Richtlinie 2002/657/EG [296, 297] eingeführt worden, nach der die Durchführung von Analysenmethoden sowie die Auswertung von Ergebnissen für die Bestimmung von Tierarzneimitteln geregelt ist.

Eine Validierung besteht im Wesentlichen aus der kritischen Untersuchung der einzelnen Analysenschritte auf systematische und zufällige Fehler. Nach Festlegung, in welcher Probenmatrix welche Komponenten bestimmt werden sollen, erfolgt die Auswahl der Bestimmungsmethode und Erstellung einer detaillierten Arbeitsvorschrift. Im Anschluß daran werden nachfolgend aufgeführte Validierungsparameter ermittelt [244, 288, 289, 290]:

- **Wahl des Arbeitsbereiches**
- **Linearität**
- **Nachweis- und Bestimmungsgrenze**
- **Selektivität, Spezifität**
- **Richtigkeit und Präzision**

Ziel war es, das für die unterschiedlichen Matrices entwickelte Analysenverfahren für die Bestimmung von CTC und e-CTC sowohl mit der UV-Detektion als auch MS/MS-Detektion zu validieren, wobei

der Schwerpunkt auf der Matrix Muskulatur lag. Daher ist nachfolgend beispielhaft die Validierung für die Bestimmung von CTC und e-CTC mit HPLC-UV-MS/MS in Muskulatur dargestellt.

### 5.3.1 Kalibrierung

#### 5.3.1.1 Wahl des Arbeitsbereiches

Die Wahl des Arbeitsbereiches erfolgte unter Berücksichtigung folgender Parameter:

- Es sollte ein möglichst linearer Zusammenhang zwischen der Analyt-Konzentration und dem Detektorsignal vorliegen.
- Die untere Arbeitsbereichsgrenze muß oberhalb der Bestimmungsgrenze liegen.
- Die Analysenpräzision muß im gesamten Arbeitsbereich erreichbar im Hinblick auf die Bestimmungsgrenze und vor allem konstant sein.
- praxisorientiertes Anwendungsziel: Die Arbeitsbereichskonzentrationen sollten den Konzentrationen in den Realproben entsprechen.

Zunächst wurde der funktionale Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche für CTC und e-CTC ermittelt.

#### HPLC-UV

Dazu wurden Mischstandardlösungen aus CTC und e-CTC in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v), künftig nur noch „Kalibrierlösungen“ genannt, mit Konzentrationen von 0,1 mg/L bis 100 mg/L chromatographisch mittels HPLC-UV vermessen und bei einer Wellenlänge von 370 nm die Peakflächen und ihre relativen Standardabweichungen der Peakflächen bestimmt (s. **Tab. A. 12** im Anhang).

Durch Auftragung der Peakflächen  $y$  als Funktion von der Konzentration  $x$  und linearer Regression wird eine Geradengleichung mit folgender Formel erhalten:

*Gleichung 1:* 
$$y = a + bx$$

Für CTC wurden die Konstanten  $a = -25,57$  mAU min und  $b = 911,20$  mAU min/ (mg/L) mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9999$ , für e-CTC die Konstanten  $a = -21,93$  mAU min und  $b = 910,50$  mAU min/ (mg/L) mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9999$  ermittelt. Damit kann für den gewählten Konzentrationsbereich sowohl für CTC als auch für e-CTC von einem **linearen Zusammenhang** zwischen Konzentration und Detektorsignal (Peakfläche) ausgegangen werden.

#### LC-MS/MS

Zur Feststellung des funktionalen Zusammenhanges zwischen der Konzentration und der Peakfläche für CTC und e-CTC mit der MS/MS-Detektion wurden Kalibrierlösungen mit Konzentrationen von 0,001 mg/L bis 100 mg/L chromatographisch mittels LC-MS/MS vermessen und die Mittelwerte der Peakflächen sowie die relativen Standardabweichungen der Peakflächen ermittelt (s. **Tab. A. 11** im Anhang). Die Durchführung einer Regressionsanalyse durch Auftragung der Peakflächen  $y$  gegen die Konzentrationen  $x$  ergibt, daß über diesen großen Konzentrationsbereich kein linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9927$  für CTC und  $R^2 = 0,9832$  für e-CTC vorliegt. Der **funktionale Zusammenhang zwischen Peakfläche und Kon-**

**zentration** kann vielmehr durch eine polynomische Funktion 2. Grades beschrieben werden, die ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9999$  für CTC und  $R^2 = 0,9997$  für e-CTC liefert, was visuell bestätigt werden kann (s. **Kap. A. 5.2** im Anhang).

Zur Festlegung der **unteren Grenze des Arbeitsbereiches** war es erforderlich, die Bestimmungsgrenze des Analysenverfahrens zu ermitteln. Die Ermittlung erfolgte als eigener Validierungsparameter (siehe **Kap. 5.3.2**). Als Bestimmungsgrenze des Verfahrens und damit untere Grenze des Arbeitsbereiches ergab sich für die *UV-Detektion* für CTC und e-CTC eine Konzentration von 0,18 mg/L, für die *MS/MS-Detektion* für beide Verbindungen eine Konzentration von 0,005 mg/L.

Für die **Analysenpräzision** gilt nach KROMIDAS für medizinische Anwendungen eine maximal zulässige Standardabweichung von 10 % [298]. Nach der EU-Richtlinie 657 gilt für die Mehrfachbestimmung einer Probe sogar ein Grenzwert von 20 % [296]. Da sich dieser Grenzwert aber auf die Messung von Realproben bezieht, wurde der von KROMIDAS festgelegte Grenzwert von 10 % zugrunde gelegt. Damit ergab sich eine untere Arbeitsbereichsgrenze für CTC und e-CTC mit der *UV-Detektion* von 0,18 mg/L, für die *MS/MS-Detektion* eine Grenze von 0,005 mg/L. Als obere Grenze des Arbeitsbereiches wurde für die *UV-Detektion* eine Konzentration von 100 mg/L festgesetzt, für die *MS/MS-Detektion* eine Konzentration von 50 mg/L, da oberhalb dieser Konzentration eine Sättigung bei der massenspektrometrischen Detektion auftritt.

In Bezug auf das **praxisorientierte Anwendungsziel** sollten die Arbeitsbereichskonzentrationen den Konzentrationen in den Realproben entsprechen. Da sowohl bei der Ermittlung des Ausscheidungsverhaltens von CTC im Urin und Faeces als auch in Knochen mit hohen CTC-Gehalten sowie im Gegensatz dazu in Plasma und den Schlachtproben mit geringen CTC-Gehalten zu rechnen ist, sollte der Arbeitsbereich möglichst groß gewählt werden. Er wurde für die *UV-Detektion* von 0,1 mg/L bis 100 mg/L und für die *MS/MS-Detektion* von 0,005 mg/L bis 50 mg/L festgesetzt.

### 5.3.1.2 Linearität

#### HPLC-UV

Zur Erstellung einer Kalibrierfunktion mittels HPLC-UV wurden zehn über den festgelegten Arbeitsbereich von 0,18 mg/L bis 100 mg/L verteilte Konzentrationen von CTC und e-CTC in Kalibrierlösungen zehnfach chromatographisch vermessen und die Peakflächen ermittelt. Nachdem mittels GRUBBS-Test [288] (s. Anhang **Kap. A. 4**) sichergestellt wurde, daß die einzelnen Meßreihen keine Ausreißer enthalten, wurden die jeweiligen Mittelwerte der Peakflächen und relativen Standardabweichungen ermittelt (s. **Tab. A 12** im Anhang). Neben der Überprüfung der Linearität durch einen einfachen Visualitätstest (s. **Kap. A. 5.2** im Anhang) ist eine mathematische Prüfung notwendig. Zur statistischen Absicherung der Kalibrierfunktionen wurde der **Anpassungstest nach MANDEL** (s. Anhang **Kap. A 5.3**) die **Residualanalyse** (s. Anhang **Kap. A. 5.4**), die Ermittlung der **Varianzhomogenität** (s. Anhang **Kap. A. 5.5**) und die **Absicherung der unteren Arbeitsgrenze** (s. Anhang **Kap. A. 5.6**) herangezogen [244, 288, 290]. Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte die Linearität im Konzentrationsbereich von 0,1 mg/L bis 100 mg/L ( $y = 910,49 \cdot x - 20,96$ ,  $R^2 = 0,9999$ ) bestätigt werden.

Die Regressionsanalyse liefert die Kalibrierfunktion mit verschiedenen **Verfahrenskennndaten** [244, 288, 289]. Eine wichtige Kenngröße ist die **Reststandardabweichung  $s_y$** , die die Streuung der Meßwerte um die Regressionsgerade angibt und somit ein Präzisionsmaß für die Messung ist. Wird nun die Reststandardabweichung auf die Mitte des Arbeitsbereiches normiert durch Division mit der Steigung,



so kann die **Verfahrensstandardabweichung**  $s_{x0}$  errechnet werden (s. Anhang **Kap. A. 5.7**). Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht bei linearen Kalibrierfunktionen der **Empfindlichkeit**, worunter die Änderung des Meßwertes bei einer Änderung der Konzentration verstanden wird. Ein Verfahren ist also um so leistungsfähiger, je größer die Steigung und je kleiner die Reststandardabweichung ist. Die Verfahrensstandardabweichung  $s_{x0}$  ist somit ein Maß für die Leistungsfähigkeit eines Analysenverfahrens. Eine Normierung der Verfahrensstandardabweichung durch Division mit dem Mittelwert der Konzentrationen und Multiplikation mit 100 liefert den **Verfahrenvariationskoeffizienten** oder **relative Verfahrensstandardabweichung**  $V_{x0}$ , welche einen Vergleich verschiedener Verfahren erlaubt. Die maximal zulässige relative Verfahrensstandardabweichung hängt von der Anzahl der Kalibrierkonzentrationen und der Ausdehnung des Arbeitsbereiches ab. Mit abnehmender Anzahl an Kalibrierstandards und zunehmender Ausdehnung des Arbeitsbereiches nimmt die maximal zulässige Verfahrensstandardabweichung ab, d.h. die Anforderungen an die Kalibrierfunktion nehmen zu. Für einen Arbeitsbereich mit einer Ausdehnung vom 20fachen der unteren Arbeitsbereichsgrenze, d.h. die höchste Konzentration beträgt das 20fache der geringsten Konzentration des Arbeitsbereiches, und zehn Kalibrierkonzentrationen wird von KROMIDAS eine maximal zulässige Verfahrensstandardabweichung von 1,8 % angegeben [289]. Für größere Arbeitsbereiche werden zwar keine Angaben gemacht, aber näherungsweise kann dieser Wert als maximal zulässige Verfahrensstandardabweichung gesetzt werden. Die ermittelten Verfahrenskenndaten der Kalibrierfunktionen für CTC und e-CTC sind in **Tab. A. 17** im Anhang zusammengefaßt. Die relativen Verfahrensstandardabweichungen für das HPLC-UV-Verfahren lagen mit 1,7 % für CTC und 1,4 % für e-CTC unterhalb des Grenzwertes von 1,8 %.

#### LC-MS/MS

Die mit LC-MS/MS erhaltenen Kalibrierfunktionen wurden ebenfalls durch den **Anpassungstest nach MANDEL** (s. Anhang **Kap. A. 5.3**) die **Residualanalyse** (s. Anhang **Kap. A. 5.4**), die Ermittlung der **Varianzhomogenität** (s. Anhang **Kap. A. 5.5**) und die **Absicherung der unteren Arbeitsgrenze** (s. Anhang **Kap. A. 5.6**) statistisch abgesichert [244, 288, 290, 299, 300, 301]. Die Durchführung des Linearitätstests nach MANDEL für die Kalibrierfunktion der MS/MS-Detektion bezogen auf einen Arbeitsbereich von 0,005 mg/L bis 50 mg/L bestätigte rechnerisch, daß durch eine Kalibrierfunktion 2. Grades eine signifikant bessere Anpassung erreicht werden kann als mit der 1. Grades. Durch Aufteilung des Arbeitsbereiches in drei Teilbereiche konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche für CTC und e-CTC erzielt werden, was rechnerisch mittels des MANDEL-Testes bestätigt werden konnte. Damit ergaben sich die in **Tab. 15** dargestellten linearen Arbeitsbereiche.

Für die drei Kalibrierfunktionen der *MS/MS-Detektion* wurden analog die Verfahrenskenndaten ermittelt, die in **Tab. A. 18** bis **Tab. A. 20** zusammengefaßt sind. Die relativen Verfahrensstandardabweichungen belegen mit Werten zwischen 2,1 % und 6,2 % die gute Leistungsfähigkeit des Analysenverfahrens, weil aufgrund der Einschränkung des Arbeitsbereiches in drei Teilbereiche nach KROMIDAS eine maximal zulässige Verfahrensstandardabweichung von 6,4 % angenommen werden kann [289].

Tab. 15: Ermittelte lineare Bereiche für die Bestimmung von CTC und e-CTC mittels LC-MS/MS

Linearer Bereich [mg/L]	Kalibrierfunktionen/Korrelationskoeffizienten	
	CTC	e-CTC
0,005-0,08	$y = 4158,035 + 1182783,981 x$ $R^2 = 0,9985$	$y = 13875,111 + 836366,874 x$ $R^2 = 0,9981$
0,1-0,5	$y = 12247,543 + 1121152,553 x$ $R^2 = 0,9996$	$y = 19111,349 + 799036,245 x$ $R^2 = 0,9995$
1-50	$y = 591645,743 + 812434,819 x$ $R^2 = 0,9998$	$y = 484980,264 + 589292,935 x$ $R^2 = 0,9996$

Da ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche bei der MS/MS-Detektion nur in einem begrenztem Konzentrationsbereich der in **Tab. 15** angegebenen Bereiche gegeben ist, ist bei der Ermittlung der CTC-Gehalte in Realproben darauf zu achten, daß die Konzentrationen der Kalibrierstandardlösungen im Bereich der Realprobe liegen.

### 5.3.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist die kleinste quantitativ noch nachweisbare Konzentration ohne Forderung einer bestimmten Präzision. Die Nachweisgrenze ist damit ein Entscheidungskriterium für das Vorhandensein eines Analyten. Im Gegensatz dazu wird als Bestimmungsgrenze die kleinste mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantifizierbare Konzentration verstanden [244, 288, 293]. Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze werden in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben, wobei in der Regel die Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt werden. Dieses Verfahren entspricht der EU-Richtlinie 2002/657/EG, der IUPAC zur Nomenklatur in der Chromatographie sowie der FDA [293, 296, 292, 302, 302].

Nach den Definitionen der EU-Richtlinie 2002/657/EG, der IUPAC-Richtlinien zur Nomenklatur in der Chromatographie und von KROMIDAS [296, 244, 288] ist die Nachweisgrenze definiert als das Dreifache, die Bestimmungsgrenze als das Neunfache des Signal-Rausch-Verhältnisses. Zur Ermittlung des Signal-Rausch-Verhältnisses in Standardlösungen wurden Kalibrierlösungen aus CTC und e-CTC in der Nähe der Nachweisgrenze sechsfach chromatographisch vermessen. Die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze in Muskulatur erfolgte, indem unbelastete Muskulaturproben (Sechsfach-Bestimmung) auf Gehalte in der Nähe der Nachweisgrenze dotiert wurden, nach der Analysenvorschrift, siehe **Kap. A. 9** im Anhang, aufgearbeitet, mit HPLC-UV-MS/MS gemessen und anschließend das Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt wurde. Für die Ermittlung des Grundrauschens wurde die zehnfache Peakbreite genommen.

In Standardlösungen lagen die mittels *UV-Detektion* erhaltenen Nachweisgrenzen für CTC und e-CTC bei 0,06 mg/L und die Bestimmungsgrenzen bei 0,18 mg/L. Die mit der *MS/MS-Detektion* ermittelten Nachweisgrenzen betrugen 0,002 mg/L und die Bestimmungsgrenzen 0,005 mg/L für CTC und e-CTC. Die in Muskulatur ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in **Tab. 16** zusammengefaßt. Diese lagen deutlich unterhalb der in Literaturverfahren angegebenen Werte. Für die Bestimmung von CTC in Muskulatur mittels UV-Detektion werden Nachweisgrenzen von 10-24 µg/kg und Bestimmungsgrenzen von 20-47 µg/kg beschrieben [210, 239], für die MS/MS-Detektion werden in der Literatur Nachweisgrenzen von 3-4 µg/kg und Bestimmungsgrenzen von 10-15 µg/kg angegeben

[176, 224, 279].

Tab. 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von CTC und e-CTC in Muskulatur (HPLC-UV-MS/MS)  
( $n = 7$ )

Substanz	Nachweisgrenze [ $\mu\text{g/kg}$ ]		Bestimmungsgrenze [ $\mu\text{g/kg}$ ]	
	UV-Detektion	MS/MS-Detektion	UV-Detektion	MS/MS-Detektion
CTC	3	0,1	8	0,3
e-CTC	3	0,1	8	0,3

### 5.3.3 Selektivität des Verfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC in Muskulatur

Unter der analytischen Spezifität wird die Fähigkeit eines Untersuchungsverfahrens verstanden, nur den gesuchten Analyten zu erfassen, wobei andere anwesende Bestandteile in der Probe das Analyseergebnis nicht beeinflussen [288, 289, 290, 296]. Die Selektivität beschreibt das Ausmaß, mit dem mehrere Substanzen in einer komplexen Mischung ohne Interferenzen in Gegenwart weiterer Mischungskomponenten bestimmt werden können. Grundsätzlich gilt, daß auf eine Prüfung der Selektivität verzichtet werden kann, wenn die Richtigkeit bereits bewiesen wurde, denn wenn ein Vorliegen systematischer Fehler ausgeschlossen werden kann, so muß das Verfahren auch selektiv sein. Die Überprüfung der Selektivität eines HPLC-UV-Verfahrens ist besonders wichtig, da die Identifizierung der Analyten hauptsächlich über die Retentionszeit erfolgt, wobei vor allem bei der Untersuchung komplexer biologischer Proben die Gefahr von Überlagerungen des Analyt-Peaks durch Begleitkomponenten in der Probe besteht und somit eine Verfälschung des Ergebnisses eintritt. Aber auch bei der massenspektrometrischen Detektion ist eine Prüfung der Selektivität erforderlich, da eine Quantifizierung mit Triple-Quadrupol-Geräten ausschließlich im MRM-Mode durch Aufnahme von meist nur zwei bis maximal vier Massenspuren erfolgt und es somit auch zu Überlagerungen durch Begleitkomponenten kommen kann. Nach der EU-Richtlinie 657 [296] ist die Selektivität von Verfahren im ersten Schritt durch Retentionszeitvergleich der Analyten in der Probe mit denen in einem entsprechenden Kalibrierstandard unter den gleichen Versuchsbedingungen zu prüfen, wobei eine Retentionszeitstoleranz von 5 % nicht überschritten werden darf. Weiterhin muß bei HPLC-DAD-Verfahren ein UV-Spektrenvergleich erfolgen. Die Absorptionsmaxima der Analyten müssen unter Berücksichtigung einer durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems vorgegebenen Toleranz bei denselben Wellenlängen wie bei den Kalibrierstandards liegen. Beim massenspektrometrischen Nachweis mit Triple-Quadrupol-Geräten im MRM-Modus müssen die relativen Intensitäten der nachgewiesenen Produkt-Ionen innerhalb einer Toleranz, ausgedrückt in Prozent der Intensität des intensivsten Ions, auch Basis-Peak, denjenigen des Kalibrierstandards entsprechen, wobei die Konzentration des Kalibrierstandards der der Probe entsprechen muß. Die zulässige Höchsttoleranz für die relativen Ionenintensitäten ist nach relativer Intensität des Produkt-Ions bezogen auf den Basis-Peak gestaffelt, darf aber  $\pm 50 \%$  nicht überschreiten. Weiterhin gilt für alle massenspektrometrische Verfahren, bei denen Fragmente nicht im Full-Scan-Modus gemessen werden, zur Identifizierung ein Punktesystem, wobei zur Bestätigung von Analyten mindestens vier Identifizierungspunkte benötigt werden. Ein LC-MS/MS-Verfahren, mit dem ein Precursor-Ion und zwei Produkt-Ionen gemessen werden, liefert vier

Punkte, zwei Precursor-Ionen mit einem Produkt-Ion fünf Punkte. Bei dem entwickelten HPLC-UV-MS/MS-Verfahren wird ein Identifizierungspunkt durch die UV-Detektion und vier Identifizierungspunkte durch die MS/MS-Detektion erhalten, womit CTC und e-CTC mit einer Gesamtpunktzahl von fünf eindeutig identifizierbar sind.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Selektivitätsprüfung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens durch eine für CTC und e-CTC charakteristischen Peaklöschung nach alkalischer Behandlung der Probe sowie durch einen Vergleich der Retentionszeiten, der UV-Spektren, der MS-Spektren und der Produkt-Ionen-Intensitäten.

### 5.3.3.1 Selektivitätstest durch Peaklöschung nach alkalischer Behandlung

Zur Absicherung der Selektivität wurde in einem ersten Schritt eine Muskulaturprobe alkalisch behandelt, was die Isomerisierung von CTC und e-CTC zu iso-CTC und e-iso-CTC bewirkt und damit zu einer Peaklöschung führt. Ist das Verfahren selektiv, so muß es zu einer vollständigen Löschung des CTC- und e-CTC-Peaks kommen. Wie in **Abb. 19** anhand der UV- und MS-Chromatogramme dargestellt, kommt es nach alkalischer Behandlung der Muskulaturprobe zu einer vollständigen Auslöschung der CTC und e-CTC-Peaks und zur Umwandlung in die isomeren Verbindungen.

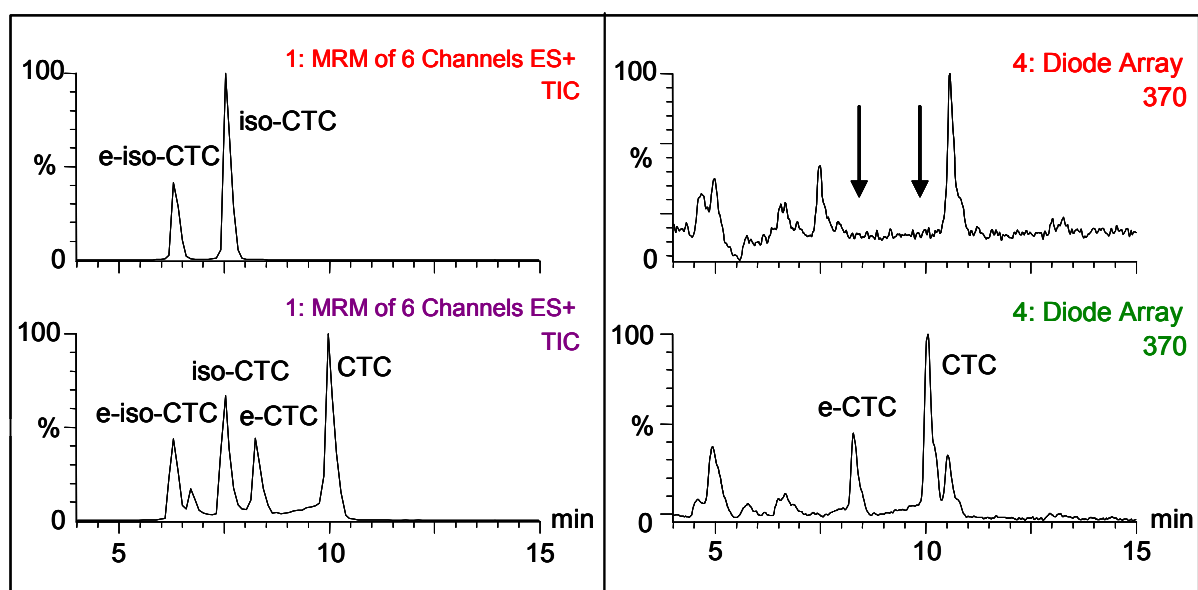


Abb. 19: UV- und MS-Chromatogramme einer Muskulaturprobe: Aufarbeitung nach dem allgemeinen Extraktionsverfahren (unten), Aufarbeitung mit alkalischer Behandlung (oben)

### 5.3.3.2 Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten

Die weitere Selektivitätsprüfung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens erfolgte durch einen Vergleich der Retentionszeiten [295] von CTC und e-CTC in einer Muskulaturprobe mit denen in einer Kalibrierlösung. Hierzu wurde sowohl eine gewachsene Muskulaturprobe des Tieres 95 der Tierstudie an der FAL aufgearbeitet als auch eine Mischstandardlösungen aus CTC und e-CTC ( $\beta = 1$  mg/L) vermessen. Die in **Abb. 20** dargestellten Chromatogramme für die UV-Detektion und MS/MS-Detektion zeigen, daß die Retentionszeiten von CTC und e-CTC in der Muskulaturprobe exakt mit denen im Standard übereinstimmen und damit das Richtigkeitskriterium aufgrund der Retentionszeiten mit einer maximalen Toleranz von 5 % erfüllt ist. Da der Retentionszeitvergleich als einziges Selektivitätskrite-

rium nicht ausreicht, wurden weitere Selektivitätstests durchgeführt.

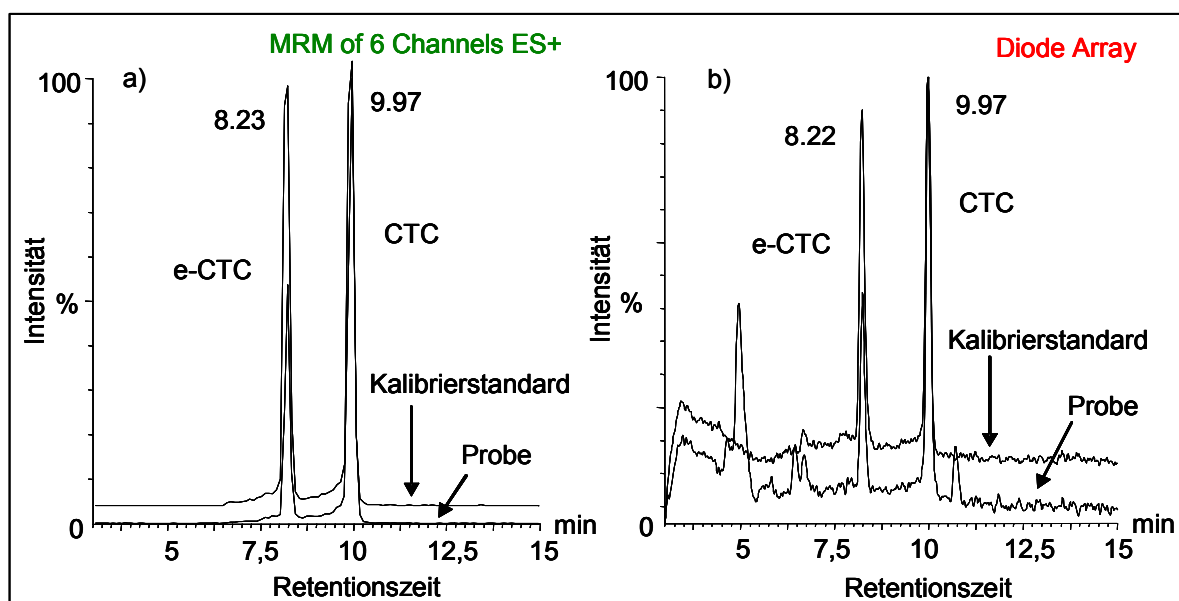


Abb. 20: Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten: HPLC-Chromatogramm eines Kalibrierstandards und einer Muskulaturprobe mit MS/MS-Detektion (a) und UV-Detektion (b)

### 5.3.3.3 Selektivitätstest durch Vergleich der UV- und MS-Spektren

Als weiteres Kriterium für die Selektivität eines Verfahrens gilt die Übereinstimmung der Spektren der Analyt-Peaks in Standardlösungen mit denen in der Probe [288, 290]. Dazu wurden die UV- sowie die MS-Spektren der Analyten in der Standardlösung mit denen in der Muskulaturprobe verglichen.

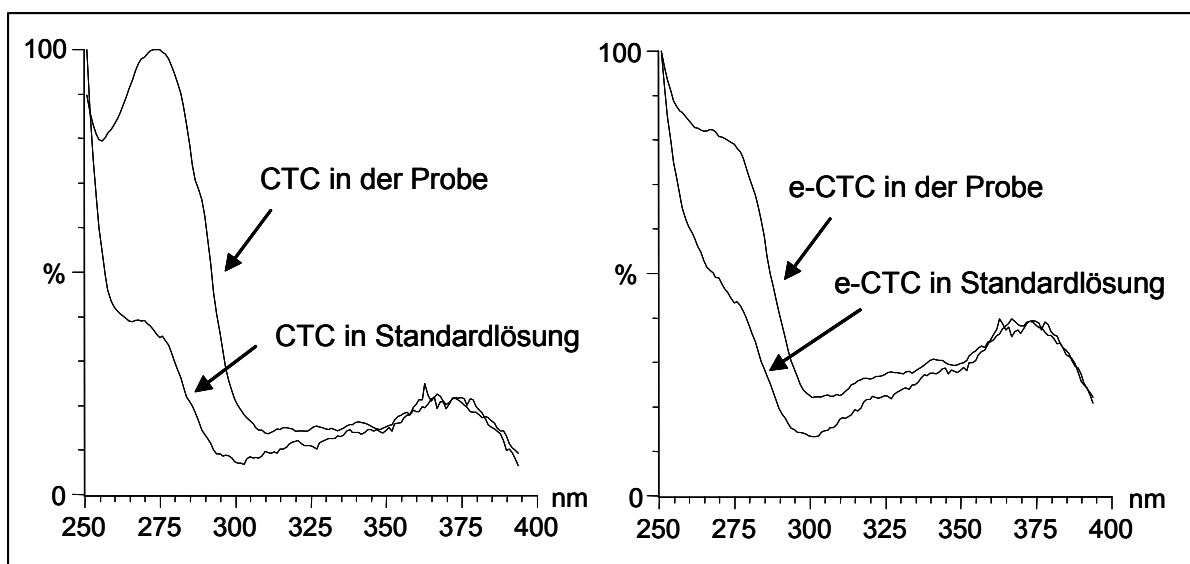


Abb. 21: Selektivitätstest durch Vergleich der UV-Spektren von CTC und e-CTC in Standardlösung ( $\beta = 1 \text{ mg/L}$ ) und in einer Muskulaturprobe (Tier 95, FAL)

Ein Vergleich der normierten UV-Spektren, siehe **Abb. 21**, zeigt deutlich, daß eine Selektivität dieser Detektionsart nur in einem Wellenlängenbereich von etwa 350 nm bis 400 nm gegeben ist. Im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 350 nm kommt es in Realproben zu Überlagerungen von Störsubstanzen,

die zu einer erheblichen Differenz der UV-Spektren in Standardlösungen im Vergleich zu denen in der Realprobe führen. Daher darf eine Quantifizierung von CTC und e-CTC nur bei einer Wellenlänge von 370 nm erfolgen.

Zum Vergleich der MS-Spektren wurden sowohl von einer Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC ( $\beta = 1 \text{ mg/L}$ ) als auch von einer Muskulaturprobe Produkt-Ionen-Scans des Precursor-Ions mit  $m/z$  479 bei einer Kollisionsenergie von 25 eV aufgenommen. Die in **Abb. 22** dargestellten MS-Spektren belegen für beide Substanzen, daß in der Standardlösung als auch in der Muskulaturprobe dieselben Fragmente entstehen. Das Fragment mit  $m/z$  371 von e-CTC ist als schwächstes Produkt-Ion im Full-Scan-Modus nicht mehr zu erkennen. Darüberhinaus muß nach der EU-Richtlinie 657 auch das Intensitätsverhältnis der einzelnen Fragmente zueinander identisch sein. Unter Zugrundelegung der gültigen zulässigen Höchsttoleranz von 50 % sind auch die Fragmentmuster von CTC und e-CTC in der Standardlösung und in der Muskulaturprobe als gleich zu betrachten.

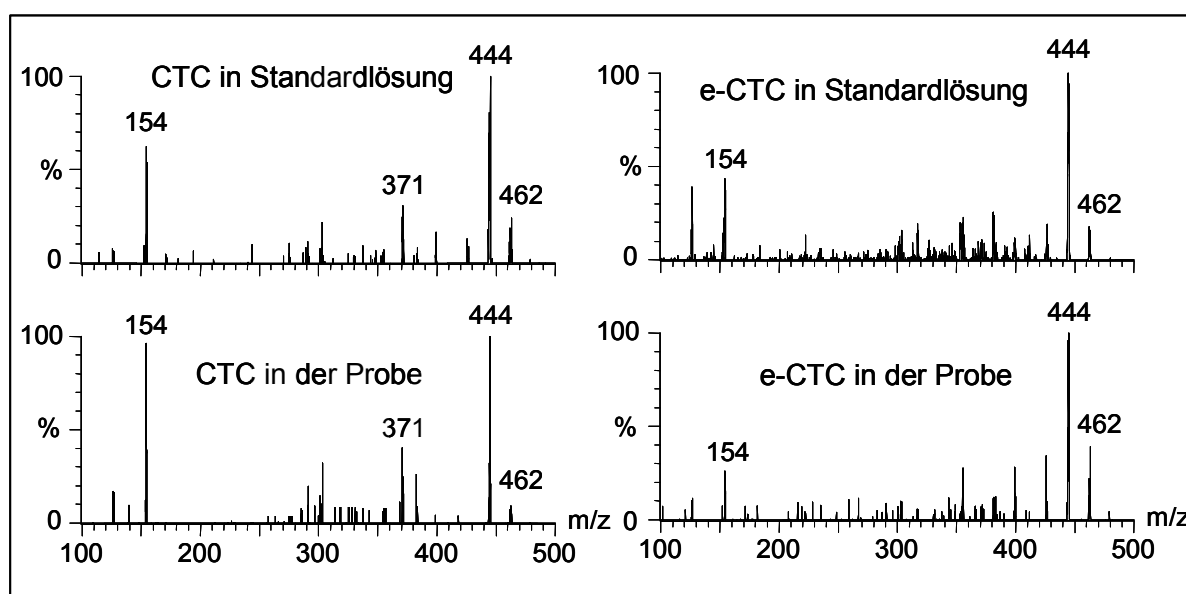


Abb. 22: Selektivitätstest durch Vergleich der MS-Spektren (Produkt-Ionen-Scan des Precursor-Ions mit  $m/z$  479) von CTC und e-CTC in Standardlösung ( $\beta = 1 \text{ mg/L}$ ) und in einer Muskulaturprobe (Tier 95, FAL)

Die durchgeführten Spektren-Vergleiche von CTC und e-CTC zeigen sowohl für die UV-Detektion als auch für die massenspektrometrische Detektion eine gute Übereinstimmung zwischen Standardlösung und Muskulaturprobe und geben damit deutliche Hinweise auf die Selektivität des Verfahrens.

Darüberhinaus muß die Peakreinheit über den gesamten Peak gewährleistet sein. Hierzu wurden Chromatogramme einer Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC und einer Muskulaturprobe aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte für die UV-Detektion im Bereich von 250 nm bis 400 nm, für die Produktionen-Spektren im Bereich von  $m/z$  100 bis  $m/z$  500. Zur Bestimmung der Peak-Reinheit wurden jeweils fünf über den nicht geglätteten Peak verteilte Spektren miteinander verglichen. Die Übereinstimmung der einzelnen Spektren wird prozentual angegeben, wobei eine Peakreinheit von 100 % völlig identische und 0 % völlig verschiedene Spektren bedeutet. Die Peak-Reinheiten wurden für CTC und e-CTC für beide Detektionsarten ermittelt und lagen für beide Substanzen sowohl bei der UV-Detektion als auch bei der MS-Detektion zwischen 92 % und 98 %. Damit wurde

eine nahezu völlige Peak-Reinheit ermittelt.

Zusammenfassend kann mit den in **Kap. 5.3.3.1** und **Kap. 5.3.3.2** erhaltenen Ergebnissen die Selektivität des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Mukulatur als gesichert angesehen werden.

### 5.3.4 Systematische und zufällige Fehler

Einzelne Verfahrensschritte wie z. B. Probenaufschluß, Probenextraktion und Derivatisierung sowie Matrixeffekte und Reagenzien sind in ihrem Einfluß auf die Präzision und Richtigkeit zu überprüfen [244, 288, 289]. Dementsprechend ist zwischen systematischen und zufälligen Fehlern zu differenzieren. Die Richtigkeit von Werten bezieht sich auf die Übereinstimmung des Mittelwertes aus vielen Messungen mit dem wahren Wert. Das Maß für die Richtigkeit ist eine theoretische Größe. Als Maß für die Richtigkeit wird jedoch im allgemeinen die systematische Ergebnisabweichung verwendet. Diese Abweichungen können durch Berechnung der Wiederfindungsfunktion ermittelt werden. Während die Richtigkeit das Ausmaß des systematischen Fehlers beschreibt, ist die Präzision eine qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der gegenseitigen Annäherung voneinander unabhängiger Ergebnisse bei mehrfacher Anwendung eines Verfahrens unter vorgegebenen Bedingungen und somit ein Maß für den zufälligen Fehler. Der Begriff Genauigkeit beschreibt qualitativ die gesamten systematischen und zufälligen Abweichungen vom wahren Wert, da jedes Analysenverfahren mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist. Die Genauigkeit definiert die Annäherung von einzelnen Meßergebnissen an den wahren Wert. Sie wird bestimmt, indem die Richtigkeit und Präzision ermittelt werden.

Einzelne Verfahrensschritte und Matrixeffekte können sich in einer Erhöhung der Unpräzision und/oder als konstant- oder proportional-systematische Fehler der Analysenergebnisse von den „wahren“ Werten äußern. Bei konstant-systematischen Fehlern ist der Analysenfehler unabhängig von der Konzentration der Analyten, was zu einer Parallelverschiebung der Kalibriergeraden in der Matrix gegenüber der Kalibriergeraden mit reinen Standardlösungen führt. Proportional-systematischen Fehler sind abhängig von der Konzentration der analysierten Komponente. Dies führt zu einer Änderung der Steigung der Kalibriergeraden in Matrix im Vergleich zu der mit reinen Standardlösungen. Sowohl zur Überprüfung einzelner Verfahrensschritte als auch zur Feststellung von Matrixbeeinflussung kann die Berechnung der Wiederfindungsfunktion herangezogen werden, die es erlaubt, systematische Fehler aufzudecken [289, 290]. Neben der Matrixbeeinflussung bei der Probenvorbereitung sind bei LC-MS/MS-Verfahren vor allem Matrixeffekte bei der ESI-Ionisierung zu berücksichtigen [303, 309].

#### 5.3.4.1 Richtigkeit

Ziel der Wiederfindungsexperimente und der Aufstellung der Wiederfindungsfunktion ist die Ermittlung des Einflusses einzelner Verfahrensschritte auf das Analysenverfahren. Die Untersuchungen erfolgten über den gesamten Arbeitsbereich. Zur Aufdeckung systematischer Fehler wurden in einem ersten Schritt jeder einzelne Kalibrierstandard der Probenvorbereitung unterzogen. Hierzu wurde MeOH/EDTA-McIlvaine-Puffer pH 4 (0,01 mol/L) (20/80) (v/v), das Extraktionsmittel für Muskulatur, mit 0,005; 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1 und 2 µg CTC dotiert, mittels SPE aufgearbeitet und mit HPLC-UV-MS/MS vermessen. In einem zweiten Schritt erfolgte zur Aufdeckung matrixbedingter systematischer Fehler die Aufarbeitung und Messung CTC dotierter Muskulaturproben der Gehalte 0,001; 0,004; 0,02; 0,04; 0,1; 0,2 und 0,4 mg/kg. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden die Wiederfindungsfunk-

tionen und daraus die Wiederfindungen berechnet. Die CTC-Gehalte in den Meßproben sowie die Wiederfindungen wurden als Summe von CTC und e-CTC ermittelt.

### Aufarbeitung CTC-dotierter Extraktionsmittel

Mit der in **Kap. A. 6** im Anhang beschriebenen Berechnung haben sich für die UV- und MS/MS-Detektion folgende Wiederfindungsfunktionen für die Extraktion mit Standardlösungen ergeben (**Abb. A. 9** im Anhang):

$$x_f = 0,0393 \text{ mg/L} + 1,0466 x_c \quad R^2 = 0,9999 \quad (\text{UV-Detektion})$$

$$x_f = 0,0394 \text{ mg/L} + 1,0061 x_c \quad R^2 = 0,9999 \quad (\text{MS/MS-Detektion})$$

Bei den ermittelten Wiederfindungsfunktionen beziehen sich die  $x_c$ -Werte auf die zudotierten CTC-Konzentrationen. Die  $x_f$ -Werte setzen sich aus den ermittelten CTC- und e-CTC-Gehalten zusammen. Eine wichtige Voraussetzung für die Aussagefähigkeit der Wiederfindungsfunktion ist die Gleichwertigkeit der Verfahrensstandardabweichungen  $s_{x_0}$  der Kalibrierfunktion des analytischen Grundverfahrens und der Wiederfindungsfunktion. Einzelne Probenvorbereitungsschritte können zu deutlich höherer Unpräzision der Kalibrierung führen, so daß eventuell vorliegende systematische Fehler verdeckt werden. Daher werden die Verfahrensstandardabweichung der Kalibrierfunktion des Grundverfahrens  $s_{x_0}$  und die Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion  $s_{y_f}$  mittels F-Test auf signifikanten Unterschied geprüft. Ist  $PG > F$  ( $f_1 = f_2 = N_c - 2$ ,  $P = 99\%$ ), so liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Standardabweichungen vor und es kann keine Aussage über das Nicht-Vorhandensein systematischer Abweichungen gemacht werden. Die Reststandardabweichungen betrugen für die Wiederfindungsfunktion der *UV-Detektion*  $s_{y_f} = 0,280 \text{ mg/L}$  und der *MS/MS-Detektion*  $s_{y_f} = 0,040 \text{ mg/L}$ . Die Verfahrensstandardabweichungen der Kalibrierfunktionen wurden für die *UV-Detektion* zu  $s_{x_{0c}} = 0,312 \text{ mg/L}$  und für die *MS/MS-Detektion* zu  $s_{x_{0c}} = 0,068 \text{ mg/L}$  ermittelt. Die ermittelten Prüfwerte lagen mit  $PG = 0,1103$  für die *UV-Detektion* und  $PG = 0,2052$  für die *MS/MS-Detektion* unterhalb der Tabellenwerte von  $F = 29,17$  ( $N_c = 5$ ) und  $F = 10,97$  ( $N_c = 7$ ) und damit liegt kein signifikanter Unterschied der Analysenpräzision von den analytischen Grundverfahren und den Wiederfindungsfunktionen vor, womit die Gleichwertigkeit der Analysenpräzision der jeweiligen Kalibrierfunktion und der Wiederfindungsfunktion belegt worden ist.

Aufgrund von zufälligen Fehlern, also einer Streuung der Meßwerte, ergeben sich als Achsenabschnitt und Steigung der Wiederfindungsfunktion niemals die Idealwerte  $a_f = 0$  und  $b_f = 1$ . Zur Beurteilung des Vorliegens systematischer Fehler müssen daher die Vertrauensbereiche von  $a_f$  und  $b_f$  ermittelt werden. Eine **konstant-systematische Fehler** liegt mit 95%iger statistischer Sicherheit vor, wenn der Vertrauensbereich  $VB(a_f)$  nicht den Wert  $a_f = 0$  einschließt. Entsprechend gilt, daß eine **proportional-systematische Fehler** mit 95%iger Sicherheit vorliegt, wenn der Vertrauensbereich  $VB(b_f)$  den Wert  $b_f = 1$  nicht einschließt. Es wurden folgende Vertrauensbereiche für die Steigung  $b_f$  und den Achsenabschnitt  $a_f$  ermittelt:

UV-Detektion:

$$VB(a_f) = 0,0393 \pm 0,2987 \text{ mg/L}$$

$$VB(b_f) = 1,0466 \pm 0,0580$$

MS/MS-Detektion:

$$VB(a_f) = 0,0394 \pm 0,0501 \text{ mg/L}$$

$$VB(b_f) = 1,0061 \pm 0,0115$$

Für beide Detektionsarten schließen die Vertrauensbereiche für  $a_f$  den Wert Null und für  $b_f$  den Wert 1 mit ein, weshalb das Vorliegen von konstant-systematischen und proportional-systematischen Feh-



lern ausgeschlossen werden kann. Anhand der Wiederfindungsfunktion läßt sich bei Ausschluß konstant-systematischer Fehlern die Wiederfindung von CTC nach der im Anhang angegebenen Formel, siehe **Kap. A. 6.7**, berechnen und sie betrug für die UV-Detektion 104,7 % und für die MS/MS-Detektion 100,6 %.

### Aufarbeitung CTC-dotierter Muskulaturproben

Entsprechend der Vorgehensweise für dotierte Extraktionsmittel wurde für Muskulatur sowohl für UV-Detektion als auch für MS/MS-Detektion die Wiederfindungsfunktionen ermittelt (**Abb. A. 10** im Anhang), deren Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,9998$  (UV-Detektion) und  $R^2 = 0,9988$  (MS/MS-Detektion) betrugen. Die Reststandardabweichungen betrugen für die *UV-Detektion*  $s_{yf} = 0,281$  mg/L und für die *MS/MS-Detektion*  $s_{yf} = 0,0947$  mg/L. Um zu überprüfen, ob die erhaltenen Reststandardabweichungen gleichwertig mit den Verfahrensstandardabweichungen  $s_{x0}$  der Kalibrierfunktionen des analytischen Grundverfahrens sind, wurden wiederum beide Standardabweichungen mittels F-Test auf signifikanten Unterschied geprüft. Die ermittelten Prüfgrößen lagen mit  $PG = 0,14$  für die *UV-Detektion* und  $PG = 1,33$  für die *MS/MS-Detektion* unterhalb der tabellierten Werte von  $F = 29,17$  ( $N_c = 5$ ) und  $F = 10,97$  ( $N_c = 7$ ), womit kein signifikanter Unterschied der Analysenpräzision von den analytischen Grundverfahren und den Wiederfindungsfunktionen vorliegt. Zur Prüfung auf systematische Fehler sind sowohl für die UV-Detektion als auch für die MS/MS-Detektion die Vertrauensbereiche von dem Achsenabschnitt  $a_f$  und der Steigung  $b_f$  berechnet worden. Es wurden folgende Vertrauensbereiche für die Steigung  $b_f$  und den Achsenabschnitt  $a_f$  ermittelt:

UV-Detektion:

VB ( $a_f$ ) =  $0,0218 \pm 0,2852$  mg/L

VB ( $b_f$ ) =  $0,8590 \pm 0,0554$

MS/MS-Detektion:

VB ( $a_f$ ) =  $-0,0576 \pm 0,1182$  mg/L

VB ( $b_f$ ) =  $0,6880 \pm 0,0272$

Für beide Detektionsarten wurde kein konstant-systematischer Fehler festgestellt, jedoch ergaben die Vertrauensbereiche der Steigung  $b_f$  im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Standardlösungen Hinweise auf einen proportional-systematischen Fehler, da die Vertrauensbereiche von  $b_f$  den Wert 1 nicht einschließen. Bei Vorliegen von ausschließlich proportional-systematischen Abweichungen ist  $a_f \approx 0$ , also die Wiederfindung unabhängig von  $x_c$  und damit allein durch  $b_f$  bestimmt, so daß die Wiederfindung nach der in **Kap. A. 6.7** im Anhang angegebenen Formel berechnet werden kann. Die Wiederfindungen von CTC liegen für die UV-Detektion bei 86 % und für die MS/MS-Detektion bei 73 % und unterscheiden sich damit deutlich. Möglicherweise spielen im Gegensatz zu der UV-Detektion bei der MS/MS-Detektion signalsuppressive Effekte eine Rolle.

Bei sehr vielen Analysenverfahren liegt ein proportional-systematischer Fehler vor, da in den meisten Fällen, insbesondere bei der Aufarbeitung komplexer biologischer Proben, keine vollständige Extraktion der Analyten erfolgt. Nach der EU-Richtlinie sind Meßwerte als richtig zu betrachten, wenn die Wiederfindung zwischen 70 % und 110 % liegt. Daher können sowohl die Ergebnisse, ermittelt mit UV-Detektion, als auch mit MS/MS-Detektion unter Berücksichtigung der statistischen Streuung als richtig angesehen werden. Die Kalibrierung mittels externer Standardmethode kann deshalb beibehalten werden.

Die ermittelten Wiederfindungen liegen im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. Für Muskulatur werden Wiederfindungen im Bereich von 55 % bis 83 % angegeben [170, 194, 210, 304], wobei einerseits die zugrunde liegende Berechnung nicht ersichtlich ist und andererseits bei vielen

Verfahren nur der Wirkstoff, das Epimere nicht bestimmt wird.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte trotz des Ausschließens eines konstant-systematischen Fehlers für Muskulaturproben eine Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung von CTC bei der MS/MS-Detektion, nicht jedoch bei der UV-Detektion, festgestellt werden (siehe **Tab. 17**), was deutliche Hinweise auf signalsuppressive Matrixeffekte bei der ESI-MS/MS-Detektion gibt.

*Tab. 17: Ermittelte Wiederfindungen ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) nach Extraktion von CTC-dotierter Muskulaturproben (HPLC-UV-MS/MS) ( $n = 7$ )*

Konzentration [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Wiederfindung UV-Detektion [%]	Wiederfindung MS/MS-Detektion [%]
2	---	97
8	---	80
40	86	72
80	89	69
200	82	67
400	80	66
800	88	60

Eine Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung bei der MS/MS-Detektion wird in der Literatur ebenfalls beschrieben. Während bei der Bestimmung von CTC in Gewebeproben mit der UV-Detektion unabhängig von der Konzentration meist gleiche Wiederfindungen ermittelt werden [176, 224, 279], stellten BLANCHFLOWER et al. für CTC in Muskulatur mit der MS-Detektion ebenfalls mit zunehmender Konzentration geringere Wiederfindungen fest [210].

Auf suppressive Matrixeffekte bei der massenspektrometrischen Detektion während der Ionisierung in der ESI-Quelle, insbesondere bei komplexen biologischen Proben, weisen verschiedene Autoren hin [305, 306, 307]. Als Ursache für diese Matrixeffekte können neben einer Co-Elution der Analyten mit Matrixkomponenten auch eine Überladung der analytischen Säule mit Matrixkomponenten, die zu einer verschleppten Co-Elution führt, eine Rolle spielen [308]. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob die festgestellte Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung von CTC bei der ESI-MS/MS-Detektion auf signalsuppressive Matrixeffekte zurückzuführen ist.

#### 5.3.4.2 Matrixbedingte Signalbeeinflussung bei der ESI-MS/MS-Detektion

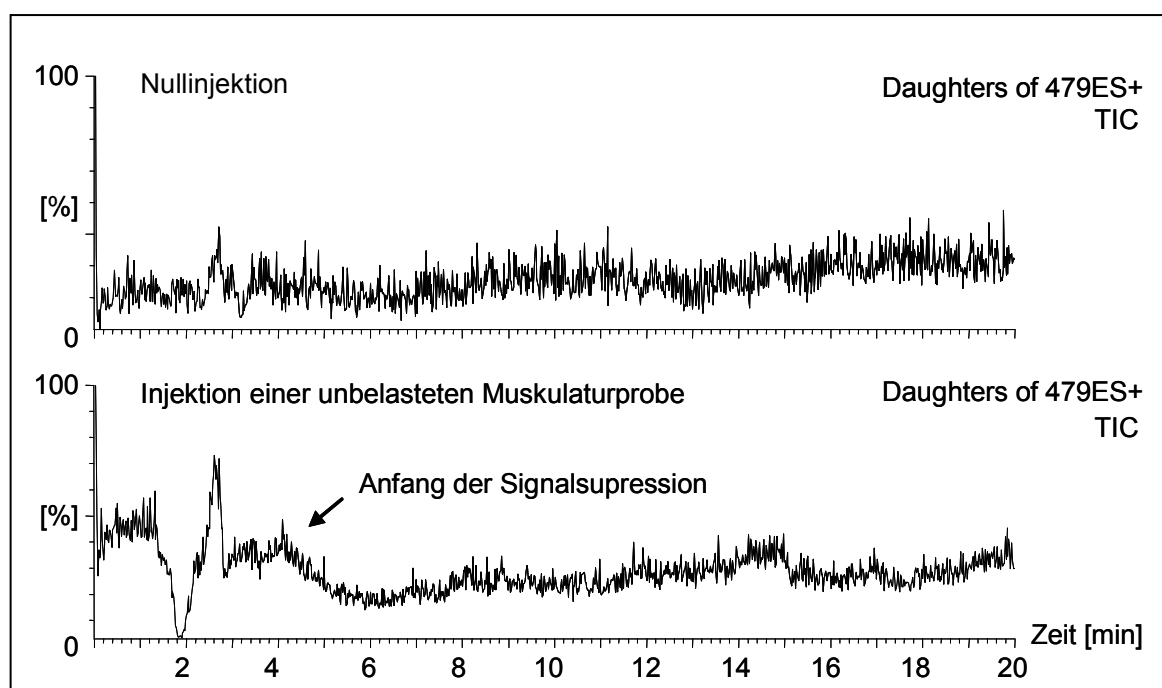
Zur Aufdeckung von Matrixeffekten bei der ESI-MS/MS-Detektion gibt es hauptsächlich zwei Möglichkeiten:

- „Post column“-Infusion des Analyten in das HPLC-Eluat
- Vergleich von Kalibrierstandards in Matrix mit denen in Solvent

##### Kontinuierliche „post-column“-Infusion von CTC

Eine Möglichkeit zur Aufdeckung von Matrixeffekten bei der ESI-MS/MS-Detektion ist die kontinuierliche „post column“-Infusion einer Standardlösung zum HPLC-Fluß vor der ESI-MS/MS-

Detektion. Durch Vergleich der Chromatogramme, erhalten durch Nullinjektion, mit den nach Injektion einer aufgearbeiteten unbelasteten Muskulaturprobe können Matrixeffekte aufgezeigt werden. Treten keine Matrixeffekte auf, so sollten die erhaltenen Chromatogramme der Nullinjektion sowie der Muskulaturextraktinjektion identisch aussehen. In **Abb. 23** sind die durch Nullinjektion und Injektion einer Muskulaturprobe und „post-column“-Infusion von CTC erhaltenen Chromatogramme dargestellt. Es wurde während des gesamten Chromatographielaufes (Gradientenmethode) kontinuierlich über eine Spritzenpumpe eine CTC-Standardlösung der Konzentration 10 mg/L „post column“ zum HPLC-Fluß zugeführt. Die MS/MS-Detektion erfolgte durch Aufnahme eines Produkt-Ionen-Scans des Precursor-Ions  $m/z$  479.



*Abb. 23: MS-Chromatogramme (Produkt-Ionen-Scan des Precursor-Ions  $m/z$  479), aufgenommen durch kontinuierliche post column-Infusion einer CTC-Lösung ( $\beta = 10$  mg/L) während des HPLC-Laufes: Nullinjektion (oben) und Injektion eines Muskulaturextrakts (unten)*

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß es ab einer Retentionszeit von vier Minuten zu einer Signalsuppression kommt, da sich im Falle der Injektion eines Muskulaturextrakts im Gegensatz zur Nullinjektion ein abfallender Kurvenverlauf ergibt.

### Vergleich von Kalibrierstandards in Matrix mit denen in Solvent

Zur Überprüfung einer Signalbeeinflussung durch Matrixkomponenten während der Ionisierung in der ESI-Quelle bei der MS/MS-Detektion wurden in einem ersten Schritt Matrixstandards hergestellt und diese mit den entsprechenden Solventstandards verglichen. Zur Herstellung der Matrixstandards wurden unbelastete Muskulaturproben aufgearbeitet und die hierbei erhaltenen Extrakte vor der LC-MS/MS-Analyse mit CTC dotiert. In **Tab. 18** sind die Wiederfindungen von CTC in Matrixstandards bezogen auf CTC in Solventstandards dargestellt.

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen, daß mit der UV-Detektion konstante Wiederfindungen erzielt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß es bei der Detektion mit ESI-MS/MS mit

zunehmender Konzentration zu einer verstärkten Signalsuppression kommt.

Tab. 18: Wiederfindung ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in aufgearbeiteten Muskulaturproben, vor der HPLC-UV-MS/MS-Analyse mit CTC dotiert ( $n = 5$ )

CTC-Konzentration [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Wiederfindung [%]	
	UV	MS/MS
20	82	82
80	85	74
800	83	65

Zusammenfassend konnte anhand der „post-column“-Infusion von CTC gezeigt werden, daß es zu einer Signalsuppression kommt. Darüber hinaus verdeutlichte der Vergleich von Matrixstandards mit Solventstandards, daß mit zunehmender Konzentration eine höhere Signalsuppression auftritt, was die Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung erklärt. Zur Kompensation dieser Matrixeffekte eignet sich nur die Kalbrierung nach dem Standardadditionsverfahren [309], die jedoch sehr zeitaufwendig ist. Bei diesem LC-MS/MS-Verfahren sind insgesamt jedoch signalsuppressive Effekte für die Bestimmung von CTC in Muskulatur mit diesem Verfahren zu vernachlässigen, da die Richtigkeit des Verfahrens bereits in **Kap. 5.3.4.1** bewiesen wurde. Diese Untersuchungen zeigen darüber hinaus, daß auch bei der MS/MS-Detektion ein „clean up“ der Proben sowie eine chromatographische Trennung der Analyten, insbesondere von Matrixkomponenten, von entscheidender Bedeutung ist.

### 5.3.4.3 Präzision

Unter der Präzision wird die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse verstanden und gibt die Streuung einzelner Ergebnisse als Folge von zufälligen Fehlern an. Als Maß für zufällige Fehler gilt die Meß- und Methodenpräzision, wobei sich die Meßpräzision auf zufällige Fehler, die durch das Analysengeräte selbst bedingt sind, und die Methodenpräzision auf zufällige Fehler bei der Durchführung des gesamten Analysenverfahrens bezieht. Die Präzision wird meist in Form der relativen Standardabweichung  $s_{\text{rel}}$  ausgedrückt.

#### Meßpräzision

Die Ermittlung der Meßpräzision in Standardlösungen ist bereits bei der Aufstellung der Kalibriergeraden in **Kap. 5.3.1.1** erfolgt. Sie liegt für CTC und e-CTC zwischen 1 % und 3 % mit *UV-Detektion* und zwischen 2 % und 6 % mit *MS/MS-Detektion*. Zur Ermittlung der Meßpräzision in Realproben wurden fünf CTC-haltige Muskulaturproben der Tiere 93-97 aus der Medikationsstudie FAL aufgearbeitet und mittels HPLC-UV-MS/MS achtfach analysiert. Da die erhaltenen CTC-Gehalte bis auf die des Tieres 95 unterhalb der Nachweisgrenze der UV-Detektion lagen, erfolgte die Auswertung ausschließlich über *MS/MS-Daten*. Die erhaltenen Mittelwerte der Konzentrationen sowie die relativen Standardabweichungen für CTC und e-CTC sind in **Tab. 19** dargestellt. Mit Werten zwischen 3 % bis 8 % entsprechen die relativen Standardabweichungen der für CTC und e-CTC in Standardlösungen ermittelten Werten von 2 % bis 6 % und belegen damit die hohe Präzision des LC-MS/MS-Verfahrens. Die ermittelten Meßpräzisionen liegen damit weit unter den in der EU-Richtlinie 657 akzeptierten Grenze von 20 % für die wiederholte Analyse von Realproben [296].

Tab. 19: Meßpräzision der CTC- und e-CTC-Bestimmung in Muskulatur mit LC-MS/MS  
(FAL-Proben,  $n = 8$ )

Muskelprobe	Tier 93	Tier 94	Tier 95	Tier 96	Tier 97
$\bar{x}$ (CTC) [ $\mu\text{g/kg}$ ]	3,04	2,26	100,80	2,95	3,13
$s_{\text{rel}}$ (CTC) [%]	5	6	3	5	5
$\bar{x}$ (e-CTC) [ $\mu\text{g/kg}$ ]	1,26	1,23	45,20	1,24	1,35
$s_{\text{rel}}$ (e-CTC) [%]	6	5	3	8	7

### Methodenpräzision

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurden ebenfalls fünf CTC-haltige Muskulaturproben der Tiere 93-97 aus der Medikationsstudie FAL eingesetzt. Die Muskulaturproben wurden in fünfmal acht Aliquote aufgeteilt, getrennt aufgearbeitet und der CTC-Gehalt mittels LC-MS/MS bestimmt. Die berechneten Mittelwerte der Konzentrationen und die relativen Standardabweichungen sind in **Tab. 20** aufgeführt.

Tab. 20: Methodenpräzision der CTC- und e-CTC-Bestimmung in Muskulatur mit LC-MS/MS  
(FAL-Proben,  $n = 8$ )

Muskelprobe	$\bar{x}$ (CTC) [ $\mu\text{g/kg}$ ]	$s_{\text{rel}}$ (CTC) [%]	$\bar{x}$ (e-CTC) [ $\mu\text{g/kg}$ ]	$s_{\text{rel}}$ (e-CTC) [%]	$\bar{x}$ ( $\Sigma$ CTC + e-CTC) [ $\mu\text{g/kg}$ ]	$s_{\text{rel}}$ ( $\Sigma$ CTC + e-CTC) [%]
Tier 93	2,94	7	1,24	9	4,18	9
Tier 94	2,08	8	1,36	9	3,45	8
Tier 95	97,90	7	53,64	6	151,54	6
Tier 96	2,58	6	1,38	8	3,96	7
Tier 97	3,14	7	1,64	9	4,78	8

Die Methodenpräzisionen sind mit Werten zwischen 6 % und 9 % nur geringfügig größer als die Meßpräzisionen. Damit liegen die Werte weit unterhalb der Angaben in Literaturverfahren, für die Methodenpräzisionen bis zu 40 % beschrieben werden [172, 210, 221, 239]. Da die Epimerisierungsrate in Abhängigkeit von der Temperatur und der Dauer der Probenvorbereitung zwischen 10 % und 20 % differieren kann, siehe **Kap. 5.2.2.4**, könnte dies bei der Aufarbeitung der Proben an unterschiedlichen Tagen beispielsweise zu deutlich schlechteren Methodenpräzisionen führen. Möglicherweise ist das der Grund, warum OKA et al. für die Bestimmung von CTC in Muskulatur und Niere mit UV-Detektion deutlich höhere Methodenpräzisionen von bis zu 40 % fanden [172]. Zudem bleiben bei den meisten in der Literatur beschriebenen Verfahren die Epimere unberücksichtigt.

Dies belegt die Notwendigkeit, einerseits den CTC-Gehalt selbst sowie andererseits auch die Methodenpräzision aufgrund der nicht immer konstanten Epimerisierungsrate als Summe von CTC und e-CTC anzugeben.

### 5.3.5 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Muskulatur

Im Rahmen der für Muskulatur durchgeführten Validierung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens ergab sich für die UV-Detektion ein linearer Bereich von 0,1 mg/L bis 100 mg/L. Für die MS/MS-Detektion ergab sich im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,005 mg/L bis 50 mg/L kein linearer Zusammenhang zwischen Analyt-Konzentration und dem Detektorsignal, sondern eine polynomische Funktion 2. Grades. Durch Aufteilung des Arbeitsbereiches in drei Teilbereiche (0,005-0,08 mg/L, 0,1-0,5 mg/L und 1-50 mg/L) konnte eine Linearität erreicht werden. Die relativen Verfahrensstandardabweichungen  $V_{x0}$  lagen für die UV-Detektion bei 1,7 % für CTC und 1,4 % für e-CTC. Für die MS/MS-Detektion wurden Werte zwischen 2,1 % und 6,2 % erhalten. Damit konnte die gute Leistungsfähigkeit des Analysenverfahrens für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Muskulatur sowohl für die UV- als auch MS/MS-Detektion belegt werden.

Als Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden für CTC und e-CTC mit der UV-Detektion 3 µg/kg (= 0,08 mg/L) und 8 µg/kg (= 0,2 mg/L), mit der MS/MS-Detektion 0,1 µg/kg (= 0,003 mg/L) und 0,3 µg/kg (= 0,008 mg/L) ermittelt.

Der Selektivitätsnachweis des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens erfolgte nach den in der EU-Richtlinie 2002/657/EG geforderten Kriterien [296] durch einen Vergleich der Retentionszeiten, der UV-Spektren, der MS-Spektren, der Produkt-Ionen-Intensitäten der Analyten in einer Standardlösung und in einer Realprobe sowie durch eine für CTC und e-CTC charakteristische Peaklöschung nach alkalischer Behandlung der Probe. Bei der UV-Detektion ist jedoch einschränkend zu erwähnen, daß eine Quantifizierung von CTC und e-CTC nur bei einer Wellenlänge von 370 nm (zweites Absorptionsmaximum) erfolgen darf, da es unterhalb einer Wellenlänge von 350 nm zur Überlagerung von störenden Begleitkomponenten kommt und damit in diesem Wellenlängenbereich keine Selektivität mehr gegeben ist.

Zur Beurteilung der Richtigkeit der Analysenergebnisse wurden die Wiederfindungsfunktionen ermittelt. Proportional-systematische Fehler konnten ausgeschlossen werden. Es ergab sich sowohl mit der UV- als auch mit der MS/MS-Detektion ein Hinweis auf einen proportional-systematischen Fehler. Die aus den Wiederfindungsfunktionen berechneten Wiederfindungen betrugen für die UV-Detektion 86 % und für die MS/MS-Detektion 73 %. Da die ermittelten Wiederfindungen in dem in der EU-Richtlinie 2002/657/EG [296] angegebenen akzeptierten Bereich von 70 % bis 110 % liegen, wurde somit die Richtigkeit des Verfahrens nachgewiesen. Dennoch wurde eine Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung festgestellt. Es wurde gezeigt, daß die Ursache hierfür in einer Signalsuppression bei der ESI-MS/MS-Detektion, die mit steigender Konzentration zunimmt, liegt.

Die Charakterisierung der Präzision erfolgte durch Ermittlung der Meß- und Methodenpräzision mit der MS/MS-Detektion. Dabei wurden für die Meßpräzision Werte um 5 % für CTC und 6 % für e-CTC ermittelt. Für die Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen ergaben sich Werte von 7 % für CTC und 8 % für e-CTC und sind nur geringfügig höher als die Meßpräzisionen.

Das entwickelte HPLC-UV-MS/MS-Verfahren wurde einer ausführlichen Validierung unterworfen, wodurch eine qualitative Bewertung der damit erzielten Ergebnisse ermöglicht wird. Erstmalig erfolgte hierbei auch eine Berücksichtigung des Epimers. Eine Besonderheit dieses Analysenverfahrens stellt die Kopplung der UV- mit der MS/MS-Detektion dar. Ein Leistungsvergleich beider Detektion-

sarten zeigt, daß mit der UV-Detektion eine Selektivität nur im begrenztem Ausmaß gegeben ist und darüber hinaus die erzielten Bestimmungsgrenzen deutlich höher liegen als bei der MS/MS-Detektion. Aus diesen Gründen werden signalsuppressive Effekte bei der MS/MS-Detektion in Kauf genommen und dieser Detektionsart meist der Vorzug gegeben.

### 5.3.6 Validierung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Urin, Faeces, Plasma, Knochen, Leber und Niere

Für Urin, Faeces, Plasma, Knochen, Leber und Niere wurden als Validierungsparameter die **Wiederfindung** auf zwei Konzentrationsstufen, die **Methodenpräzision** sowie die **Nachweis- und Bestimmungsgrenze** ermittelt. Als Probenmaterial für diese Validierungsuntersuchungen diente, mit Ausnahme von Faeces, die im Rahmen der Haus Düsse-Studie entnommenen Proben der unbehandelten Kontrolltiere. Die eingesetzten Faecesproben stammten aus der FAL-Studie, wobei als unbelastetes Probenmaterial die vor Beginn der Medikation entnommenen Nullproben zur Verfügung standen. Die erhaltenen Validierungsparameter für die verschiedenen Matrices sind in **Tab. 21** zusammengefaßt. Die in **Tab. 21** angegebenen Wiederfindungen beziehen sich ausschließlich auf MS/MS-Daten, da eine Auswertung der durch UV-Detektion erhaltenen Chromatogramme nicht für alle Matrices im gewählten Konzentrationsbereich aufgrund einer mangelnden Selektivität möglich war.

Tab. 21: Validierungsparameter des Verfahrens für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Urin-, Plasma-, Faeces- und Schlachtproben (LC-MS/MS) (n = 6)

Matrix	CTC-Konz.	WF ( $\Sigma$ CTC + e-CTC) [%]	Methoden- präzision ( $\Sigma$ CTC + e-CTC) s <sub>rel</sub> [%]	NWG*	BG*
Urin	10 µg/L	107	6	0,1 µg/L	0,3 µg/L
	100 µg/L	86			
Plasma	10 µg/L	74	6	0,1 µg/L	0,3 µg/L
	100 µg/L	62			
Faeces	50 mg/kg	93	6	70 µg/kg	140 µg/kg
	500 mg/kg	91			
Leber	10 µg/kg	40	5	0,3 µg/kg	0,5 µg/kg
	100 µg/kg	36			
Niere	10 µg/kg	72	7	0,3 µg/kg	0,5 µg/kg
	100 µg/kg	61			
Knochen (CTC- haltige Pro- ben)	--		19	2,5 µg/kg	5 µg/kg

\* Die angegebenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen gelten sowohl für CTC als auch für e-CTC.

Die ermittelten Wiederfindungen lagen mit Werten von 36 % bis 107 % im Bereich der Wiederfindungen, die auch in der Literatur angegeben werden [252, 258, 272, 285, 310]. Die Wiederfindungen

für Leber sind mit Werten von 36 % bis 40 % sehr niedrig, entsprechen aber den Ergebnissen von CHERLET et al. [310], die in Schweineleber für CTC und e-CTC Wiederfindungen von nur 15 % bis 20 % angeben, hingegen in Muskulatur und Niere 45 % bis 50 % wiederfanden. Hervorzuheben ist die Aufarbeitung von Urin und Faeces, für die Wiederfindungen zwischen 91 % und 107 % erzielt werden konnten. Nach der EU-Richtlinie 2002/657/EG sind Analysenergebnisse dann als richtig zu betrachten, wenn die Wiederfindung in Abhängigkeit von der Konzentration zwischen 70 % und 110 % liegt. Dies ist jedoch insbesondere bei der MS/MS-Detektion aufgrund signalsuppressiver Effekte oft nicht gegeben, so daß auch Wiederfindungen, die darunter liegen, aber reproduzierbar sind, als akzeptabel zu betrachten sind.

Im Rahmen der durchgeführten **Wiederfindungsuntersuchungen** wurde ebenso wie für Muskulatur mit Ausnahme von Faeces eine Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung festgestellt. Für Muskulatur konnte in **Kap. 5.3.4.2** gezeigt werden, daß es sich hierbei um signalsuppressive Effekte bei der ESI-MS/MS-Detektion, die mit steigender Konzentration zunehmen, handelt. Möglicherweise treten bei den anderen Matrices ähnliche Effekte auf. Auf entsprechende Untersuchung der übrigen Matrices wurde in dieser Arbeit verzichtet. Lediglich für Leber erfolgte aufgrund der geringen Wiederfindung eine Untersuchung der Signal-Suppression bei der MS/MS-Detektion, die zwischen 50 % und 60 % lag. Eine weitere Aufreinigung der erhaltenen Leberextrakte erfolgte trotz der hohen Suppression im Rahmen dieser Arbeit nicht. Bei der Bestimmung von CTC und e-CTC in Faeces konnte als einzige Matrix keine Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung festgestellt werden. Grund hierfür könnte sein, daß das Eluat der SPE verdünnt wird und damit signalsuppressive Effekte bei der MS/MS-Detektion keine Rolle mehr spielen.

Für die **Methodenpräzision** wurden mit Ausnahme von Knochen Werte von 5 % bis 7 % erhalten, die nur geringfügig oberhalb der Meßpräzision von 2 % bis 5 % für CTC und e-CTC in Standardlösungen lagen. Im Vergleich mit den in der Literatur gemachten Angaben für die Methodenpräzision in den unterschiedlichen Matrices von 4 % bis 18 % zeichnet sich das entwickelte Analysenverfahren durch eine hohe Präzision aus. Die Methodenpräzision für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Knochen liegt mit 19 % sehr hoch und ist etwa doppelt so hoch wie die von KÜHNE et al. [285] ermittelten Werte von 8,8 %. Ursache hierfür ist vermutlich der Mahlgrad der Knochen, da mit der eingesetzten Knochenmühle nur ein geringer Mahlgrad erzielt wurde und damit die Reproduzierbarkeit der Extraktion niedrig war.

Die **Bestimmungsgrenzen** für Urin, Plasma, Leber und Niere lagen im Bereich von 0,3-0,5 µg/L oder µg/kg und entsprachen damit Literaturverfahren, bei denen Bestimmungsgrenzen von 10-125 µg/L für Urin [213, 247, 252], 10-20 µg/L für Plasma [152, 233, 258] und von 2-230 µg/kg für Leber und Niere [147, 177, 187, 224, 239, 279, 310] angegeben werden. Die für Knochen ermittelte Bestimmungsgrenze von 5 µg/kg stimmt gut mit den Angaben von KÜHNE et al. überein, die für die Bestimmungsgrenze von CTC in Knochen ebenfalls 5 µg/kg angeben [285]. Die hohe Nachweis- und Bestimmungsgrenze von 140 µg/kg für CTC und e-CTC in Faeces ist dadurch bedingt, daß das Eluat der Festphasenextraktion nicht eingeeengt, sondern aufgrund der hohen Gehalte in Realproben verdünnt wurde. Diese Bestimmungsgrenze liegt aber immer noch unterhalb der von SUNDERLAND et al. für die Bestimmung von CTC in Faeces mit HPLC-UV angegebenen Bestimmungsgrenze von 3,5 mg/kg [272].

Das hier vorgestellte HPLC-UV-MS/MS-Verfahren zeichnet sich durch eine umfassende Validierung unter Berücksichtigung des Epimers aus. Das Analysenverfahren ist gleichermaßen auf die Matrices Muskulatur, Urin, Plasma, Faeces, Leber, Niere und Knochen anwendbar. Neben einer quantitativen



Bestimmung von CTC und e-CTC ermöglicht dieses Verfahren erstmals den simultanen Nachweis von iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC in den verschiedenen Probenarten und es kann daher eine Beurteilung weiterer in Realproben vorkommenden Abbau- und Umwandlungsprodukte von CTC erfolgen. Dieses Analysenverfahren wurde nachfolgend auf Proben der durchgeführten Medikationsstudien angewendet.

## 5.4 Anwendung des Analysenverfahrens auf Proben der Medikationsstudien

### 5.4.1 Haus Düsse-Studie

Im Rahmen dieser Medikationstudie wurde ein Mastdurchgang unter praxisüblichen Bedingungen mit definierter Medikation durchgeführt. Die Versuchsdurchführung wurde bereits in **Kap. 5.1.1** beschrieben. Ziel dieser Studie war es, anhand der entnommenen Urinproben der Versuchstiere das Ausscheidungsverhalten von CTC zu untersuchen. Daneben sollten die CTC-Rückstände in den Schlachtproben ermittelt werden. Zunächst wurde der CTC-Gehalt gemäß der EU-Verordnung EWG Nr. 2377/90 als Summe von CTC und e-CTC bestimmt. Darüber hinaus sollte geprüft werden, welche weiteren Metabolite von CTC in den Proben nachzuweisen sind.

#### 5.4.1.1 Ausscheidungsverhalten von CTC in Urin

Es erfolgten während des gesamten Mastdurchganges sieben Probennahmen. In den entnommenen Urinproben wurde mit LC-MS/MS der CTC- und e-CTC-Gehalt sowie die Summe beider Verbindungen ermittelt. Aus den für die einzelnen Tiere ermittelten Gehalten wurde der Mittelwert gebildet (Einzeldaten siehe **Tab. A. 1** im Anhang) und als Funktion der Zeit in **Abb. 24** dargestellt.

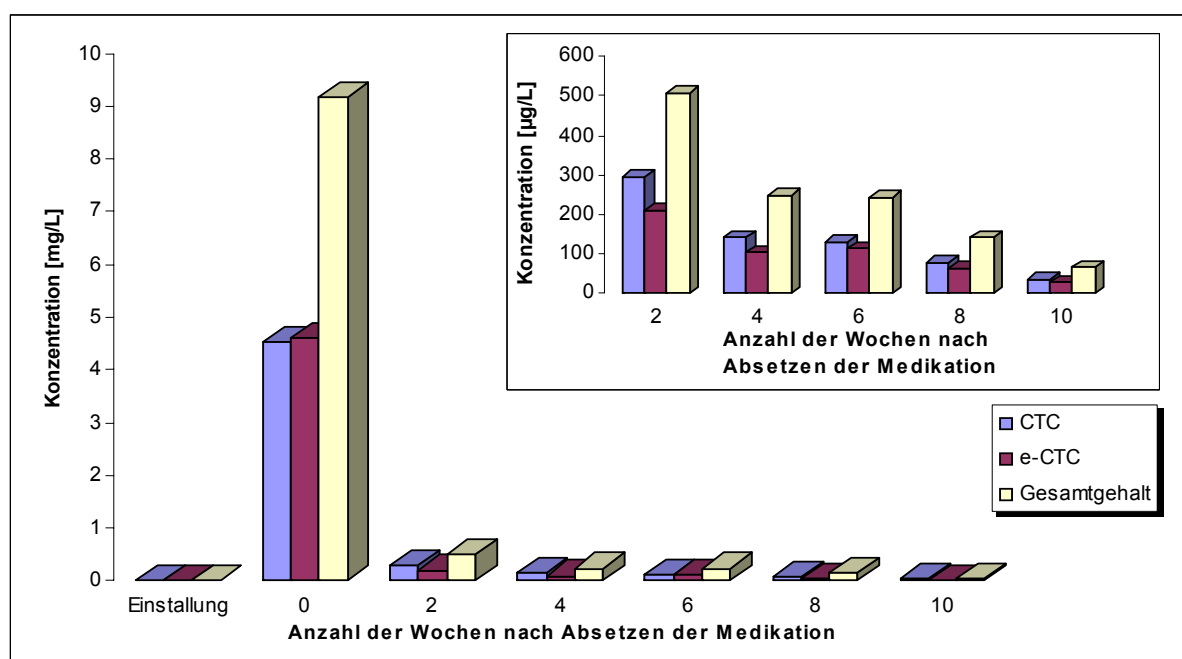
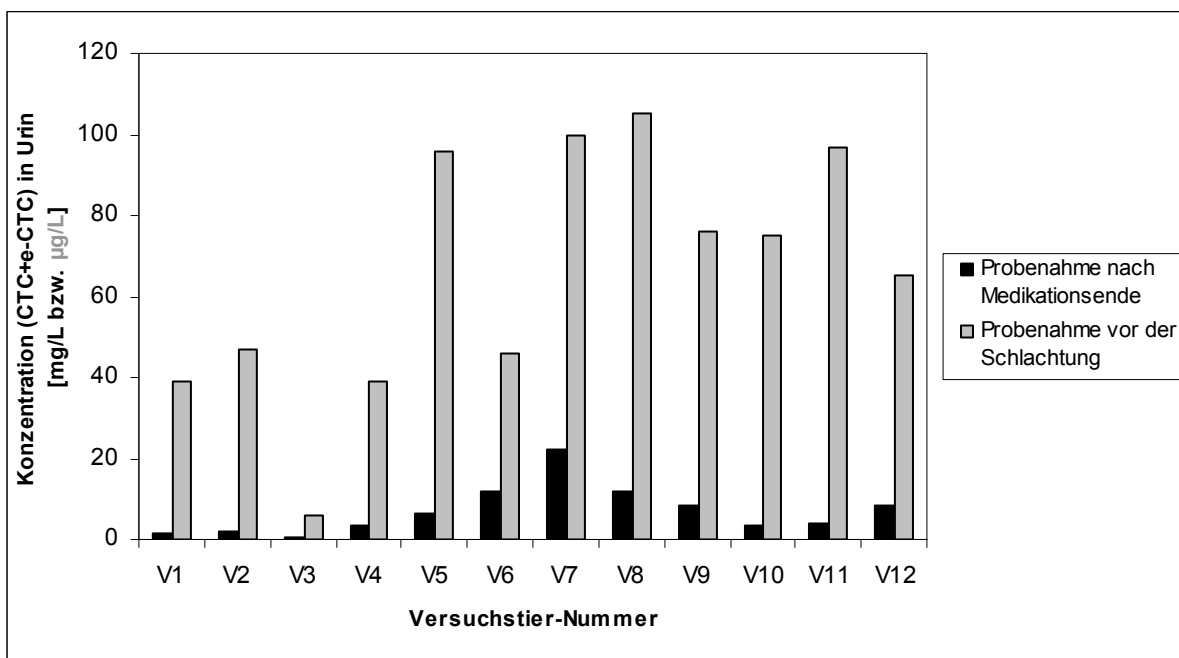


Abb. 24: Gesamt-CTC-, CTC- und e-CTC-Gehalte in Urin der Versuchstiere (Mittelwert aller Tiere) (LC-MS/MS) ( $n = 12$ )

Zur Veranschaulichung ist der Konzentrationsverlauf ab der zweiten Woche nach Absetzen der Medikation nochmals in einer kleineren Abbildung dargestellt. Vor der Medikation konnte, wie erwartet, bei keinem der 24 Tiere CTC oder e-CTC in Urin nachgewiesen werden. Bei den Versuchstieren zeigte sich erwartungsgemäß direkt nach Medikationsende der höchste CTC-Gehalt mit durchschnittlich 9,17 mg/L, der bereits zwei Wochen später auf 0,51 mg/L gefallen ist. Bis zur Schlachtung drei Monate später nahm der CTC-Gehalt weiter ab, betrug aber selbst am Tag der Schlachtung noch 66 µg/L und lag damit im Bereich der MRL-Werte für andere Matrices. Zu ähnlichen Befunden sind RAMAZZA et al. [43] gekommen, die das Ausscheidungsverhalten von Oxytetracyclin in Urin nach mehrwöchiger oraler Medikation untersuchten. Sie fanden ebenfalls auch vier Monate nach Absetzen der Medikation noch Oxytetracyclin in Urin.

Werden die CTC-Gehalte der einzelnen Tiere miteinander verglichen, so sind starke individuelle Unterschiede feststellbar. In **Abb. 25** sind die Gehalte der Urinproben nach Medikationsende und vor der Schlachtung dargestellt.



*Abb. 25: CTC-Gehalte ( $\Sigma$  CTC+e-CTC) in Urin der einzelnen Versuchstiere nach Medikationsende und vor der Schlachtung (LC-MS/MS,  $n=2$ )*

Ursache für die unterschiedlichen CTC-Gehalte kann einerseits die unterschiedliche Futteraufnahme der einzelnen Tiere sein, da die Schweine an Längströgen gefüttert wurden und daher die individuelle Aufnahmemenge nicht bekannt ist, und andererseits variiert die ausgeschiedene Urinmenge der Schweine pro Tag individuell. Beim Versuchstier 3 lassen sich sowohl direkt nach Absetzen der Medikation, Probenahme 0, sowie auch kurz vor der Schlachtung drei Monate später, Probenahme 10, wesentlich geringere Gehalte feststellen als bei den anderen Tieren. Vermutlich hat dieses Tier eine geringere Futtermenge aufgenommen, da es während des Mastdurchganges erkrankt ist.

In den Urinproben der als unbehandelte Kontrollgruppe mitgeführten Tiere konnten größtenteils keine CTC-Gehalte nachgewiesen werden. Es wurden jedoch bei sieben der zwölf Kontrolltiere in einigen Urinproben CTC oder e-CTC gefunden, wobei die Summe beider Verbindungen etwa 0,03 % bis 1,7 % der CTC-Gehalte in Urin der Versuchstiere bei den jeweiligen Probenahmen entsprachen. Nachge-

wiesenes CTC in den Kontrolltierproben deuten darauf hin, daß auch die unbehandelten Tiere CTC aufgenommen haben müssen. Mögliche Eintragsquelle könnte eine Verschleppung bei der Herstellung des Mischfutters in den Mischgefäßen, eine Verschleppung über das Futter im Stall sowie eine Antibiotikaübertragung über Stallstaub sein. Auf diese Problematik der Arzneimittelverschleppung haben bereits verschiedene Autoren wie KAMPHUES et al. und DORN et al. hingewiesen [99, 100, 101]. Darüber hinaus wiesen HAMSCHER et al. im Staub von Ställen, in denen Schweine gehalten wurden, denen oral über das Futter Antibiotika verabreicht wurde, Tetracycline nach [311].

In allen Urinproben konnten iso-CTC und e-iso-CTC nachgewiesen werden [312], dagegen Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nicht. Zudem war in den Proben ein weiteres Produkt mit demselben Precursor-Ion  $[M+H]^+$  von 479 und den Produkt-Ionen  $m/z$  462 und 444 nachweisbar, auf dessen Identifizierung in **Kap. 5.5** eingegangen wird.

#### 5.4.1.2 CTC-Gehalte in Schlachtproben

In den bei der Schlachtung entnommenen Proben von Urin, Plasma, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen wurde mit LC-MS/MS der CTC-Gehalt ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Tab. 22** zusammengefaßt.

*Tab. 22: CTC-Gehalte ( $\Sigma$  CTC und e-CTC) in Urin-, Plasma- und Schlachtproben der Versuchstiere (Probenahme bei der Schlachtung, LC-MS/MS,  $n = 2$ )*

Tier	Urin [ $\mu\text{g/L}$ ]	Plasma [ $\mu\text{g/L}$ ]	Muskulatur [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Niere [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Leber [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Knochen [ $\text{mg/kg}$ ]
V 1	39	0,8	7,9	12,1	5,0	12,1
V 2	47	0,7	4,5	11,1	2,9	11,9
V 3	6	2,7	11,4	5,9	9,5	12,5
V 4	39	0,6	5,6	8,1	2,2	3,9
V 5	96	1,0	6,9	13,8	6,1	13,9
V 6	46	1,9	5,5	11,8	2,5	15,8
V 7	100	0,8	10,1	12,8	6,6	21,2
V 8	105	0,9	6,7	13,5	4,3	11,7
V 9	76	0,7	21,6	10,1	7,9	16,6
V 10	75	0,9	7,2	11,8	5,8	13,6
V 11	97	1,1	9,4	14,9	4,9	10,8
V 12	65	0,8	8,0	10,5	5,4	5,0

In allen Proben der Versuchstiere konnten CTC-Gehalte festgestellt werden, wobei die in Muskulatur, Leber und Niere ermittelten Gehalte weit unterhalb der MRL-Werte lagen, für die anderen Matrices existieren keine MRL-Werte. Die ermittelten Gehalte für Muskulatur betrugen durchschnittlich 8,7  $\mu\text{g/kg}$ , für Leber 5,3  $\mu\text{g/kg}$  und für Niere 11,4  $\mu\text{g/kg}$ . Die höchsten CTC-Gehalte wurden in Knochen mit Werten zwischen 5,0  $\text{mg/kg}$  und 21,2  $\text{mg/kg}$  gefunden, da sie dort in gebundener Form vorliegen, siehe **Kap. 5.9.2**. Aber auch in Urin und Plasma konnte selbst am Schlachttag noch CTC nachgewiesen werden.

In den Proben der Kontrolltiere konnten in Urin, Plasma, Muskulatur, Leber und Niere kein CTC gefunden werden. Dagegen aber wurden in den Knochenproben der Kontrolltiere CTC-Gehalte ermittelt, die etwa 1% der Gehalte in Knochen der Versuchstiere entsprachen (s. **Tab. A. 2** im Anhang). Die

Knochenproben wurden zusätzlich mit dem Fluoreszenz-Screeningtest (s. **Kap. 5.9.2.2**) untersucht. Sie ergaben für die Kontrolltierknochen im Gegensatz zu den Ergebnissen mit der LC-MS/MS-Untersuchung ausschließlich negative Befunde. Diese Resultate entsprechen den Ergebnissen von KÖRNER et al., die in Fleischknochenmehlen, die keine Fluoreszenz zeigten, mittels HPLC-UV Tetracycline nachweisen konnten [285]. Die in den Kontrolltierknochenproben nachgewiesenen Gehalte sind möglicherweise, ebenso wie bereits für die Gehalte in den Urinproben der Kontrolltiere diskutiert, auf eine Arzneimittelverschleppung im Stall oder während der Mischfutterherstellung zurückzuführen.

Wie in den Urinproben konnten auch in den Schlachtproben sowie den Knochen- und Plasmaproben iso-CTC und e-iso-CTC nachgewiesen werden, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC spurenweise nur in Knochen. Ebenso wie in den Urinproben war in den meisten Proben noch ein weiteres Produkt mit demselben Precursor-Ion  $[M+H]^+$  von 479 und den Produkt-Ionen  $m/z$  462 und 444 vorhanden, auf dessen Identifizierung in **Kap. 5.5** eingegangen wird. In **Abb. 26** ist beispielhaft ein MS-Chromatogramm einer Muskulaturprobe von einem Versuchstier dargestellt.

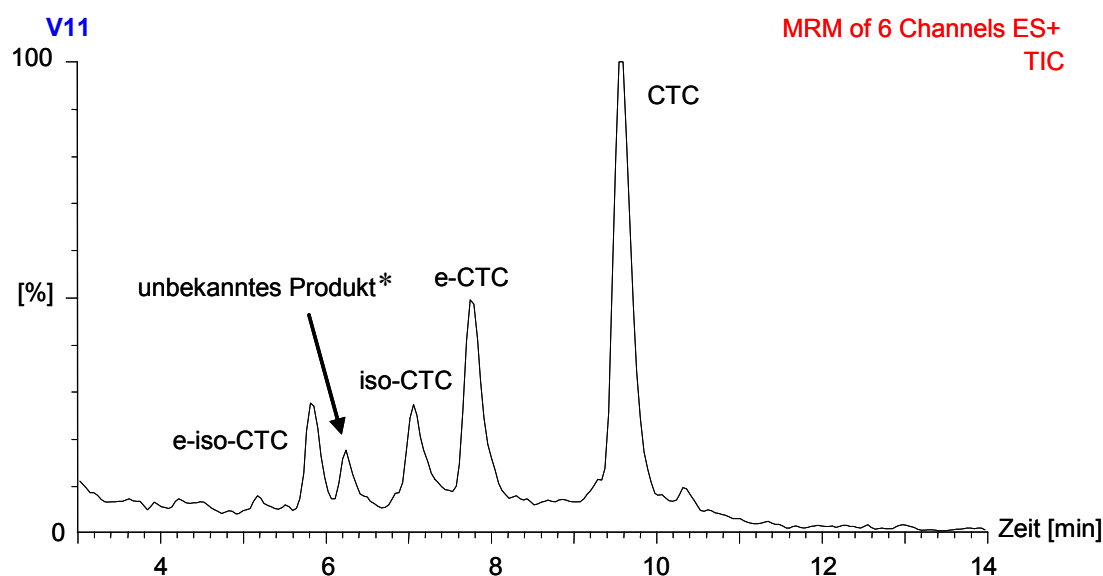


Abb. 26: MS-Chromatogramm (TIC) der Muskulaturprobe von Versuchstier 11 der Haus Düsse-Studie (\*siehe **Kap. 5.5**)

#### 5.4.1.3 Resistenzuntersuchungen

Ziel des Verbraucherschutzprojektes „Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung“ war neben der rückstandsanalytischen Bestimmung der CTC-Gehalte die Resistenzentwicklung der unter definierten Bedingungen gehaltenen Tiere festzustellen. Aus diesem Grund sind im Rahmen der Haus Düsse-Studie neben Urinproben auch Faecesproben genommen worden, hieraus *E.-coli*-Bakterien isoliert und diese anschließend mittels Breakpoint-Verfahren auf Resistenz geprüft worden. Eine genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung sowie eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse dieser Untersuchungen ist im Abschlußbericht des Projektes erfolgt [313]. An dieser Stelle soll hier nur eine kurze Zusammenfassung gegeben werden.

Bei der Einstellung wiesen die Schweine bereits eine *E.-coli*-Population mit hohem Resistenzanteil gegenüber Tetracyclin, vollständige Kreuzresistenz mit Chlortetracyclin vorausgesetzt, auf. Der Ausgangsstand von 80 % steigt bis zum Ende der Behandlung in der Gruppe der Versuchstiere auf 94 %. Der Anteil resistenter Keime geht auch innerhalb von drei Monaten nach Medikationsende nicht we-

sentlich zurück. Dies verdeutlicht die besondere Bedeutung der Tetracycline, deren Ausgangsresistenzsituation unbehandelter Schweine bereits so hoch ist, daß insgesamt gesehen eine Resistenzabnahme nach der Medikation kaum zu beobachten ist. Auch bei den unbehandelten Schweinen der Kontrolltiergruppe zeigten sich im Laufe des Versuches kaum geringere Resistenzen als bei der behandelten Versuchstiergruppe. Nach der Medikation der Versuchstiergruppe stieg auch in der Kontrolltiergruppe der Anteil tetracyclinresistenter *E.-coli*-Keime in Faeces erheblich an und blieb bis zur Schlachtung auf einem hohem Niveau. Die Annahme, daß sich während des Einwirkens von Antibiotika Resistenzen ausbilden und über die Dauer der Medikation bestehen bleiben, danach jedoch wieder verloren gehen, wenn kein Selektionsdruck mehr besteht, siehe **Kap. 3.4.1**, konnte damit nicht bestätigt werden. Es ist um so bedenklicher, daß alle Tiere des Versuchskollektivs bei Einstellung hohe Anteile resistenter Keime aufwiesen. Dies verdeutlicht die komplexe Problemdarstellung der Resistenzsituation als Resultat der allgemein häufigen Anwendung von Tetracyclinen.

#### 5.4.1.4 Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen des Ausscheidungsverhaltens zeigen, daß die CTC-Gehalte nach Medikationsende zunächst abfallen, aber noch drei Monate nach der Medikation im Urin aller Tiere nachweisbar sind. In den Schlachtproben sind ebenfalls noch CTC und e-CTC nachzuweisen. Die Gehalte liegen zwar weit unterhalb der entsprechenden MRL-Werte, spielen aber möglicherweise im Hinblick auf eine Resistenzentwicklung gerade aufgrund der geringen Gehalte eine Rolle. Die festgestellten CTC-Gehalte in den Knochenproben sowie einiger Urinproben der Schweine der Kontrolltiergruppe sind Indiz dafür, daß die allgemein häufige Anwendung von Tetracyclinen in der Schweinemast bei den üblichen landwirtschaftlichen Haltungsbedingungen von Mastschweinen dazu führt, daß auch unbehandelte Tiere Antibiotikaspuren durch eine Arzneimittelverschleppung im Stall aufnehmen können, die gerade aufgrund der subtherapeutischen Dosis Resistenzen fördern können. Insbesondere weisen LANGEWISCHE et al. darauf hin, daß auch Gehalte unterhalb der MRL-Werte Resistenzen fördern können, weil die MRL-Werte häufig unterhalb der MHK-Werte liegen und damit nicht alle Bakterien abgetötet werden können, so daß resistente Bakterien entstehen können [38]. Die durchgeführten mikrobiologischen Resistenzuntersuchungen unterstützen diese Annahme. Es konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Medikation der Schweine und der Resistenzlage der *E.-coli*-Keime in Faeces der Tiere festgestellt werden. Vielmehr war auch bei unbehandelten Tieren 80 % resistenter *E.-coli*-Keime nachgewiesen worden, zurückzuführen auf die häufige Anwendung von Tetracyclinen in der landwirtschaftlichen Tierhaltung.

In allen Proben konnten neben CTC und e-CTC die Umwandlungsprodukte iso-CTC und e-iso-CTC nachgewiesen werden. Die Knochenproben enthielten zusätzlich Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC. Weiterhin trat in vielen Proben ein weiteres Produkt mit dem Precursor-Ion  $[M+H]^+$  von 479 und den Produkt-Ionen  $m/z$  462 und 444 auf, siehe **Kap. 5.5**.

#### 5.4.2 FAL-Studie

Die Einzelhaltung der Tiere in Stoffwechselkäfigen ermöglicht eine Bilanzierung der applizierten und ausgeschiedenen Wirkstoffe. Die Durchführung dieser Studie ist bereits in **Kap. 5.1.2** beschrieben worden. Darüber hinaus wurde der CTC-Gehalt in den Schlachtproben der Tiere, die nach Ablauf der Wartezeit von vierzehn Tagen geschlachtet wurden, ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung von CTC und e-CTC in den Urin-, Faeces-, Plasma- und Schlachtproben erfolgte mit LC-MS/MS.

### 5.4.2.1 CTC und e-CTC in Urin, Faeces und Plasma

Zunächst wurde der CTC-Gehalt in den täglich entnommenen Urin- und Faecesproben untersucht. Aus den Gehalten wurde mit den ermittelten ausgeschiedenen Urin- und Faecesmengen, siehe **Tab. A. 5** und **Tab. A. 6** im Anhang, die täglichen CTC-Ausscheidungsmengen berechnet.

Nach einer oralen Gabe von CTC werden maximale Serumkonzentrationen nach 3-4 Stunden und die höchsten Urinspiegel nach etwa 8-9 Stunden erreicht, siehe **Kap. 3.3**. Mit einer Dosissteigerung von CTC läßt sich kein proportionaler Anstieg der Serumkonzentration feststellen, sondern bleibt ab einer bestimmten Dosis konstant [68, 314]. Daher war zu erwarten, daß nach mehrfacher Medikation die Ausscheidungsmenge zuerst ansteigt und nach Erreichen eines bestimmten Plasmaspiegels anschließend konstant bleibt. Ein derartiges Ausscheidungsverhalten haben BRÜGGEMANN et al. im Rahmen einer ausführlichen Bilanzierung an Legehennen nach mehrtägiger Fütterungsdosierung gefunden [319]. Sie stellten bei einer 15-tägigen Medikation von Legehennen mit C14-markiertem CTC einen Anstieg der Ausscheidungsmenge in den ersten drei Medikationstagen mit anschließenden konstanten Werten über einen Zeitraum von dreizehn Tagen fest. Für Schweine sind keine entsprechenden Angaben in der Literatur bekannt. Es gibt zwar eine Reihe durchgeführter pharmakokinetischer Studien, wobei aber meist Ratten, Hunde und Hühner [42, 67, 70, 74, 315, 316], weniger Schweine untersucht wurden [68]. Diese Studien beschränken sich zudem auf eine einmalige Gabe des Arzneimittels. Die Verhältnisse der Antibiotikafütterung in der landwirtschaftlichen Tierhaltung fanden bisher wenig Beachtung. Darüber hinaus erfolgt die Gehaltsbestimmung bei den bereits beschriebenen pharmakokinetischen Studien häufig über mikrobiologische Verfahren sowie der Radioaktivitätsmessung [315, 316, 319], so daß Metabolite nur im Falle einer mikrobiologischen Aktivität bzw. einer Radioaktivität mit erfaßt werden. Eine quantitative Berücksichtigung von Metaboliten ist daher nicht erfolgt.

In **Abb. 27** sind die CTC-Ausscheidungsmengen in *Urin*, angegeben als Summe von CTC und e-CTC, der einzelnen Tiere über beide Medikationsphasen dargestellt (s. auch **Tab. A. 7** im Anhang).

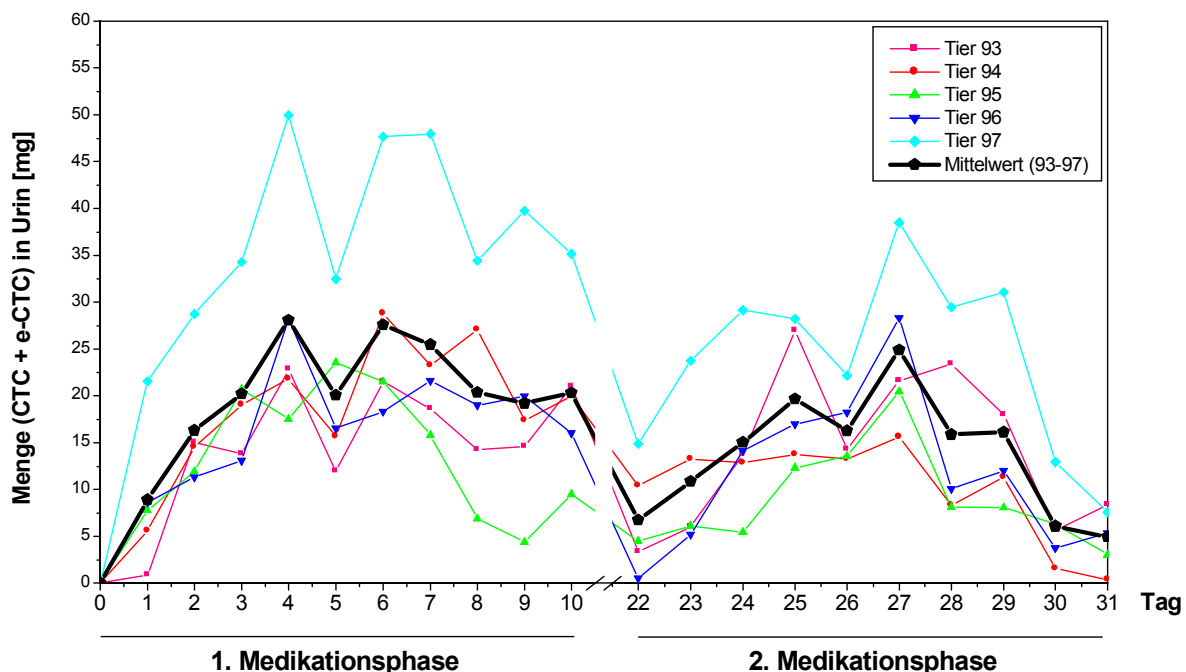


Abb. 27: Ausscheidungsmenge ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Urin der einzelnen Tiere (LC-MS/MS) ( $n = 2$ )

Bei Einstellung der Tiere in die Stoffwechselkäfige, also bei der ersten Probenahme, konnte erwartungsgemäß kein CTC nachgewiesen werden. Zu Beginn der ersten Medikationsphase steigt die Ausscheidungsmenge in Urin zunächst auf 28 mg am vierten Versuchstag und in der zweiten Medikationsphase von 7 mg am 22. Versuchstag bis auf 24 mg am 27. Versuchstag an, nimmt dann aber noch während der Medikation bis zum Absetzen des Arzneimittels wieder auf Werte von 20 mg am zehnten Versuchstag und 5 mg am 31. Versuchstag ab, wobei sich ein individuell unterschiedlich stark ausgeprägtes Maximum ergab. Auffällig ist, daß die maximalen CTC-Ausscheidungsmengen während der zweiten Medikationsphase geringere Werte erreichten als bei der ersten. Zu bedenken ist, daß sich aufgrund möglicher Isomerisierungen unter Einbeziehung von iso-CTC und e-iso-CTC ein anderer Kurvenverlauf ergeben könnte.

Ein Vergleich der Ausscheidungsmengen in Urin der einzelnen Tiere zeigt, daß sich weitestgehend sehr ähnliche Kurvenverläufe ergaben, da eine individuelle auf das Gewicht des jeweiligen Tieres abgestimmte Medikation erfolgt ist. Unterschiede im Ausscheidungsverhalten sind aufgrund der individuellen Fütterung der Tiere auf eine unterschiedliche Verstoffwechselung des Antibiotikums zurückzuführen.

Die Ergebnisse der *Faeces*untersuchungen sind in **Abb. 28** dargestellt (s. auch **Tab. A. 8** im Anhang).

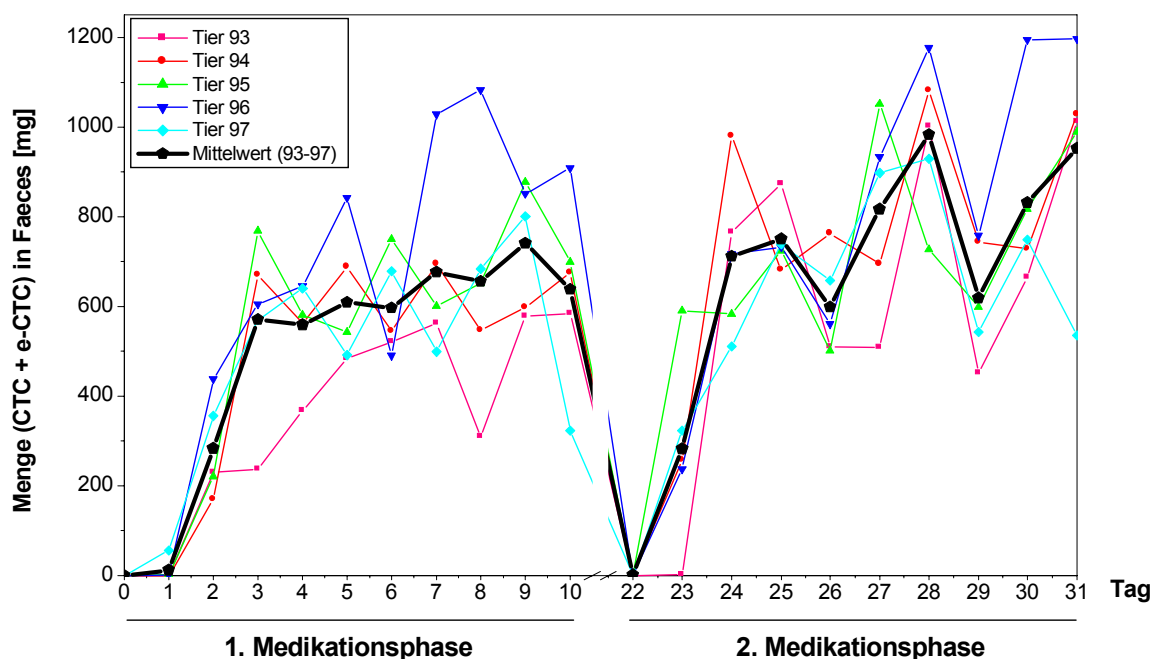


Abb. 28: Ausscheidungsmenge ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Faeces der einzelnen Tiere (LC-MS/MS,  $n=2$ )

Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften von CTC sollten die Konzentrationen von CTC in Faeces deutlich höher liegen als in Urin, siehe **Kap. 3.3**. Während die resorbierten Anteile von CTC über Urin wieder ausgeschieden werden, stammt das in Faeces nachweisbare CTC überwiegend aus dem nicht resorbierten Anteil, weniger aus der Galle, also nach Resorption. Daher lagen die ermittelten CTC-Ausscheidungsmengen in Faeces deutlich höher als in Urin und unterstützen damit frühere Befunde [74, 317]. Im Unterschied zum Kurvenverlauf der CTC-Ausscheidungsmenge in Urin ergibt sich in Faeces in beiden Medikationsphasen kein Maximum. In der ersten Medikationsphase stieg die CTC-Ausscheidungsmenge auf Werte von durchschnittlich 570 mg am dritten Versuchstag an. Während der fortlaufenden Medikation bleibt die CTC-Ausscheidungsmenge nach dem dritten Versuchstag

annähernd konstant, fällt aber nach Absetzen der Medikation stark ab, was früheren Befunden entspricht [318]. In der zweiten Medikationsphase ergab sich ein ähnlicher Kurvenverlauf. Nachdem die Ausscheidungsmengen bis zum 24. Versuchstag auf Werte von 711 mg stiegen, blieben sie anschließend, abgesehen von einer Streuung, annähernd konstant. Ebenso wie für Urin waren für die einzelnen Tiere sehr ähnliche Kurvenverläufe der CTC-Ausscheidungsmengen in Faeces, jedoch mit individuellen Unterschieden, erkennbar.

Da über Faeces überwiegend der nicht resorbierte Anteil wieder ausgeschieden wird, sinkt die Ausscheidungsmenge in Faeces schnell von einem Gehalt von 638 mg am zehnten Versuchstag innerhalb der Medikationspause auf 1 mg am 22. Versuchstag ab. In Urin beträgt die Ausscheidungsmenge am zehnten Versuchstag 20 mg und am 22. Versuchstag 7 mg. Trotz der insgesamt geringeren Ausscheidungsmenge in Urin sind also die nach der elftägigen Medikationspause ermittelten Ausscheidungsmengen in Urin höher als in Faeces.

Das im Rahmen dieser Studie ermittelte Ausscheidungsverhalten von CTC in Urin und Faeces entsprach damit dem von BRÜGGEMANN et al. [319] an Legehennen nach mehrtägiger Medikation festgestellten Verlauf. Auch sie fanden einen Anstieg der Ausscheidungsmenge in Urin und Faeces innerhalb der ersten zwei Tage. Das festgestellte Verhältnis der Ausscheidungsmengen von CTC in Urin und Faeces von etwa 1:30 wurde ebenfalls von EISNER et al. [74] nach einmaliger oraler CTC-Verabreichung bei Ratten gefunden.

*Blut* wurde den Tieren lediglich am Anfang und am Ende der ersten und zweiten Medikationsphase entnommen und analysiert (**Tab. 23**).

Tab. 23: CTC-Gehalte ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Plasma der einzelnen Tiere (LC-MS/MS,  $n = 2$ )

Medik.-phase	Versuchstag	Tier 93	Tier 94	Tier 95	Tier 96	Tier 97
		[µg/L]				
1.	0	nn	nn	nn	nn	nn
	10	132,7	93,96	87,12	89,96	81,24
2.	21	3,44	3,68	4,48	3,08	7,04
	31	74,32	89,12	53,12	72,04	94,64

Aufgrund der wenigen Probenahmen läßt sich lediglich ein Anstieg des CTC-Gehaltes auf durchschnittlich 97 µg/L am zehnten Versuchstag feststellen. Nach der elftägigen Medikationspause sind relativ zum CTC-Gehalt am zehnten Versuchstag, noch hohe CTC-Gehalte von 4,4 µg/L nachweisbar. Am Ende der zweiten Medikationsphase ließen sich mit Werten von durchschnittlich 77 µg/L etwas geringere CTC-Gehalte feststellen als in der ersten Medikationsphase. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen der Urinuntersuchungen, bei denen gezeigt wurde, daß die maximale CTC-Konzentration in der zweiten Medikationsphase niedriger lag als in der ersten. Auch in Plasma lassen sich individuelle Unterschiede feststellen.



### 5.4.2.2 Bilanzierung (Applikation-Exkretion)

Um zu beurteilen, wieviel der zugeführten Arzneimittelmenge wieder ausgeschieden wird und wieviel im Tier verbleibt, wurden die Ausscheidungsraten der einzelnen Tiere berechnet. Die prozentuale Ausscheidungsrate bezogen auf die täglich zugeführte Wirkstoffmenge liegt für Urin durchschnittlich bei 1 % bis 3 % und bleibt über beide Medikationsphasen annähernd konstant, entsprechend einem sich einstellenden Plasmaspiegel. Bei Faeces steigt die Ausscheidungsrate in beiden Medikationsphasen mit weitergehender Medikation stark an von 0 % bis 2 % am Anfang der Medikationsphasen über 31 % bis 40 % am zweiten Medikationstag bis auf 90 % bis 100 % nach sieben Medikationstagen. Nach Einstellung eines bestimmten Plasmaspiegels wird nicht mehr so viel CTC resorbiert, was zu einer erhöhten Ausscheidung von CTC über Faeces führt. Der ermittelte Verlauf der Ausscheidungsrate entsprach dem, den KELLY et al. [349] an Ratten nach einmaliger oraler Verabreichung von C14-markiertem CTC fanden. Sie geben Ausscheidungsrate von 4 % in Urin und 10 % bis 24 % in Faeces nach 24 h und nach 48 h 4 % in Urin und 72 % bis 79 % in Faeces an. Unterschiede in der maximalen Ausscheidungsrate in Faeces können methodisch analytisch (Bestimmungsmethode, ungenügende Berücksichtigung von Metabolite) und tierphysiologisch (andere Tierarten) bedingt sein.

Über beide Medikationsphasen verteilt haben alle fünf Tiere insgesamt eine CTC-Wirkstoffmenge von 84,6 g aufgenommen, von der 1,7 g über Urin und 58,8 g über Faeces während der Medikationsphasen wieder ausgeschieden wurden. Durchschnittlich haben die Tiere damit von der insgesamt zugeführten Wirkstoffmenge bereits noch während der Medikation 2 % über Urin und 70 % über Faeces wieder ausgeschieden. Es verbleibt eine CTC-Wirkstoffmenge von 24,4 g, entsprechend 28 % der applizierten Menge, die entweder zwischen den beiden Medikationsphasen, in den zwei Wochen zwischen Absetzen der Medikation und Schlachtung der Tiere noch ausgeschieden wurde oder in den Tierkörpern bei der Schlachtung verblieben ist. Die in diesem Versuch ermittelte Resorptionsrate von 30 % und Ausscheidungsrate von 70 % über Faeces stimmt gut mit den Angaben in der Literatur überein [2, 48, 74].

Wird über jedes einzelne Tier bilanziert, siehe **Tab. 24**, so zeigt sich, daß der Ausscheidungsgrad über den gesamten Medikationszeitraum von CTC in Urin, ermittelt als Summe von CTC und e-CTC, mit 1 % bis 4 % sehr gering ist und kaum individuelle Unterschiede festzustellen sind.

*Tab. 24: Bilanzierung über die zugeführte CTC-Wirkstoffmenge und ausgeschiedene Menge als CTC und e-CTC bei den einzelnen Tieren*

Tier	Applizierte CTC-Wirkstoffmenge [g] ≙ 100 %	Ausscheidungsgrad (Σ CTC + e-CTC) [%]		verbleibender Anteil der zugeführten CTC-Menge [%]
		Urin	Faeces	
93	16,4	2	55	43
94	16,3	2	74	24
95	17,6	1	70	29
96	17,3	2	83	15
97	17,0	4	65	31

Die Ausscheidungsrate von CTC in Faeces liegt zwischen 55 % und 83 % und es lassen sich damit deutlich stärker ausgeprägte individuelle Unterschiede erkennen als bei der Betrachtung der Ausscheidungsmengen, siehe **Abb. 28**. Während den dargestellten Ergebnissen in **Abb. 28** lediglich die absolu-

te ausgeschiedene CTC-Menge zugrunde liegt, geht in die Berechnung des Ausscheidungsgrades die tägliche zugeführte Arzneimittelmenge und damit auch indirekt das Körpergewicht mit ein.

Während der Medikation wurden zwischen 57 % und 85 % der zugeführten Wirkstoffmenge über Urin und Faeces ausgeschieden. Die hierbei nicht erfaßten 15 % bis 43 % der zugeführte Wirkstoffmenge können entweder während der Medikationspause oder der Wartezeit ausgeschieden worden sein oder tatsächlich im Tier selbst verblieben sein.

In den Urin-, Faeces- und Plasmaproben kamen neben CTC und e-CTC auch iso-CTC und e-iso-CTC sowie in Faeces zusätzlich Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC vor. Das im Rahmen der Haus Düsse-Studie festgestellte weitere Produkt ist auch in den meisten Proben dieser Studie aufgetreten, siehe **Kap. 5.5**. Es bleibt zu prüfen, inwiefern sich die im Rahmen dieser Bilanzierung erhaltenen Werte unter Berücksichtigung der Metabolite erhöhen würden.

### 5.4.2.3 Schlachtproben

Die in den Schlachtproben der nach Ablauf der Wartezeit geschlachteten Tiere ermittelten CTC-Gehalte als Summe von CTC und e-CTC sind in **Tab. 25** dargestellt.

*Tab. 25: CTC-Gehalte ( $\Sigma$  CTC und e-CTC) in Urin-, Faeces-, Plasma- und Schlachtproben der Versuchstiere (Probenahme bei der Schlachtung, LC-MS/MS,  $n = 2$ )*

Matrix	Einheit	Tier 93	Tier 94	Tier 96	Tier 97	MRL
Muskulatur	µg/kg	4,2	3,3	3,4	3,8	100
Leber	µg/kg	3,2	7,9	6,1	9,5	300
Niere	µg/kg	19,6	15,3	16,6	23,0	600
Knochen	mg/kg	26,1	24,8	21,3	21,8	--
Urin	µg/L	253,4	418,5	70,1	--	--
Faeces	mg/kg	0,8	2,2	1,1	0,8	--
Plasma	µg/L	3,2	3,0	4,0	26,6	--

In den Knochenproben wurden die höchsten Gehalte gefunden. Mit durchschnittlichen Werten von 23,5 mg/kg liegen diese Knochengehalte höher als bei den Schweinen der Haus Düsse-Studie mit Durchschnittswerten von 12,4 mg/kg, korrelieren aber mit der applizierten Wirkstoffmenge. Die Schweine der Haus Düsse-Studie haben durchschnittlich 9,2 g CTC aufgenommen, die der FAL-Studie 16,9 g.

In Urin, Faeces und Plasma können ebenfalls CTC nachgewiesen werden, wobei die Gehalte in Urin und Plasma dieser Tiere deutlich höher liegen als bei den Tieren der Haus Düsse-Studie, da die Schweine der FAL-Studie vierzehn Tage, die der Haus Düsse-Studie erst nach drei Monaten geschlachtet worden sind. Die CTC-Gehalte in Muskulatur, Leber und Niere liegen unterhalb der MRL-Werte, entsprechend früheren Befunden von MCEVOY et al. [320]. Bemerkenswert ist, daß die in dieser Studie ermittelten Gehalte in Muskulatur, Leber und Niere sich kaum von den Werten unterscheiden, die bei den Proben der Haus Düsse-Studie nachgewiesen wurden, obwohl die Schlachtung der Schweine in der Haus Düsse-Studie zehn Wochen später, bezogen auf den Zeitpunkt des Medikationsendes, erfolgte.

In Muskulatur, Leber, Niere und Knochen konnten ebenfalls iso-CTC und e-iso-CTC sowie ein weite-

res Produkt, siehe **Kap. 5.5**, nachgewiesen werden. In Knochen waren darüber hinaus in Spuren auch Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC feststellbar.

#### 5.4.2.4 Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen zum Ausscheidungsverhalten von CTC, Gehalte ermittelt als Summe von CTC und e-CTC, haben gezeigt, daß innerhalb der ersten drei Medikationstage die Ausscheidungsmenge in Urin und Faeces steigt. Während die Ausscheidungsmenge in Faeces an den weiteren Medikationstagen annähernd konstant bleibt, nimmt sie in Urin wieder ab. Die Bilanzierungsergebnisse zeigen, daß von der applizierten Wirkstoffmenge nur 1 % bis 4 % über Urin und 55 % und 83 % über Faeces während der Medikation als CTC und e-CTC wieder ausgeschieden wird. In den Schlachtproben der Tiere, die nach Ablauf der Wartezeit geschlachtet wurden, ließen sich ebenfalls CTC-Gehalte feststellen, die jedoch unterhalb der MRL-Werte lagen. In Urin, Faeces, Plasma, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen konnten neben CTC und e-CTC die Metabolite iso-CTC und e-iso-CTC, in Faeces und Knochen auch Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nachgewiesen werden.

#### 5.4.3 Ergebnisse der Studien und Konsequenzen

Die im Rahmen der Medikationsstudien durchgeführten Untersuchungen zum Ausscheidungsverhalten von CTC in Urin haben gezeigt, daß die CTC-Gehalte nach Absetzen einer Medikation stark abfallen, jedoch noch drei Monate nach der Medikation CTC und e-CTC feststellbar sind. Während über Urin nur ein geringer Anteil von 1% bis 4 % ausgeschieden wird, erfolgt die hauptsächliche Ausscheidung über Faeces zu 55 % bis 83 %. Einschränkend zu erwähnen ist, daß der CTC-Gehalt lediglich als Summe von CTC und e-CTC ermittelt wurde und außerdem die Haltung der Schweine nach der Medikation in der Gruppe ohne weitere Probenahmen bis zur Schlachtung erfolgt ist. Daher ist eine exakte Bilanzierung unter diesen Bedingungen nicht möglich gewesen. Die Untersuchung der Schlachtproben ergab, daß nach Ablauf der Wartezeit die Gehalte in Muskulatur, Leber und Niere weit unterhalb der MRL-Werte lagen. Aber auch nach einem dreimonatigen medikationsfreien Zeitraum finden sich in diesen Matrices nur geringfügig niedrigere CTC-Gehalte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch unbehandelte Schweine, die unter landwirtschaftlich üblichen Bedingungen gehalten werden, Antibiotikaspuren durch eine Arzneimittelverschleppung im Stall aufnehmen können. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß auch Arzneimittelrückstände unterhalb der MRL-Werte Resistenzen fördern können, wenn diese unterhalb der MHK-Werte liegen.

In Urin, Faeces, Plasma, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen kamen neben CTC und e-CTC die Metabolite iso-CTC und e-iso-CTC, in Faeces und Knochen auch in Spuren Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC vor. Weiterhin trat in vielen Proben ein weiteres Produkt mit dem Precursor-Ion  $[M+H]^+$  von 479 und den Produkt-Ionen  $m/z$  462 und 444 auf.

In den nachfolgenden Kapiteln wird eine Identifizierung des weiteren aufgetretenen Produktes angestrebt. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob es notwendig ist, bei der Ermittlung des CTC-Gehaltes über die gesetzlich vorgeschriebene Regelung hinaus, die eine Bestimmung des CTC-Gehaltes als Summe von CTC und e-CTC vorsieht, auch die weiteren aufgetretenen Metabolite mit einzubeziehen. Um dies beurteilen zu können, ist zunächst untersucht worden, welche dieser Metabolite *in vitro* und welche *in vivo* entstehen. Darüber hinaus spielt neben der Toxizität und der Fähigkeit zur Resistenzbildung vor allem die antibiotische Wirkung bei der Entscheidung, welche Metabolite in

den CTC-Gehalt mit einbezogen werden müssen, eine große Rolle. Daher ist mittels Dreiplatten-Tests die antibiotische Aktivität der nachgewiesenen Substanzen CTC, e-CTC, iso-CTC, Anhydro-CTC sowie e-Anhydro-CTC untersucht worden.

## 5.5 Identifizierung von Tautomeren

Die Tatsache, daß das zusätzlich auftretende Produkt genauso wie CTC das Precursor-Ion  $[M+H]^+$  mit  $m/z$  479 und die Produkt-Ionen mit  $m/z$  462 und  $m/z$  444 bildet, gibt deutliche Hinweise darauf, daß es sich hierbei um ein Umwandlungsprodukt, also einem Strukturisomeren, handelt. Als mögliche Strukturisomere kommen bereits in der Literatur beschriebene tautomere Verbindungen von CTC in Betracht.

Von verschiedenen Autoren wird das Auftreten von Keto-Enol-Tautomeren bei Chlortetracyclin beschrieben [136, 143, 149, 210, 321]. NAIDONG et al. untersuchten 1990 erstmals den strukturellen Aufbau der Tautomere mittels HPLC-UV-NMR und bewiesen damit die Existenz derartiger Verbindungen. Sie zeigten, daß eine Keto-Enol-Tautomerie am C11-, C11a- und C12-Atom stattfindet (Struktur siehe **Abb. 9**) [149]. Aufgrund der  $\beta$ -Diketon-Struktur liegt CTC bevorzugt in der normalerweise weniger begünstigten Enol-Form unter Ausbildung einer vinylogenen Carbonsäure vor. Dafür verantwortlich ist die Ausbildung eines konjugierten Enols sowie eine intramolekulare Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen dem Enol-Wasserstoffatom und dem Sauerstoffatom der verbliebenen Carbonylgruppe. NAIDONG et al. fanden in salzsaurer Lösung mit steigendem pH-Wert von 2 bis 4 eine Verschiebung des Keto-Enol-Gleichgewichtes in Richtung der Keto-Form, also dem  $\beta$ -Diketon. Mit abnehmendem pH-Wert nimmt die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung der Keto-Enol-Tautomerie zu. Sie konnten jedoch nicht feststellen, welche Konfiguration das neu entstandene asymmetrische Zentrum am C11a-Atom besitzt, so daß davon ausgegangen werden muß, daß mit Ausbildung der Keto-Form ein Gemisch aus dem *cis*- und *trans*-  $\beta$ -Diketon vorliegt. Dieselben Autoren wiesen Keto-Enol-Tautomere nur bei CTC und e-CTC, nicht jedoch bei iso-CTC und Anhydro-CTC nach. Dies scheint insofern plausibel, da beim iso-CTC durch die Ausbildung des Lactons am Ring C keine vinyloge Carbonsäure mehr vorliegt, siehe **Kap. 3.5.3.2**, und damit am C11a- und C12-Atom die Keto-Form überwiegt. Die Entstehung des Anhydro-CTC ist nach der Eliminierung von Wasser am C5a- und C6-Atom mit einer Verschiebung der Enolstruktur vom C11a- und C12-Atom zum C11- und C11a-Atom und damit einer Aromatisierung des Ringes C verbunden, siehe **Kap. 3.5.3.4**, wodurch die Ausbildung der Keto-Form unterbunden wird. Nach NAIDONG et al. liegen in verdünnter Salzsäure (0,01 mol/L) 20 % des CTC und 50 % des e-CTC als Keto-Form vor. Bei Anwesenheit von Methanol im Lösungsmittel verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung Enol-Form, also vinyloger Carbonsäure. Verschiedene eigene Untersuchungen legen unter Zugrundelegung der Ergebnisse von NAIDONG et al. die Vermutung nahe, daß es sich bei der in den Proben vielfach festgestellten unbekannten Komponente um die Keto-Form von e-CTC handelt:

- Stabilitätsuntersuchungen der einzelnen Verbindungen CTC, e-CTC und iso-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) belegen, daß die unbekannte Komponente in schwach saurer methanolischer Lösung nur aus CTC und e-CTC, nicht aber aus iso-CTC entsteht. Dabei ist die Peakfläche größer, wenn als Ausgangssubstanz e-CTC anstelle von CTC eingesetzt wird. Allerdings sind in diesem Lösungsmittel die Epimerisierung und Tautomerie konkurrierende Reaktionen. Dies bedeutet, daß nicht eindeutig festgestellt werden kann, ob die unbekannte Komponente aus CTC oder aus e-CTC entstanden ist.
- Eine alkalische Behandlung von aufgearbeiteten Muskulaturproben, siehe **Kap. 5.8.2.3**, in denen die Substanzen CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC und das unbekannte Strukturisomer nachgewiesen werden konnten, führt zur Auslöschung von CTC, e-CTC sowie des Peaks der unbekannten Substanz. Dies deutet ebenfalls auf eine Keto-Form von CTC oder e-CTC hin, die im alkalischen Milieu ebenfalls isomerisiert.
- In salzsaurer Lösung entstehen sowohl aus CTC als auch aus e-CTC neben Spuren von Anhydro- und e-Anhydro-CTC zusätzliche Substanzen. Unter diesen Bedingungen kann eine Epimerisierung ausgeschlossen werden, siehe **Kap. 5.2.2.8**.
- Ein Vergleich der relativen Peakflächen läßt erkennen, daß aus e-CTC größere Anteile der neuen Komponente entstehen als aus CTC. Dies entspricht den Ergebnissen von NAIDONG et al., nach dem sich e-CTC deutlich stärker in das  $\beta$ -Diketon umwandelt als CTC.
- In salzsaurer Lösung ist die Peakfläche der unbekannten Komponente höher als in methanolischer Lösung, bestehend aus MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v). Auch NAIDONG et al. stellten bei 50%igem Zusatz von Methanol zur Säure eine Verschiebung des Keto-Enol-Gleichgewichtes in Richtung der Enol-Form, also der vinylogenen Carbonsäure, fest.

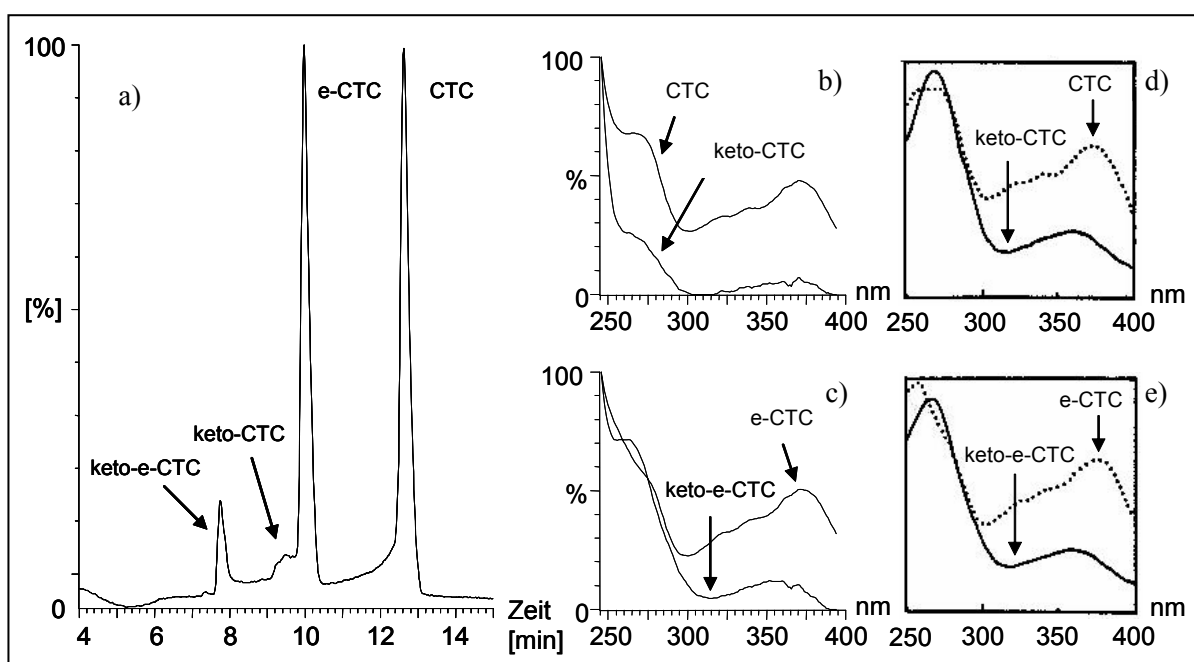
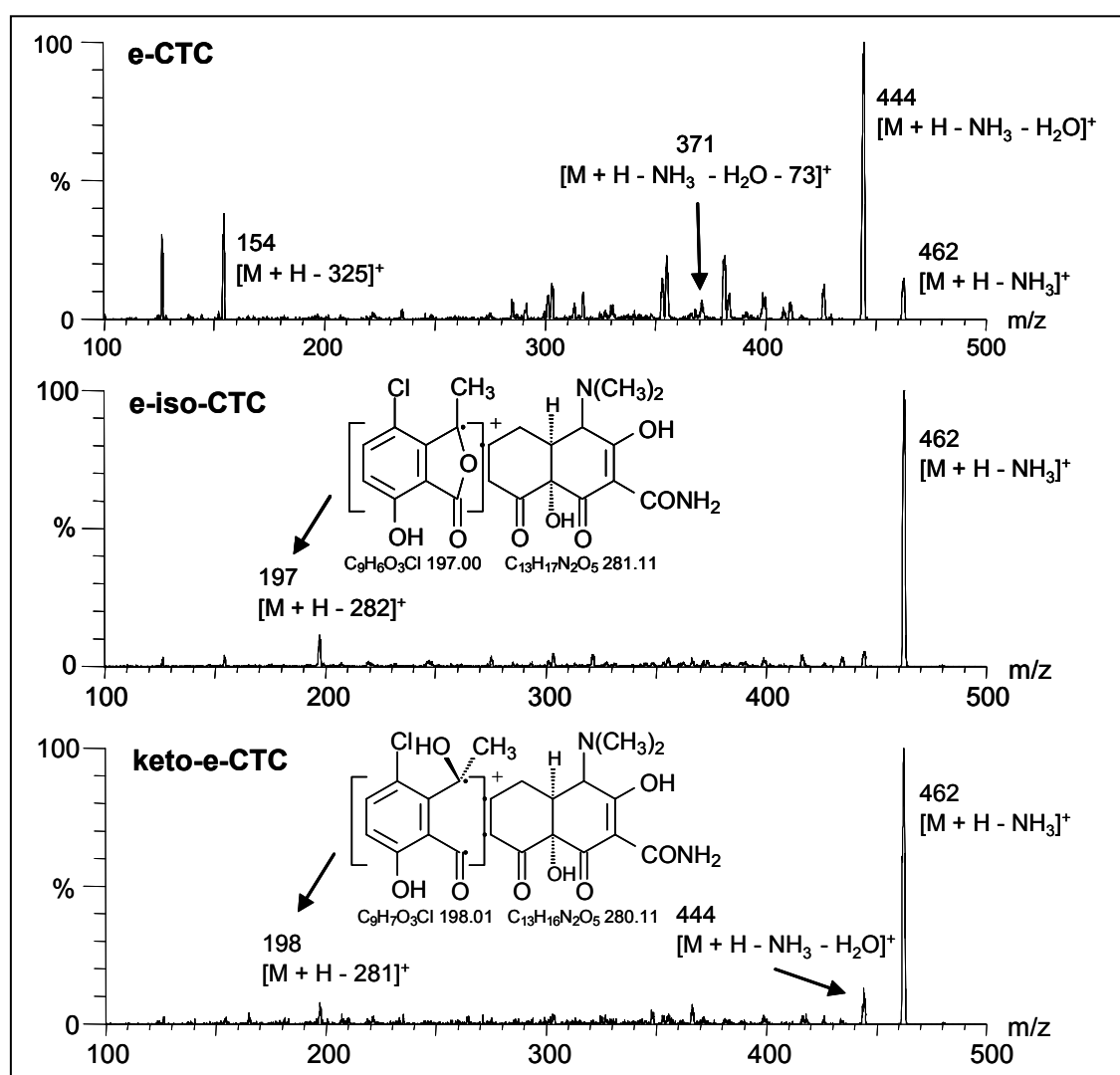


Abb. 29: a) UV-Chromatogramm von CTC und e-CTC sowie der Keto-Verbindungen in 1 mol/L HCl ( $\beta = 10$  mg/L), UV-Spektren von CTC, keto-CTC (b), e-CTC und keto-e-CTC (c); UV-Spektren von CTC, keto-CTC (d), e-CTC und keto-e-CTC (e) von NAIDONG et al. [149]

Ein Vergleich der normierten UV-Spektren der nachgewiesenen Substanzen mit den UV-Spektren von NAIDONG et al. gibt jedoch deutliche Hinweise auf die Keto-Form von CTC und e-CTC (siehe **Abb. 29**) [149]. Die UV-Spektren der Keto-Form von CTC und e-CTC unterscheiden sich erheblich von denen der Enol-Form. Die durch eigene Untersuchungen ermittelten UV-Spektren der unbekannten Substanzen entsprechen denen von NAIDONG et al., so daß davon ausgegangen werden kann, daß es sich bei den zusätzlich auftretenden Strukturisomeren um keto-CTC und keto-e-CTC handelt.

Durchgeführte massenspektrometrische Untersuchungen der unbekannten Komponenten unterstützen die Annahme einer Keto-Form von CTC oder e-CTC. Die Produkt-Ion-Scans von CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC und des unbekannten Stereoisomeres lassen eine Unterscheidung anhand des Fragmentierungsmusters zu. In **Abb. 30** sind die Produkt-Ionen-Scans von e-CTC, e-iso-CTC und e-keto-CTC gegenübergestellt. Es wurden die epimeren Verbindungen gewählt, da e-CTC in höherem Ausmaß zum keto-e-CTC tautomerisiert als CTC zum keto-CTC.



**Abb. 30:** Produkt-Ion-Scans des Precursor-Ions  $m/z$  479 von e-CTC, e-iso-CTC und keto-e-CTC (MS/MS-Bedingungen: Kapillar-Spannung: 3,5 kV, Cone-Spannung: 20 V, Kollisionsenergie: 30 eV)

Das Fragmentierungsmuster von CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC wurde bereits in **Kap. 5.2.1.2**

erläutert, so daß in diesem Zusammenhang nur die Unterschiede in der Fragmentierung der einzelnen Verbindungen verdeutlicht werden. Insbesondere ist auf das nur bei iso-CTC und e-iso-CTC auftretende Produkt-Ion mit  $m/z$  197 hinzuweisen. Für dieses Produkt-Ion kann die in **Abb. 30** dargestellte Spaltung der Ausgangsverbindung postuliert werden. Bei der Kollision des unbekannten Stereoisomers ist ein Produkt-Ion mit  $m/z$  198 entstanden, dessen Bildung aus CTC bzw. e-CTC nur bei Vorliegen der  $\beta$ -Diketon-Form wahrscheinlich ist, da eine Spaltung der Ringe B und C bei Vorliegen einer vinylgen Carbonsäure am C11-, C11a- und C12-Atom aufgrund des konjugierten Systems und der Ausbildung eines relativ spannungsfreien sechsgliedrigen Ringes über Wasserstoffbrückenbindung als wenig günstig erscheint. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei Auftreten des Produkt-Ions mit  $m/z$  198 um die Keto-Form von CTC oder e-CTC handelt. Tritt dieses Produkt-Ion nicht auf, ist auf die Enol-Form zu schließen.

Auf diese Art und Weise ist erstmals auch eine massenspektrometrische Unterscheidung der Keto-Enol-Tautomere möglich. Die durchgeführten Untersuchungen erlauben jedoch keine Aussage darüber, ob bei den Keto-Formen das H-Atom des C11a-Atoms *cis*- oder *trans*-ständig zum H-Atom des C5a-Atoms steht.

## 5.6 *In vitro*- und *in vivo*-Bildung von Metaboliten des CTC

### 5.6.1 *In vitro*-Bildung

In der Literatur werden in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und vom pH-Wert, die Bildung verschiedener Abbauprodukte von CTC beschrieben (siehe **Kap. 3.5.3**) [37, 126, 122, 136, 137, 149, 150]. Nach den Angaben in der Literatur entsteht unterhalb pH 1 das Anhydro-CTC und oberhalb pH 8 das iso-CTC. Im schwach sauren Milieu (pH 2-6) epimerisieren CTC, iso-CTC und Anhydro-CTC. In salzsaurer Lösung lassen sich die Keto-Enol-Tautomere von CTC chromatographisch nachweisen. Bei den Epimerisierungsreaktionen sowie den Keto-Enol-Tautomerien handelt es sich um Gleichgewichtsreaktionen, dagegen ist die Bildung von iso-CTC und Anhydro-CTC aus CTC irreversibel.

Um zu überprüfen, welche Abbauprodukte in saurer methanolischer Lösung, entsprechend der Kalibrierlösung für CTC und e-CTC, entstehen können, wurden analog **Kap. 5.2.1.3** die Abbaureaktionen einzeln von CTC-, e-CTC-, iso-CTC-, Anhydro-CTC- und e-Anhydro-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) ( $\beta = 10$  mg/L) bei einer Temperatur von 40 °C über einen Zeitraum von 60 h verfolgt. Aus iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC entstehen ausschließlich die jeweiligen Epimere. Dies entspricht den Angaben in der Literatur, wonach es sich bei der Bildung von iso-CTC und Anhydro-CTC aus CTC um irreversible Reaktionen handelt.

CTC und e-CTC zeigten neben der bei diesem pH-Wert erwarteten Epimerisierung zusätzlich die Entstehung von iso-CTC, e-iso-CTC und keto-e-CTC (siehe **Abb. 31**). CTC tendiert deutlich geringer dazu, Keto-Enol-Tautomere zu bilden, siehe **Kap. 5.5**, möglicherweise würde aber ein entsprechender Peak mit dem iso-CTC-Peak, siehe **Abb. 29** und **Abb. 31** koeluiieren. Dies könnte der Grund sein, warum im Produkt-Ion-Scan von iso-CTC in Spuren das Produkt-Ion mit  $m/z$  444 auftritt, welches aus iso-CTC nicht entstehen kann. Allerdings konnte das für keto-CTC charakteristische, aber auch weniger intensive Produkt-Ion mit  $m/z$  198 nicht mehr nachgewiesen werden. Damit kann eine mögliche Bildung von keto-CTC als vernachlässigbar eingestuft werden.

Entgegen den Literaturangaben werden also iso-CTC und e-iso-CTC nicht nur im alkalischen Milieu,

sondern auch in saurer methanolischer Lösung bei pH 2,8 gebildet. Darüber hinaus können unter diesen Bedingungen auch Tautomere von e-CTC entstehen.

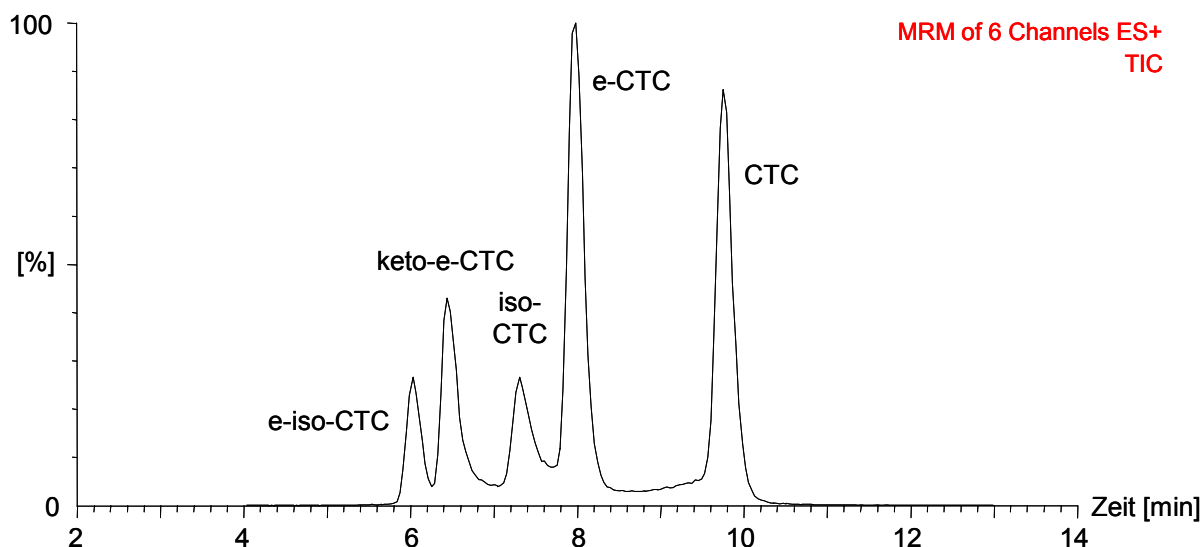


Abb. 31: MS-Chromatogramm (TIC) von CTC und Metabolite nach Lagerung einer CTC-Lösung in MeOH/Fließmittel A (pH 2,8) ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) über 60 h bei einer Temperatur von 40 °C

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß unter den üblichen Bedingungen der Probenvorbereitung bei Raumtemperatur eine Isomerisierung von CTC in Lösung zwar unwahrscheinlich ist, wie die Wiederfindungsversuche mit Standardlösungen in **Kap. 5.2.2.3** ergaben, jedoch bei höheren Temperaturen nicht auszuschließen ist. Die Stabilitätsuntersuchungen von CTC und e-CTC haben gezeigt, daß in saurer methanolischer Lösung bei einer Temperatur von 40 °C neben den isomeren Verbindungen auch keto-e-CTC gebildet wird. Die Produkte Anhydro-CTC, e-Anhydro-CTC und keto-CTC entstehen *in vitro* unter diesen Bedingungen nicht.

### 5.6.2 *In vivo*-Bildung

Eine *in vivo*-Bildung von Umwandlungs- und Abbauprodukten des CTC in Muskulatur, Eiern, Plasma und Niere wurde bereits von verschiedenen Autoren diskutiert [143, 178, 210, 322, 323]. Nach PETZ et al. beträgt die Epimerisierungsrate während der Aufarbeitung für CTC in Muskulatur im Rahmen einer Laborvergleichsuntersuchung im Durchschnitt 10-15 %, in Niere bis zu 40 %, wobei die Probenvorbereitung auf dem Verfahren von FARRINGTON et al. bzw. auf der § 35 LMBG-Methode basiert [224, 226] und sowohl eine Metall-Chelat-Affinitäts-Extraktion als auch eine Festphasenextraktion umfaßt. Nach KÜHNE et al. beträgt die Epimerisierungsrate von CTC in dotierten Muskulaturproben nach der Probenvorbereitung durch Extraktion mit Phosphat-Puffer und anschließender Festphasenextraktion 24,1 %. Im Gegensatz ermittelten sie in gewachsenen Muskulaturproben eine Epimerisierungsrate von 41,6 %, was auf eine zusätzliche *in vivo*-Bildung von e-CTC schließen läßt [322]. Ähnliche Ergebnisse haben ZURHELLE et al. [178] und BLANCHFLOWER et al. [210] erhalten. Letztgenannte Arbeitsgruppe beschreibt die *in vivo*-Bildung von e-CTC sowie der Tautomere in Muskulatur und schließt eine *in vitro*-Bildung dieser Produkte aus, wobei die Extraktion mit Glycin-Puffer und anschließend eine Festphasenextraktion durchgeführt wurde. ZURHELLE et al. wenden eine on-line-Dialyse und on-line Festphasenextraktion für die Aufarbeitung von Hühnereiern an und schließen



sowohl die Bildung von e-CTC als auch von iso-CTC und e-iso-CTC *in vitro* aus. Die in den Eierproben nachgewiesenen e-CTC-, iso-CTC- und e-iso-CTC-Gehalte waren demnach ausschließlich *in vivo* entstanden.

Um zu beurteilen, in welchem Maße weitere Metabolite unter dem in dieser Arbeit entwickelten Analysenverfahren *in vitro* und *in vivo* entstanden sind, wird die Epimerisierungsrate von dotierten Proben mit der von gewachsenen Proben für die Matrices Urin, Plasma, Faeces, Muskulatur, Leber und Niere verglichen (siehe **Tab. 26**). Die Extraktion CTC dotierter Pufferlösungen, also ohne biologische Matrix, führt zu Epimerisierungsraten von etwa 17 %, siehe **Kap. 5.2.2.3**.

Tab. 26: Epimerisierungsrate von CTC in CTC-dotierten und gewachsenen biologischen Proben (LC-MS/MS,  $n = 12$ )

Matrix	% e-CTC			
	dotierte Proben ( $n = 6$ )		Mittelwert dotierte Proben ( $n = 12$ )	gewachsene Proben ( $n = 12$ )
	10 µg/ kg oder L	100 µg/ kg oder L		
Muskulatur	13	17	15	42
Leber	28	26	27	33
Niere	30	26	28	24
Urin	27	31	29	43
Faeces	11	12	12	34
Plasma	30	24	27	35
Knochen	nicht bestimmt			22

Den in **Tab. 26** angegebenen Epimerisierungsraten für dotierte Matrixproben liegen die Ergebnisse aus **Tab. 21** zu Grunde, die sich auf Wiederfindungsstudien mit auf zwei Konzentrationsstufen dotiertem Probenmaterial beziehen. Für die Angaben der gewachsenen Proben wurden die ermittelten Gehalte in den Schlachtproben der Haus Düsse-Studie, siehe **Tab. 22**, herangezogen. Es zeigte sich, daß die Epimerisierungsrate unabhängig von der Konzentration ist, sondern vielmehr von der Matrix sowie den äußeren Einflüssen während der Probenvorbereitung wie Zeitdauer der Aufarbeitung und Temperatur abhängt. PETZ et al. stellten ebenfalls bei einer Laborvergleichsuntersuchung für verschiedene Tetracyclin-Derivate in Muskulatur und Niere fest, daß die Epimerisierungsrate von den äußeren Laborbedingungen abhängt [323].

Die Epimerisierungsrate liegt in dotierten Matrixproben mit Werten zwischen 15 bis 29 % bereits höher als in dotierten Pufferlösungen, die 10 % bis 14 % e-CTC enthalten. In gewachsenen Proben werden nochmals höhere Epimerisierungsraten mit Werten zwischen 22 % und 43 % gefunden. Nur bei der Matrix Niere ergeben sich vergleichbar große Epimerisierungsraten sowohl bei dotiertem als auch gewachsenem Probenmaterial. Ein Vergleich der Epimerisierungsrate in dotierten Matrixproben mit denen in gewachsenen Proben deutet auf eine *in vivo*-Bildung von e-CTC hin, da die relativen Anteile in gewachsenen Proben größer sind als in dotierten. In Abhängigkeit von den Bedingungen der Probenvorbereitung (z.B. Dauer, Temperatur) enthalten Meßlösungen, wie bereits erwähnt, nach der Probenvorbereitung von mit CTC dotierten Pufferlösungen 10 bis 14 % e-CTC, aber kein keto-e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC. In dotierten biologischen Proben konnten nur sehr geringe Gehalte an keto-e-

CTC, iso-CTC und e-iso-CTC nachgewiesen werden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß diese Produkte überwiegend *in vivo* entstehen. In Faeces und Knochen wurden in geringen Mengen auch Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nachgewiesen. Dabei handelt es sich in Faeces um *in vivo* gebildete Abbauprodukte, da weder bei der Probenvorbereitung mit dotierten Pufferlösungen noch mit dotierten Matrixproben diese Produkte entstanden sind. In Knochen kann die Bildung von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch die Extraktion mit Salzsäure erfolgt sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß e-CTC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* entsteht, aber iso-CTC und e-iso-CTC hauptsächlich *in vivo*. Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC spielen als Abbauprodukte eine untergeordnete Rolle, da sie lediglich in Faeces und Knochen in Spuren nachweisbar sind. In Faeces werden Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC *in vivo* gebildet, in Knochen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

## 5.7 Antibiotische Aktivitäten

### 5.7.1 Agar-Diffusionstest

Zur Beurteilung der antibiotischen Aktivität von CTC und seinen Umwandlungs- und Abbauprodukten wurden Standardlösungen der Substanzen CTC, e-CTC, iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mittels Agar-Diffusionstest unter Zugrundelegung der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift (AVV Fleischhygiene) [324] und der DIN 58940 [325] untersucht. Bei dem Agar-Diffusionstest handelt es sich um ein Screening-Verfahren, das in Deutschland als Dreiplattentest (DPT) zur Untersuchung auf antibakteriell wirksame Stoffe (Hemmstoffe) eingesetzt wird. Neben diesem DPT-Test wird häufig auch der EG-Vierplatten-Test eingesetzt, bei dem zusätzlich eine weitere Agar-Platte, pH 8, beschickt mit *Micrococcus luteus* als Testkeim, verwendet wird. Der DPT kann für die Untersuchung von Gewebeproben sowie für flüssige Proben mit Nachweisgrenzen zwischen 30 und 190 µg/L oder µg/kg eingesetzt werden [145, 324, 325, 326]. Unter dem Agar-Diffusionstest wird eine mikrobiologische Untersuchungsmethode verstanden, bei der sich durch die Diffusion eines Wirkstoffes in festen beimpften Kulturmedien wachstumsfreie Hemmhöfe ergeben. Beim DPT werden Agar-Nährboden-Platten auf die pH-Werte 6, 7,2 und 8 eingestellt und mit *Bacillus subtilis* BGA als Testkeim beschickt. Die zu untersuchende Probe wird auf die Agar-Platten aufgebracht und bei einer Temperatur von 30 °C 18 bis 24 Stunden bebrütet [324].

Für die Untersuchung von Lösungen mit dem Agar-Diffusions-Test gibt es zwei Möglichkeiten der Durchführung. Die Lösungen können entweder mittels Testblättchen auf den Agar aufgebracht werden oder aber in ausgestanzte Löcher hineingegeben werden. Die Nachweisgrenze für den „Agarlochtest“ liegt mit 0,044 mg/L deutlich unterhalb derer für den „Blättchentest“ mit 0,19 mg/L und ist deshalb vorzuziehen [327]. Während der Bebrütung diffundieren Hemmstoffe in den Nährboden und verursachen in der Umgebung der Probe eine Wachstumshemmung. Diejenige Fläche, die sich aufgrund der Diffusion des Wirkstoffes in das Kulturmedium als wachstumsfreie Zone zeigt, wird als Hemmhof bezeichnet. Die Auswertung des Testes erfolgt durch Ausmessen der Hemmzonenbreite zwischen dem Rand der aufgegebenen Probe und der Wachstumsgrenze des Testkeimes. Der Hemmhof wird angegeben als Radius in vollen mm. Je nach Größe des Hemmhofes wird als Beurteilungskriterium die Einstufung: positiv ( $\geq 2$  mm), zweifelhaft (1-2 mm) oder negativ ( $< 1$  mm) vorgenommen. Der Radius

wird bei der Agar-Loch-Methode vom Rand des ausgestanzten Lochs bis zum Beginn der Bakterienkolonie gemessen.

Bei der Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels ist zu beachten, daß auch Lösungsmittel eine hemmende Wirkung im Hemmstofftest zeigen können, z. B. ist bekannt, daß das Vorhandensein von Desinfektionsmitteln in der Probe zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Daher wurden zunächst verschiedene Lösungsmittel mittels der Agar-Loch-Methode auf eine hemmende Wirkung im DPT untersucht, wobei sich Fließmittel A als ungeeignet erwies, als optimales Lösungsmittel ergab sich Methanol. Zur Prüfung der hemmenden Wirkung von CTC und seiner Umwandlungs- und Abbauprodukte wurden methanolische Lösungen von CTC, e-CTC, iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC hergestellt und mittels dem DPT und der Agar-Loch-Methode untersucht. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß sich gut auswertbare Hemmhöfe ergaben. In der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift [324] werden für eine Aufgabemenge von 0,01 µg ein Hemmhof von 7-9 mm für CTC angegeben. Da erwartungsgemäß die Metabolite von CTC eine geringere hemmende Wirkung zeigen sollten, siehe **Kap. 3.5.3**, wurden erheblich höhere Mengen der entsprechenden Substanzen von 2,5 µg aufgetragen. In **Tab. 27** sind die mittels DPT und der Agar-Loch-Methode erhaltenen Hemmhöfe für die einzelnen Substanzen zusammengefaßt.

*Tab. 27: Untersuchung von CTC, e-CTC, Anhydro-CTC, e-Anhydro-CTC und iso-CTC in methanolischer Lösung mittels DPT (Agar-Loch-Methode) (n = 8)*

Substanz	Aufgabemenge: 2,5 µg		
	pH 6	pH 7,2	pH 8
	Hemmhof [mm]		
CTC	23	20	11
e-CTC	13	10	5
Anhydro-CTC	17	14	8
e-Anhydro-CTC	9	7	3
iso-CTC	0	0	0

Die Ergebnisse belegen, daß außer dem iso-CTC alle Substanzen eine hemmende Wirkung im DPT zeigen. Anhydro-CTC besitzt im Vergleich zum CTC eine verminderte antibiotische Wirkung um 30 % bis 40 %. Ebenso zeigen die jeweiligen Epimere im Vergleich zu ihren Muttersubstanzen, also e-CTC und e-Anhydro-CTC im Vergleich zu CTC und Anhydro-CTC, eine um die Hälfte abgeschwächte antibiotische Aktivität. Diese Untersuchungen widerlegen eindeutig die in der Literatur häufig getroffene Behauptung der antibiotischen Unwirksamkeit von e-CTC sowie der Anhydro-Verbindungen [48, 49, 57, 138].

Verschiedene Studien aus neuerer Zeit belegen, ebenso wie die eigenen Untersuchungen, die besondere Bedeutung der Metabolite e-CTC, Anhydro-CTC sowie e-Anhydro-CTC hinsichtlich der antibiotischen Wirksamkeit, dagegen ist iso-CTC bezüglich der antibiotischen Wirkung bedeutungslos [124, 143, 145, 328]. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde weiterhin festgestellt, daß mit steigendem pH-Wert die Hemmzonen abnehmen, entsprechend dem Wirkungsoptimum von CTC bei einem pH-Wert von 6,1-6,6 (siehe **Kap. 3.3**), was deutliche Hinweise auf mögliche Abbaureaktionen während

des Agar-Diffusionstestes gibt.

### 5.7.2 Bildung von Abbauprodukten während des Agar-Diffusionstests

Ziel dieser Untersuchung war es, mögliche Abbaureaktionen der antibiotisch aktiven Substanzen CTC, e-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC während der Testdauer aufzudecken. Entsprechende Untersuchungen wurden bereits von HALLING-SØRENSEN et al. durchgeführt [328], die feststellten, daß es während der Durchführung des Toxizitätstestes (Hemmstofftest) nach ISO 15522, bei dem ebenfalls Agar-Platten eingesetzt werden, zu einem Abbau der Substanzen CTC, e-CTC und e-Anhydro-CTC kommt und die Wiederfindungen dieser Produkte nach dem Test zwischen 82 % und 91 % liegen, wobei ein Verlust von Substanzen während des Testes von bis zu 20 % allgemein akzeptiert wird.

Zur Untersuchung von Abbaureaktionen während des DPT wurde der Test mit methanolischen Standardlösungen von CTC, e-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC und unterschiedliche Bebrütungszeiten von 1, 2, 3, 18, 20, 22 und 24 Stunden durchgeführt, der resultierende Hemmhof gemessen, die Agar-Platten mit Methanol extrahiert und die so erhaltenen methanolischen Extrakte mittels LC-MS/MS analysiert. Eine vollständige Extraktion der Analyten aus den Agar-Platten nach dem Test, also nach Diffusion der Substanzen in die Platten, kann hierbei nicht gewährleistet werden, da nicht die gesamten Agar-Platten mit Methanol extrahiert wurden, sondern nur der Agarbereich, bei dem ein Hemmhof entstanden ist. Die durchgeführten Untersuchungen mittels DPT ergaben, daß sich innerhalb der ersten drei Stunden kein Hemmhof ausgebildet hatte. Nach Bebrütungszeiträumen von 18, 20, 22 und 24 Stunden haben sich jeweils identische Hemmhöfe ergeben, die den in **Tab. 27** angegebenen Radien entsprachen. Die LC-MS/MS-Untersuchungen der methanolischen Extrakte zeigten, daß aus Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC während der gesamten Bebrütungszeit keine Abbauprodukte entstanden. Aus CTC und e-CTC wurden, wie erwartet, in hohem Maße die isomeren Verbindungen gebildet. Entgegen den Erwartungen konnte im Falle von e-CTC neben der Bildung von iso-CTC auch geringfügig eine Epimerisierung zum CTC sowie eine Tautomerisierung zum keto-e-CTC beobachtet werden. Die schnellere Bildung der antibiotisch inaktiven isomeren Verbindungen während des Testes kann Ursache für die mit dem DPT festgestellten geringeren Hemmzonen und damit geringere antibiotische Aktivität von e-CTC im Vergleich zum CTC sein. Im Gegensatz dazu wurde beim CTC als Umwandlungsprodukt nur das Isomere, also iso-CTC, nachgewiesen. Da die isomeren Verbindungen von CTC und e-CTC antibiotisch inaktiv sind, führt dies zu einer verminderten Hemmwirkung im DPT.

Eine Aussage über das Maß des Abbaus während der Testdauer ist aufgrund der nicht vollständigen Extraktionsausbeute schwierig. Für die Untersuchung von CTC kann jedoch das Verhältnis der Konzentration von iso-CTC zu CTC als Maß für die Abbaurate herangezogen werden, da ausschließlich dieses Produkt entstanden ist. Liegt dieser Quotient unterhalb von 0,2, so liegt die Abbaurate in dem allgemein akzeptierten Rahmen von 20 % [328], oberhalb dessen ist von einer signifikanten Verfälschung des Ergebnisses auszugehen. Beim e-CTC kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden, da eine Quantifizierung aller entstandenen Produkte nicht möglich ist und damit auch kein entsprechender Quotient berechnet werden kann. Die für CTC ermittelten Quotienten belegen, daß es in Abhängigkeit vom pH-Wert rasch zu einem signifikanten Abbau von CTC während der Durchführung des DPT kommt, siehe **Abb. 32**.

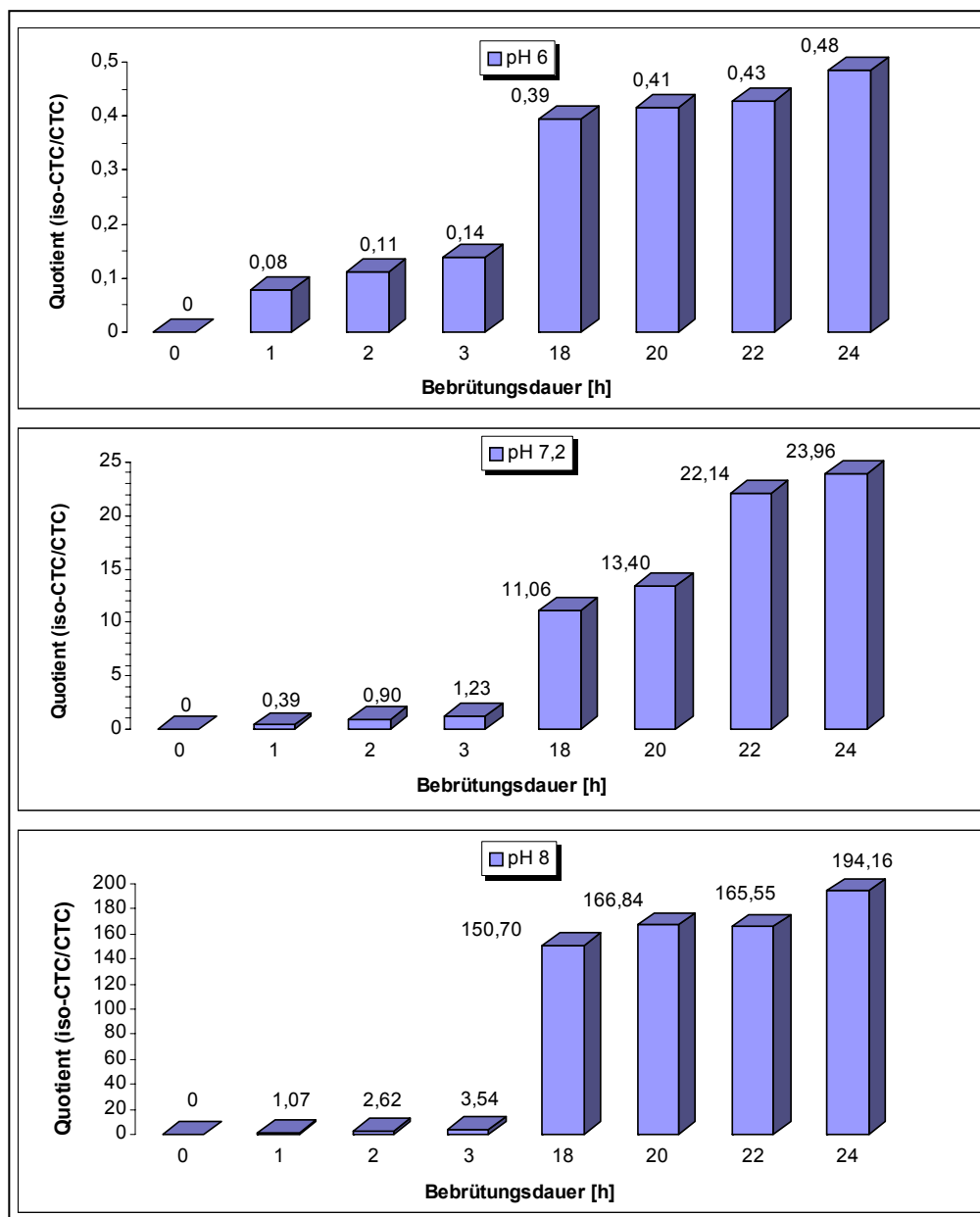


Abb. 32: Berechnete Quotienten (Verhältnis der Konzentration von iso-CTC:CTC) nach Durchführung des DPT mit unterschiedlicher Bebrütungsdauer

Bei pH 6 wird nach 18 h der Grenzwert von 0,2 überschritten, bei pH 7,2 und 8 bereits nach einer Bebrütungsdauer von einer Stunde. Deutlich zu erkennen ist, daß mit steigendem pH-Wert die Umwandlung von CTC ins Isomere zunimmt. Bei pH 8 ist CTC fast vollständig umgewandelt worden. Aus der Umwandlung von CTC in iso-CTC resultiert eine Abnahme der antibiotischen Aktivität, da die isomeren Verbindungen keine hemmende Wirkung zeigen. Möglicherweise kann diese Tatsache auch zu falsch negativen Ergebnissen führen. Bemerkenswert ist, daß trotz zunehmender Umwandlung von CTC in iso-CTC nach einer Bebrütungszeit von 18 h bis 24 h der gemessene Hemmhof nach den entsprechenden Testzeiträumen identisch ist.

### 5.7.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und Konsequenzen

Das in den Proben der Medikationstudien aufgetretene, zunächst unbekannte Produkt konnte als keto-e-CTC identifiziert werden. Zur Beurteilung, welche Metabolite in die Ermittlung des CTC-Gehaltes mit einbezogen werden müssen, wurde nachfolgend untersucht, welche Metabolite *in vitro* und welche *in vivo* entstehen. Weiterhin wurde die antibiotische Aktivität von CTC, e-CTC, Anhydro-CTC, e-Anhydro-CTC und iso-CTC geprüft. Als wichtigstes Umwandlungsprodukt ist das e-CTC zu nennen, welches sowohl *in vitro* zwischen 12 % und 29 % auch *in vivo* zwischen 6 % und 27 % entsteht. Das e-CTC zeigt zwar im Vergleich zum CTC eine antibiotische Wirkung von 50 %, aber eine um den Faktor 300 höhere Fähigkeit, Resistenzen auszubilden (siehe **Kap. 3.4.1**). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit, e-CTC bei der Ermittlung des CTC-Gehaltes zu berücksichtigen. Die Umwandlungsprodukte iso-CTC und e-iso-CTC entstehen nicht unter den üblichen *in vitro*-Bedingungen der Probenvorbereitung. Sie werden in überwiegendem Maße *in vivo* gebildet. Jedoch können diese Produkte bei höheren Temperaturen auch in Lösung vorkommen. Iso-CTC und e-iso-CTC zeigen keine antibiotische Wirkung und besitzen im Vergleich zum CTC nur eine geringfügige Fähigkeit, Resistenzen auszubilden [328]. Über die Toxizität dieser Verbindungen ist wenig bekannt. Da nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, daß diese Verbindungen auch während der Probenvorbereitung, also *in vitro*, entstehen, sind diese Substanzen bei der Ermittlung des CTC-Gehaltes mit zu berücksichtigen. Als weiteres Umwandlungsprodukt tritt das keto-e-CTC auf. Es wurde gezeigt, daß dieses Tautomer überwiegend *in vivo*, aber auch *in vitro* entstehen kann. Ein Vergleich der Peakfläche von keto-e-CTC und den anderen nachgewiesenen Substanzen (siehe **Abb. 26**) zeigt, daß dieses Umwandlungsprodukt eher eine geringe Rolle spielt. Ebenfalls eine untergeordnete Rolle spielen die Abbauprodukte Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC, da diese in biologischen Proben nur in geringer Menge in Faeces und Knochen vorkommen. Aufgrund ihrer antibiotischen Aktivität, die 60 % bis 70 % der des CTC beträgt und ihrer hohen Humantoxizität, siehe **Kap. 3.5.3.4**, sowie der Tatsache, daß Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC in Knochen auch *in vitro* entstehen können, ist aber eine Quantifizierung dieser Substanzen trotzdem erforderlich. Dies wird unterstützt durch die Eigenschaft von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC, in der im Vergleich zum CTC 30-fach ausgeprägteren Fähigkeit, Resistenzen zu fördern [83, 84, 328].

Als Resultat dieser Ergebnisse wird die Empfehlung von KENNEDY et al. [143], die Hühnereier untersuchten, bestätigt, daß Chlortetracyclinrückstände nicht nur auf die Summe des antibiotisch aktiven CTC und e-CTC beschränkt bleiben sollten, sondern auch weniger antibiotisch aktive potentiell toxische sowie resistenzfördernde Metabolite wie iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit einbezogen werden sollten.

Nachfolgend wurden daher auch für diese Verbindungen Quantifizierungsmethoden entwickelt.

## 5.8 Methodenentwicklung zur quantitativen Bestimmung weiterer CTC-Metabolite

Ziel war es, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Metabolite iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC zu entwickeln. Das für CTC und e-CTC entwickelte und validierte Analysenverfahren ermöglicht bisher nur die qualitative Bestimmung der genannten Verbindungen. Zur quantitativen Bestimmung muß die Stabilität der Analyten in Kalibrierlösungen gewährleistet sein. Daher erfolgte in einem ersten Schritt die Untersuchung der Stabilität von iso-CTC, e-iso-CTC,

Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC in Kalibrierlösungen analog der für CTC durchgeführten Untersuchungen, siehe **Kap. 5.2.1.3**. Die Quantifizierung von e-iso-CTC erweist sich dabei als schwierig, da es als Standardsubstanz kommerziell nicht erhältlich ist. Dieses Umwandlungsprodukt sollte durch Epimerisierung in schwach saurer Kalibrierlösung, MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8), hergestellt werden. Nach Überprüfung der Linearität des Verfahrens wurde untersucht, ob sich das für CTC und e-CTC entwickelte Extraktionsverfahren auch für die anderen Metabolite eignet. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit untersucht, iso-CTC und e-iso-CTC als Summenparameter zu nutzen, indem CTC und e-CTC durch alkalische Behandlung der Proben in die isomeren Verbindungen überführt werden.

## 5.8.1 HPLC-UV-MS/MS-Verfahren

### 5.8.1.1 Stabilität der Metabolite in Lösung

#### iso-CTC und e-iso-CTC

Von einigen Autoren wie KENNEDY et al. wird auf die Möglichkeit, iso-CTC einer Epimerisierung zu unterwerfen, um e-iso-CTC zu erhalten, hingewiesen [143]. Sie nutzten jedoch einen epimerisierten iso-CTC-Standard nur zur qualitativen Bestimmung. Um darüber hinaus eine Quantifizierung mit einem solchen Standard durchzuführen, muß die Stabilität der Komponenten bekannt sein. Ziel war es, das sich unter den gewählten Bedingungen einstellende Gleichgewicht von iso-CTC und e-iso-CTC in Kalibrierlösung zu ermitteln, um eine möglichst hohe Stabilität zu gewährleisten. Hierzu wurde das Mischungsverhältnis von iso-CTC und e-iso-CTC bestimmt, bei dem sich keine Konzentrationsänderung mehr ergibt. Zur Beurteilung der Stabilität von iso-CTC in Kalibrierlösung wurden die Untersuchungsergebnisse zum Abbauverhalten von iso-CTC, **Kap. 5.6.1**, ausgenutzt. Es zeigte sich, daß während der Lagerung einer iso-CTC-Standardlösung in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) ( $\beta = 10$  mg/L) bei einer Temperatur von 40 °C über einen Zeitraum von 60 h schnell eine Epimerisierung stattfindet. Nach zwölf Stunden war keine Konzentrationsänderung mehr festzustellen. Weitere Abbauprodukte konnten nicht nachgewiesen werden. Um die Einstellung eines äquimolaren Verhältnisses von iso-CTC und e-iso-CTC zu beschleunigen, wurde eine iso-CTC-Standardlösung in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) ( $\beta = 10$  mg/L) bei einer Temperatur von 60 °C über einen Zeitraum von 60 h gelagert und mittels HPLC-UV in Intervallen von 15 Minuten die Konzentrationen von iso-CTC und e-iso-CTC ermittelt, siehe **Abb. 33**. Es zeigte sich, daß bereits nach 90 Minuten ein äquimolares Verhältnis beider Verbindungen erreicht ist.

Die genaue Konzentrationsbestimmung von iso-CTC und e-iso-CTC in der epimerisierten iso-CTC-Standardlösung erfolgte durch Vergleich der frisch angesetzten iso-CTC-Lösung mit der epimerisierten iso-CTC-Lösung über Differenzbildung. Die so erhaltene Mischstandardlösung aus iso-CTC und e-iso-CTC kann zur Kalibrierung des Verfahrens eingesetzt werden.

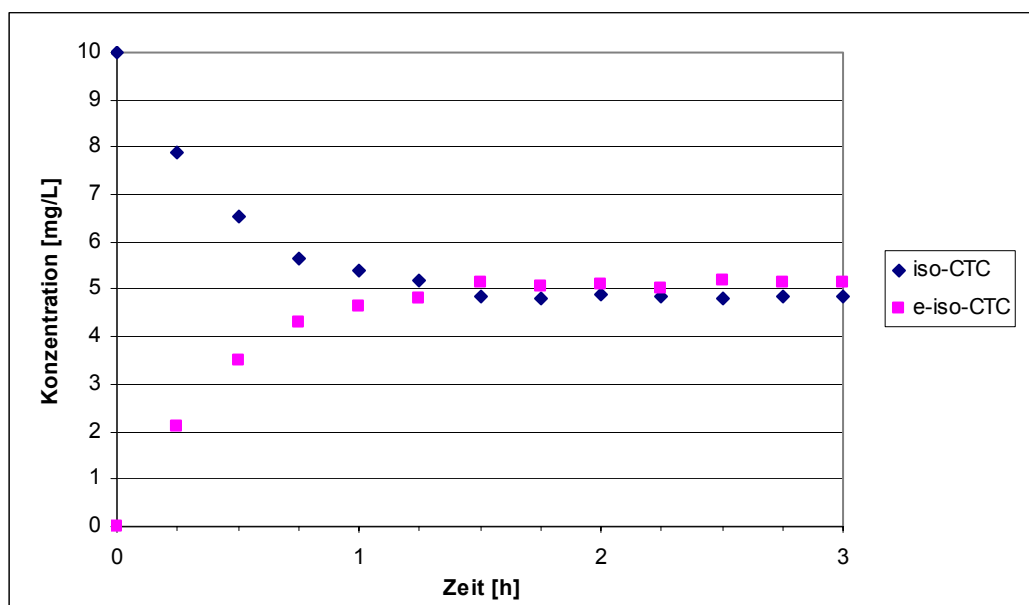


Abb. 33: Epimerisierung von iso-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) bei 60 °C als Funktion von der Zeit (HPLC-UV, 275 nm,  $\beta = 10$  mg/L)

### Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC

Zur Beurteilung der Stabilität von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC wurde anhand der in **Kap. 5.6.1** durchgeführten Untersuchungen zum Abbauverhalten von Anhydro-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) ( $\beta = 10$  mg/L) bei einer Temperatur von 40 °C über einen Zeitraum von 60 h das sich unter den gewählten Bedingungen einstellende Gleichgewicht abgeschätzt. Bei der Bildung der Anhydro-Verbindungen aus CTC handelt es sich ebenfalls um irreversible Reaktionen, so daß neben der entsprechenden Epimerisierung von Anhydro- bzw. e-Anhydro-CTC keine weiteren Reaktionen stattfinden. Das Konzentrationsverhältnis von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC, bei dem sich keine weitere Konzentrationsveränderung mehr ergab, wurde zu 1:1 ermittelt (siehe **Abb. A. 13** im Anhang). Die Kalibrierung von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC kann also mit Mischstandardlösungen aus Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) im Konzentrationsverhältnis 1:1 erfolgen.

#### 5.8.1.2 Kalibrierung

##### iso-CTC und e-iso-CTC

Nach Ermittlung der Bestimmungsgrenzen, die für iso-CTC und e-iso-CTC mit der UV-Detektion bei 0,05 mg/L und mit der MS/MS-Detektion bei 0,01 mg/L lagen, erfolgte die Erstellung einer Kalibrierfunktion im Konzentrationsbereich von 0,05 mg/L bis 10 mg/L für die UV-Detektion und 0,01 mg/L bis 10 mg/L für die MS/MS-Detektion.

Die Kalibrierung des UV-Verfahrens ergibt einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche sowohl für iso-CTC als auch für e-iso-CTC im gewählten Konzentrationsbereich (s. **Abb. A. 11** im Anhang). Die ermittelten Konzentrationen, die Peakflächen, relativen Standardabweichungen und die Flächenverhältnisse sind in **Tab. A. 21** im Anhang dargestellt. Bei der Kalibrierung des MS/MS-Verfahrens im Konzentrationsbereich von 0,01 mg/L bis 10 mg/L liegt kein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche von iso-CTC sowie e-iso-



CTC vor. Der funktionale Zusammenhang wird wie bei der Bestimmung von CTC und e-CTC durch eine polynomische Funktion 2. Grades beschrieben (s. **Abb. A. 12** im Anhang). Die ermittelten Konzentrationen, Peakflächen, relativen Standardabweichungen und Flächenverhältnisse für die MS/MS-Detektion sind in **Tab. A. 22** im Anhang dargestellt. Durch Einschränkung des Arbeitsbereiches und Aufteilung in drei Teilbereiche (0,01-0,1 mg/L; 0,1-0,5 mg/L und 0,5-10 mg/L) konnte eine Linearität erreicht werden.

### Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC

Die Bestimmungsgrenzen wurden für Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit der UV-Detektion zu 0,025 mg/L und mit der MS/MS-Detektion zu 0,01 mg/L ermittelt. Die Erstellung der Kalibrierfunktion erfolgte mit der UV-Detektion im Konzentrationsbereich von 0,025 mg/L bis 10 mg/L und mit der MS/MS-Detektion von 0,01 mg/L bis 10 mg/L. Sowohl bei der UV-Detektion als auch bei der MS/MS-Detektion läßt sich im gewählten Konzentrationsbereich der funktionale Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche durch einen linearen Zusammenhang beschreiben (**Abb. A. 14** und **Abb. A. 15** im Anhang). Im Gegensatz zu der Quantifizierung von CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC läßt sich bei der MS/MS-Detektion keine bessere Anpassung der Kalibriergeraden für Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC durch eine polynomische Funktion erreichen. Trotz des großen Kalibrierbereiches genügt die Kalibriergerade einer linearen Funktion. Die Konzentrationen, ermittelten Peakflächen und relativen Standardabweichungen sind in **Tab. A. 23** im Anhang dargestellt.

## 5.8.2 Probenvorbereitung

### 5.8.2.1 Wiederfindung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC

Ziel war es, die Übertragbarkeit des entwickelten SPE-Verfahrens für CTC und e-CTC auf die Metabolite iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC zu überprüfen. Hierzu wurde 10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 mit 2 µg bzw. 20 µg CTC, e-CTC, iso-CTC, Anhydro-CTC oder e-Anhydro-CTC dotiert, diese Lösungen mit SPE aufgearbeitet und mit HPLC-UV analysiert. Die mit diesem Verfahren erzielten Wiederfindungen sind in **Tab. 28** zusammengefaßt.

*Tab. 28: Wiederfindung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nach der Aufarbeitung mit SPE von dotierten EDTA-McIlvain-Puffern (Oasis HLB, McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA, 275 nm, n = 6)*

dotierte Substanz	Wiederfindung [%] Zusatz: 2 µg, V <sub>End</sub> = 200 µL			Wiederfindung [%] Zusatz: 20 µg, V <sub>End</sub> = 200 µL		
			Σ			Σ
iso-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC		iso-CTC	e-iso-CTC	
	58	44	102	49	48	97
Anhydro-CTC	Anhydro-CTC	e-Anhydro-CTC	Σ	Anhydro-CTC	e-Anhydro-CTC	Σ
	77	19	96	75	24	99
e-Anhydro-CTC	e-Anhydro-CTC	Anhydro-CTC	Σ	e-Anhydro-CTC	Anhydro-CTC	Σ
	75	20	95	70	26	96

Für e-iso-CTC konnten keine Wiederfindungsversuche durchgeführt werden, da diese Substanz kom-

merziell nicht erhältlich ist. Die ermittelten Wiederfindungen belegen, daß während der Arbeitsschritte zur Festphasenextraktion große Anteile der dotierten Substanz epimerisiert werden. Ein Vergleich der Epimerisierungsraten von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit denen von CTC und e-CTC, siehe **Tab. 7**, zeigt daß Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC in ihrem Epimerisierungsverhalten CTC und e-CTC sehr ähnlich sind. Die Epimerisierungsrate dieser Verbindungen liegt bei etwa 20 %. Dagegen epimerisiert iso-CTC mit Epimerisierungsraten von 46 % in deutlich größerem Ausmaß.

Es konnte gezeigt werden, daß unter Berücksichtigung der jeweiligen Epimere mit Wiederfindungen zwischen 95 % und 102 % eine quantitative Extraktion mit dem SPE-Verfahren für iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC möglich ist. Zu bemerken ist, daß zur Elution der hydrophoberen Substanzen Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC das Elutionsvolumen von 3 mL auf 6 mL erhöht werden mußte.

#### 5.8.2.2 Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung

Analog der für CTC und e-CTC durchgeführten Untersuchungen, wurde überprüft, in welchem Schritt der Probenvorbereitung eine Epimerisierung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC stattfindet. Hierzu wurden die gleichen Versuche wie für CTC und e-CTC durchgeführt. Es wurden einzelne Schritte der Probenvorbereitung simuliert und in den erhaltenen Proben der Gehalt an zudotierter Substanz und dem Epimeren ermittelt. Aus den Gehalten wurden die Epimerisierungsraten berechnet, siehe **Tab. 29**. Die Ergebnisse dieser Epimerisierungsexperimente führten zu identischen Ergebnissen wie die Untersuchungen mit CTC und e-CTC.

Es wurde gezeigt, daß eine Epimerisierung besonders durch die Einwirkung des schwach sauren McIlvain-Puffers bei der Extraktion aus der Matrix begünstigt wird, wobei die Dauer der Puffer-Einwirkung eine große Rolle spielt. Das Stehenlassen eines dotierten McIlvain-Puffers über einen Zeitraum von 2 h führt zu einer Epimerisierung von 30 % für iso-CTC, 12 % für Anhydro-CTC und 14 % für e-Anhydro-CTC (Versuch 1). Bei der Weiterverarbeitung des Eluates kann eine Epimerisierung nur durch Lyophilisierung des Eluates vermieden werden (Versuche 3-5). Einengen im Turbo-Vap unter erhöhter Temperatur führt für alle Verbindungen (30°C, 40 °C) zu einer erheblichen Epimerisierung von 6 % bis 8 % für Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC und 19 % bis 24 % für iso-CTC. Eine Epimerisierung während der Probenvorbereitung kann dadurch minimiert werden, indem die Weiterverarbeitung des Eluates durch Lyophilisierung anstatt durch Einengen im TurboVap erfolgt (Versuche 6 und 7).

Auch bei diesen Metaboliten kann jedoch eine Epimerisierung während der Probenvorbereitung nicht vollständig vermieden werden. Dies zeigt, daß auch die iso-CTC- und Anhydro-CTC-Gehalte immer als Summe aus iso-CTC und Anhydro-CTC und ihrem Epimeren ermittelt werden müssen. Ein Vergleich der Ergebnisse der Epimerisierungsexperimente von CTC, e-CTC, iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC belegt, daß CTC, e-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC ein ähnliches Epimerisierungsverhalten zeigen. Hingegen epimerisiert iso-CTC deutlich schneller als die anderen Substanzen.

Tab. 29: Epimerisierung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC unter verschiedenen simulierten Extraktions- und SPE-Bedingungen (Oasis HLB, 275 nm,  $n = 4$ )

Simulierter Schritt der Probenvorbereitung		Versuch	Epimerisierung [%]		
			iso-CTC	Anhydro-CTC	e-Anhydro-CTC
1	Extraktion aus der Matrix	10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 + 20 µg Substanz, 2 h Stehenlassen bei RT	30	12	14
2	SPE	10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 + 20 µg Substanz, SPE, Verdünnung des Eluates mit 3 mL Fließmittel A	24	9	10
3	Weiterverarbeitung des Eluates	3 mL MeOH + 2 µg Substanz, Einengen des Eluates durch Lyophilisierung, Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	~ 0	~ 0	~ 0
4	Weiterverarbeitung des Eluates	3 mL MeOH + 2 µg Substanz, Einengen im TurboVap (30 °C) (Dauer: 30 min), Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	19	7	6
5	Weiterverarbeitung des Eluates	3 mL MeOH + 2 µg Substanz, Einengen im TurboVap (40 °C) (Dauer: 20 min), Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	24	8	8
6	SPE + Weiterverarbeitung des Eluates	10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 + 2 µg Substanz, SPE, Einengen des Eluates durch Lyophilisierung, Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	18	6	7
7	SPE + Weiterverarbeitung des Eluates	10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 + 2 µg Substanz, SPE, Einengen des Eluates im TurboVap (30 °C), Aufnahme des Rückstandes in 200 µL MeOH/Fließm. A (50/50) (v/v)	29	16	

### 5.8.2.3 iso-CTC und e-iso-CTC als Summenparameter

Ziel der Untersuchung war, die Anzahl der zu quantifizierenden Analyten zu reduzieren, indem CTC und e-CTC durch alkalische Einwirkung in die entsprechenden Isomere iso-CTC und e-iso-CTC überführt werden. Iso-CTC und e-iso-CTC dienen dabei als Summenparameter für die CTC-Komponenten. Diese Möglichkeit wurde bereits von ZURHELLE et al. vorgeschlagen, die in Hühnereiern neben CTC und e-CTC auch iso-CTC und e-iso-CTC nachgewiesen hatten [178, 229].

Zur Überführung von CTC und e-CTC in die isomeren Verbindungen wurde der Rückstand des eingengten Eluates der Festphasenextraktion in methanolischer Natronlauge, Methanol/1%ige NaOH, w/v (50/50) (v/v, pH 11,5), aufgenommen und mit LC-UV-MS/MS analysiert. In einem ersten Schritt erfolgte die Überprüfung der Eignung dieses Verfahrens anhand von Standardlösungen, anschließend die Übertragung auf Muskulatur.

Die Untersuchung von Mischstandardlösungen aus CTC und e-CTC in MeOH/(1%ige NaOH, w/v) (50/50) (v/v), die sowohl ohne Erwärmung als auch nach 30-minütiger Erwärmung bei Temperaturen

von 60, 70, 80 und 90 °C analysiert wurden, ergab, daß bereits ohne Erwärmen eine 96%ige Isomerisierung stattgefunden hat. Zur vollständigen Isomerisierung von CTC und e-CTC ist eine Erwärmung von 60 °C über einen Zeitraum von 30 Minuten ausreichend.

Dieses Verfahren kam anschließend für verschiedene Muskulaturproben zur Anwendung, für Proben einiger Versuchstiere des Haus Düsse-Versuches, nachfolgend als HD-V (Nummer des Tieres) bezeichnet, und für das Tier 95 des FAL-Versuches. Im Gegensatz zu den mit Standardlösungen durchgeführten Versuchen lassen sich CTC und e-CTC in Muskulatur nicht quantitativ in die Isomere überführen, siehe **Tab. 30**. Nach der Alkalibehandlung ist zwar kein CTC und e-CTC mehr nachweisbar, jedoch werden nur etwa 30 % des CTC-Gehaltes als iso-CTC und e-iso-CTC, wiedergefunden.

*Tab. 30: CTC-, e-CTC-, iso-CTC- und e-iso-CTC-Gehalte in Muskulatur nach Aufarbeitung nach dem Standardverfahren und mit alkalischer Behandlung (LC-MS/MS, n = 2)*

	Probe	CTC-Gehalt [ $\mu\text{g/kg}$ ]				$\Sigma$
		CTC	e-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	
Aufarbeitung nach dem Standardverfahren	HD-V1	5,07	5,34	8,12	10,41	28,94
	HD-V3	5,68	5,91	8,50	11,59	31,68
	HD-V7	6,78	6,73	10,34	11,51	35,36
	HD-V9	12,62	10,21	6,24	7,79	36,86
	HD-V12	5,79	4,06	10,10	11,85	31,80
	FAL-Tier 95	90,04	55,04	22,60	15,5	183,18
Aufarbeitung mit alkalischer Behandlung	HD-V1	--	--	5,67	2,83	8,50
	HD-V3	--	--	8,73	4,55	13,28
	HD-V7	--	--	7,28	3,18	10,46
	HD-V9	--	--	8,69	4,79	13,48
	HD-V12	--	--	6,41	3,43	9,84
	FAL-Tier 95	--	--	48,32	18,68	67,00

Prinzipiell scheint die Überführung von CTC und e-CTC mittels Alkalibehandlung in die Isomere durch Aufnahme des eingeeengten Eluates nach der Festphasenextraktion mit MeOH/1%ige NaOH, w/v (50/50) (v/v) zwar möglich, wie die Versuche mit Standardlösungen gezeigt haben. Es bedarf jedoch für Muskulatur noch weiterer Optimierungen, auf die in diesem Rahmen verzichtet wurde.

### 5.8.3 Zusammenfassung

Im Gegensatz zu den meisten in der Literatur beschriebenen Verfahren ermöglicht das erweiterte HPLC-UV-MS/MS-Verfahren neben CTC und e-CTC auch eine quantitative simultane Bestimmung von iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC.

Es wurde die Möglichkeit aufgezeigt, das kommerziell nicht erhältliche Umwandlungsprodukt e-iso-CTC durch Epimerisierung einer iso-CTC-Standardlösung in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) zu erhalten, wobei das Konzentrationsverhältnis zur Gewährleistung der Stabilität beider Verbindungen 1:1 betragen sollte. Ebenso können Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC durch Kalibrierung mit einem Mischstandard in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) (pH 2,8) aus beiden Verbindungen im

Konzentrationsverhältnis 1:1 quantifiziert werden. Die Kalibrierung kann mit der UV-Detektion in einem Konzentrationsbereich von 0,05 mg/L bis 10 mg/L für iso-CTC und e-iso-CTC und 0,025 mg/L bis 10 mg/L für Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC erfolgen. Die Kalibrierung mit der MS/MS-Detektion ist im Konzentrationsbereich von 0,01 mg/L bis 10 mg/L für iso-CTC und e-iso-CTC und 0,01 mg/L bis 10 mg/L für Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC möglich. Weitergehende Validierungsuntersuchungen sowie Langzeitstabilitätsmessungen stehen noch aus.

Es wurde gezeigt, daß das für CTC und e-CTC entwickelte Extraktionsverfahren auch für die Metabolite iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC anwendbar ist, wobei die Gehalte auch als Summe von iso-CTC und e-iso-CTC sowie Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC ermittelt werden müssen.

Das Ziel, die Substanzen CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC durch alkalische Behandlung als Summenparameter über iso-CTC und e-iso-CTC zu ermitteln, konnte für Standardlösungen erreicht werden, für Muskulatur erneut jedoch nicht.

## 5.9 Anwendung des erweiterten Analysenverfahrens auf Proben der FAL-Studie

Das erweiterte HPLC-UV-MS/MS-Verfahren, welches sich für die quantitative Bestimmung von CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC eignet, wurde auf Proben der FAL-Studie angewendet. In den Schlachtproben der nach Ablauf der Wartezeit geschlachteten Tiere wurde der CTC-Total-Gehalt ermittelt sowie anhand eines Tieres eine ausführliche Bilanzierung vorgenommen. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung von Knochen mittels Fluoreszenz-Screening-Tests und eine Überprüfung, ob aus den gebundenen Tetracyclin-Rückständen im Knochen eine Gefährdung für den Verbraucher resultieren könnte.

### 5.9.1 Schlachtproben

Die Schlachtproben der Tiere, die bereits auf CTC und e-CTC untersucht wurden, siehe **Kap. 5.4.2.3**, wurden nochmals mit dem erweiterten Analysenverfahren auf CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC (CTC-Total-Gehalt) analysiert. Insbesondere sollte geprüft werden, inwieweit sich die CTC-Gehalte unter Berücksichtigung der weiteren Metabolite erhöhen. In **Tab. 31** sind die mit LC-MS/MS ermittelten Gehalte zusammengefaßt. In Muskulatur, Leber und Niere konnten die Substanzen CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC und in Knochen zusätzlich Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung von iso-CTC und e-iso-CTC erhöhen sich die Gesamt-CTC-Gehalte zum Teil erheblich. Im Vergleich des CTC-Gehaltes, ermittelt als Summe von CTC und e-CTC, zum CTC-Totalgehalt ergibt sich für Muskulatur eine prozentuale Erhöhung von durchschnittlich 71 %. Eine Berücksichtigung von iso-CTC und e-iso-CTC wirkt sich damit für diese Matrix am stärksten aus. Für Leber erhöhen sich die Gesamt-CTC-Gehalte prozentual durchschnittlich um 38 %, für Niere um 8 % und Knochen um 6 %. Die Abbauprodukte Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC spielen nur eine untergeordnete Rolle, da diese Verbindungen nur in Knochen nachweisbar sind und nur 0,1 % des Gesamt-CTC-Gehaltes darstellen.

Tab. 31: CTC-, e-CTC-, iso-CTC-, e-iso-CTC-, Anhydro-CTC- und e-Anhydro-CTC-Gehalte in Schlachtproben (LC-MS/MS, n = 2)

Tier	Matrix	Einheit	CTC	e-CTC	Summe CTC + e-CTC	iso-CTC	e-iso- CTC	Anhydro- CTC	e-Anhydro- CTC	CTC-Total- Gehalt	Prozentuale Er- höhung (Vergleich CTC- Gehalt und CTC- Total-Gehalt)
93	Muskulatur	µg/kg	2,6	1,5	4,1	1,6	1,1	nn	nn	6,8	66 %
	Leber	µg/kg	2,5	1,7	3,2	1,3	1,0	nn	nn	7,0	55 %
	Niere	µg/kg	8,8	10,8	19,6	1,4	nn	nn	nn	20,9	7 %
	Knochen	mg/kg	19,6	6,4	25,9	1,5	0,4	0,01	0,01	27,9	8 %
94	Muskulatur	µg/kg	2,0	1,3	3,3	1,1	1,0	nn	nn	5,4	63 %
	Leber	µg/kg	6,4	1,5	7,9	1,4	1,2	nn	nn	10,4	32 %
	Niere	µg/kg	6,2	9,1	15,3	1,4	nn	nn	nn	16,7	9 %
	Knochen	mg/kg	19,8	4,9	24,8	1,1	0,3	0,02	0,01	26,2	5 %
96	Muskulatur	µg/kg	2,1	1,4	3,4	1,2	1,2	nn	nn	5,9	72 %
	Leber	µg/kg	3,2	2,9	6,1	1,5	1,2	nn	nn	8,7	44 %
	Niere	µg/kg	7,5	9,1	16,6	1,0	nn	nn	nn	17,7	6 %
	Knochen	mg/kg	17,9	3,4	21,3	0,7	0,1	0,01	0,01	22,2	4 %
97	Muskulatur	µg/kg	2,3	1,5	3,8	2,2	1,8	nn	nn	7,8	106 %
	Leber	µg/kg	4,7	4,8	9,5	1,5	1,2	nn	nn	12,2	28 %
	Niere	µg/kg	10,5	12,5	22,9	1,7	nn	nn	nn	24,6	7 %
	Knochen	mg/kg	16,4	5,5	21,8	1,9	0,5	0,01	0,01	24,3	11 %

Die Untersuchung der Schlachtproben zeigt, daß nach Ablauf der Wartezeit von 14 Tagen die CTC-Total-Gehalte in allen Matrices stark gesunken sind und mit Werten von durchschnittlich 3,65 µg/kg für Muskulatur, 6,91 µg/kg für Leber und 18,60 µg/kg für Niere lediglich maximal 4 % der MRL-Werte betragen. Eine Berücksichtigung der isomeren Verbindungen iso-CTC und e-iso-CTC führt zwar, insbesondere für Muskulatur, zu erheblich höheren Werten von durchschnittlich 6,47 µg/kg für Muskulatur, 9,45 µg/kg für Leber und 19,98 µg/kg für Niere, die aber immer noch deutlich unterhalb der MRL-Werte liegen. Dennoch könnte es unter Einbeziehung von iso-CTC und e-iso-CTC, weil dadurch die Gesamt-CTC-Gehalte bis zu 71 % steigen, deutlich häufiger zu einer Überschreitung der MRL-Werte kommen.

Ein Vergleich der Verteilung der nachgewiesenen Substanzen bei den einzelnen Tieren zeigt, daß das Verhältnis der einzelnen Verbindungen zueinander individuell sehr unterschiedlich ist. Die prozentuale Erhöhung des CTC-Total-Gehaltes unter Berücksichtigung der Verbindungen iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC im Vergleich zum CTC-Gehalt, ermittelt als Summe von CTC und e-CTC, liegt für Muskulatur zwischen 49 % und 106 %, für Leber zwischen 28 % und 55 %, für Niere zwischen 6 % und 8 % und für Knochen zwischen 3 % und 11 %. Die relative Verteilung der einzelnen Verbindungen in den unterschiedlichen Matrices bleibt jedoch annähernd konstant. In Muskulatur lassen sich die höchsten Anteile an iso-CTC und e-iso-CTC feststellen, in Leber die zweit-höchsten, und am niedrigsten sind sie in Niere und Knochen.

### 5.9.2 Gebundene CTC-Rückstände in Knochen

Tetracycline in Knochen stellen eine Besonderheit dar, weil sie dort gebunden an Matrixbestandteile, wie z. B. Proteine oder in Form von Calcium-Komplexen vorliegen, was offensichtlich zu einer Akkumulation von Tetracyclinen im Knochen führt [37, 285, 286, 329, 330].

Zum besseren Verständnis wird nachfolgend der Aufbau und die Funktionen von Knochen beschrieben. Der Aufbau des Schweineskeletts ist dem des Menschen sehr ähnlich [331]. Die Knochen des Schweines bestehen zu 65 % aus anorganischen Bestandteilen und 35 % organischen Bestandteilen. Die organischen Bestandteile setzen sich wiederum aus 80-95 % Kollagenfasern und 5-20 % Interzellularsubstanz zusammen [332, 333]. Je nach Funktion werden verschiedene Formen von Knochen unterschieden, wie z. B. lange und kurze Röhrenknochen, platte und breite Knochen, kurze Wurzel- und unregelmäßige Wirbelknochen [331, 334].

Knochen üben hauptsächlich vier Funktionen aus [334, 335]: Mechanische Stützfunktion des Körpers, Schutzfunktion für lebenswichtige Körperteile, Blutbildung im Knochenmark, Regulierung des Mineralstoffhaushalts im Körper. Die notwendige Festigkeit gegen Druck, Zug, Biegung und Torsion wird dem Knochen durch die Einlagerung von anorganischen Calcium-Salzen in Form von Apatit verliehen, wobei es sich hierbei in erster Linie um Hydroxylapatit der Formel  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  handelt. Daneben finden sich noch Fluorapatit, Carbonatapatit, Calciumcarbonat und Magnesiumcarbonat. Die Knochensubstanz in ihrer morphologischen Struktur steht in einem dynamischen Stoffwechselgleichgewicht von Synthese und Abbau. Im wachsenden Organismus laufen neben den hormonell gesteuerten Aufbauvorgängen auch Abbauprozesse ab, um eine fortlaufende übermäßige Verdickung der Knochen zu vermeiden. Neben dem Längenwachstum wird das Dickenwachstum, „appositionelles Wachstum“, enzymatisch verhindert. Beim adulten Skelett findet nur noch ein hormongesteuertes appositionelles Wachstum statt [332]. Das Knochengewebe stellt aufgrund des hohen Calcium-Gehaltes ein Speicherorgan dar, aus dem Calcium durch hormonelle Steuerung in das Blut übertreten kann, es fin-

det also eine ständige Regulierung des Blut-Calcium-Spiegels statt, wobei die Knochen je nach Bedarf Calcium aufnehmen oder abgeben können [336]. Da sowohl Calcium als auch Phosphat, aber auch andere Ionen wie Magnesium nicht nur wesentliche Bestandteile des Knochens sind, sondern für viele Funktionsabläufe im Gesamtorganismus eine essentielle Bedeutung haben, sind alle Regulationssysteme des Knochenstoffwechsels gleichzeitig eingeschlossen in die Regulation des Gesamtkörpers und seiner einzelnen Organe und Gewebe. In dieses System ist der Knochen als Mineraldepot einbezogen, so daß eine Wechselwirkung zwischen den einzelnen Teilkomponenten des gesamten Mineralhaushalts besteht [253]. Dies legt die Vermutung nahe, daß mit dem Calcium die als Calcium-Phosphat-Chelate in Knochen eingelagerten Tetracycline auch aus dem Knochen freigesetzt werden können. Die Ergebnisse der Medikationsstudie in Haus Düsse unterstützen diese Annahme, da auch drei Monate nach Absetzen der Medikation in Urin, Plasma sowie in sämtlichen Schlachtplagen noch CTC und e-CTC nachweisbar waren.

Gebundene Tetracyclinrückstände in Knochen wurden bisher als unbedenklich für den Verbraucher eingestuft, da von einer irreversiblen Tetracyclineinlagerung in Knochen bzw. von einer Zerstörung der Tetracyclinrückstände bei der Zubereitung durch Braten oder Kochen von knochenhaltigen tierischen Lebensmitteln ausgegangen wurde [48, 87, 337]. Neuere Untersuchungen von KÜHNE et al. [338] belegen jedoch, daß auch gebundene Tetracyclinrückstände unter bestimmten Bedingungen bioverfügbar sein können. Sie wiesen eine *in vitro*-Freisetzung durch Simulation der Verdauung von tetracyclinhaltigen Fleischknochenmehlen nach, indem sie CTC-haltige Hühnerknochen mit 0,3 mol/L HCl versetzten, die so erhaltenen Proben 30 Minuten schüttelten und den Extrakt chromatographisch untersuchten. Zum Nachweis einer *in vivo*-Freisetzung untersuchten KÜHNE et al. Knochen von Hühnern, die CTC-haltiges Knochenmehl mit der Nahrung aufgenommen hatten. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wurden offensichtlich Tetracyclin-Calcium-Phosphat-Einlagerungen aufgeschlossen, da beide Versuche eine saure Behandlung der Knochen beinhalten, entweder *in vitro* durch Zugabe von 0,3 mol/L HCl oder *in vivo* durch die im Magen enthaltene Salzsäure.

Bei der Zubereitung von knochenhaltigen Fleischteilen stellten BRÜGGEMANN et al. [339] fest, daß nach 60-minütigem Kochen der CTC-Gehalt im Knochen, ermittelt durch die antibiotische Aktivität, stark abnimmt, wobei sie keine antibiotische Aktivität in den Knochen umgebenden Geweben feststellten. Sie betrachteten daher die gelösten Tetracyclinrückstände als zerstört und damit bedeutungslos. KÜHNE et al. [340] zeigten, daß eine Verarbeitung von tetracyclinhaltigen Knochen durch Erhitzen nicht zur vollständigen Zerstörung der Tetracycline führt, sondern es zum Abbau der Tetracycline zu den Anhydroverbindungen kommt, die im Vergleich zur Muttersubstanz zwar eine geringere antibiotische Aktivität aufweisen, jedoch eine deutlich höhere Toxizität besitzen.

Die von KÜHNE et al. durchgeführten Untersuchungen zur *in vitro*- und *in vivo*-Freisetzung von Tetracyclinen aus Knochen beinhalten in jedem Fall eine salzsaure Behandlung der Knochen, wodurch ein Aufschluß der eingelagerten Tetracyclin-Komplexe erfolgt. Ziel war es daher, zu untersuchen, ob die mit der Nahrung aufgenommenen und in Knochen eingelagerten Tetracycline auch unter den nicht sauren Bedingungen im Körper wieder freigesetzt werden können. Der Nachweis einer *in vivo*-Freisetzung ist dabei nicht möglich, da den Tieren das Arzneimittel in irgendeiner Form verabreicht werden muß und damit nicht gewährleistet werden kann, daß die im Gewebe nachweisbaren Rückstände tatsächlich aus einer Freisetzung aus dem Knochen stammen. Der Nachweis einer Freisetzung kann daher nur unter *in vitro*-Bedingungen anhand von Modellansätzen erfolgen.



### 5.9.2.1 Freisetzung von CTC aus Knochen

Zur Simulation des physiologischen Effektes einer Freisetzung von CTC aus Knochen in Blut wurde ein Modell auf der Grundlage der Eluierbarkeit durch Plasma entwickelt.

Hierzu wurde CTC-haltiges gemahlenes Knochenmaterial mit unbelastetem Plasma versetzt und über einen Zeitraum von neun Tagen aufbewahrt. An den Versuchtagen 1, 2, 3, 4, 5, 8 und 9 wurden diese „Knochen-Plasma-Gemische“ beprobt und mit LC-MS/MS analysiert. Dieser Versuch wurde zur Überprüfung eines Temperatureinflusses bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, zum einen bei 5 °C und zum anderen unter annähernd physiologischen Bedingungen bei 39,5 °C, entsprechend der mittleren Körpertemperatur von Schweinen [341]. Zur Beurteilung der Stabilität von CTC unter diesen Versuchsbedingungen erfolgte die Durchführung des Versuches mit CTC-dotiertem unbelasteten Plasma ohne Knochenmaterial. Das für diese Versuche eingesetzte Plasma wurde aus Vollblut, dem zur Gerinnungshemmung Li-Heparin zugesetzt wurde, gewonnen. Das für die sonstige Plasmagewinnung eingesetzte Antikoagulantium EDTA war für diese Untersuchung ungeeignet, da es als starker Chelatbildner die im Knochen als Komplex eingelagerten Tetracycline wieder herauslösen könnte. Als Knochenmaterial diente die Knochenprobe des Tieres 95 aus der Medikationsstudie FAL, da in dieser Probe die höchsten CTC-Gesamt-Gehalte von 54,27 mg/kg ermittelt wurden (**Tab. 32**).

Tab. 32: Gehalte [mg/kg] von CTC-Komponenten in Knochen des Tieres 95 (FAL, LC-MS/MS,  $n = 2$ )

CTC	e-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	Anhydro-CTC	e-Anhydro-CTC	Summe der CTC-Komponenten
43,6	9,2	1,2	0,2	0,03	0,03	54,27

Die im Rahmen der **Stabilitätsuntersuchungen** erhaltenen Konzentrationsverläufe der Tetracycline in den dotierten Plasmaproben sind in **Abb. 34** dargestellt.

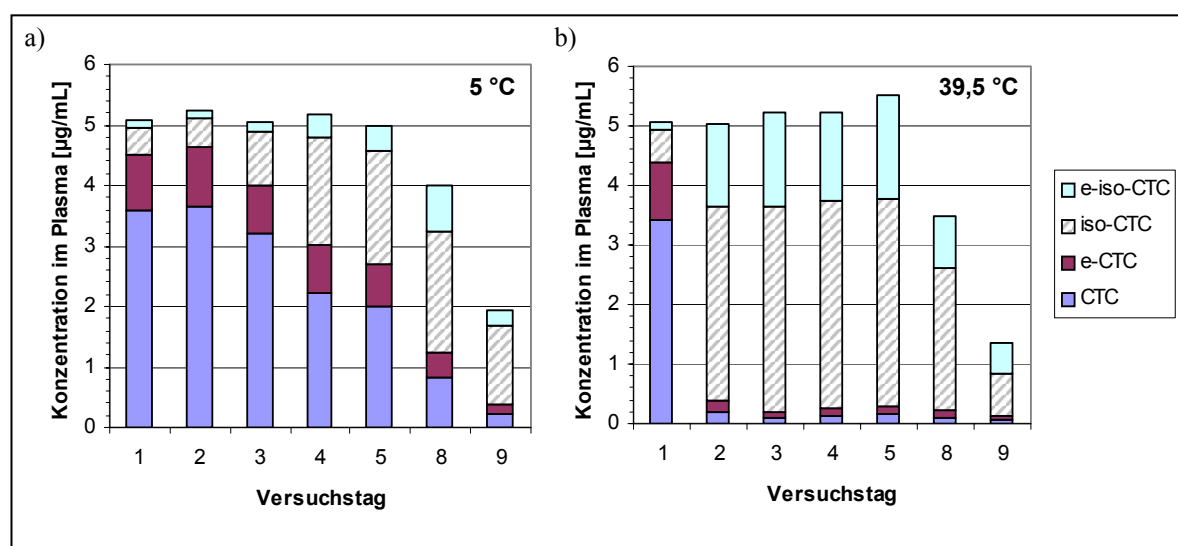
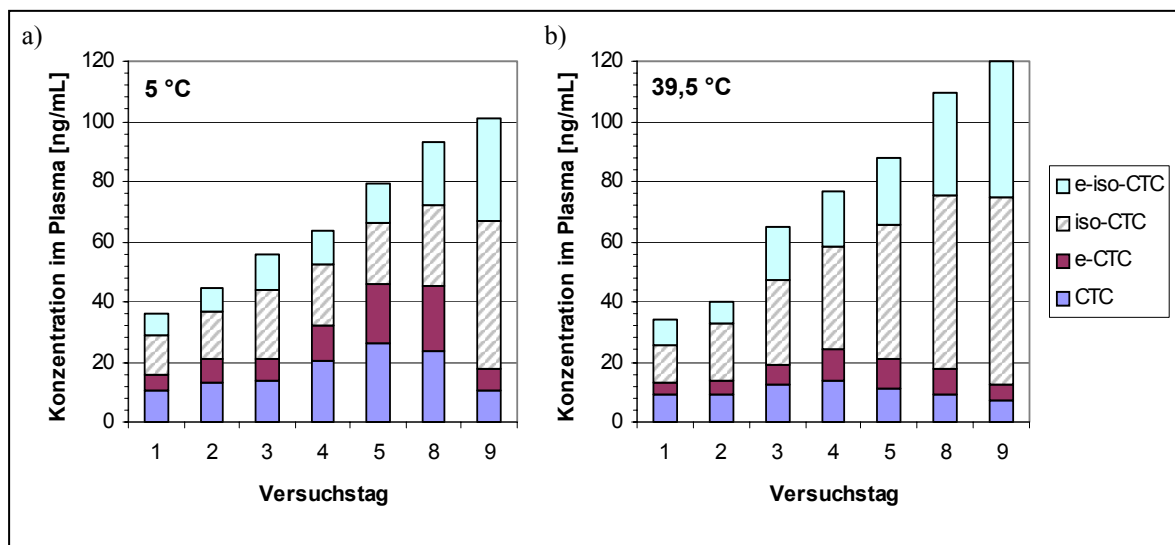


Abb. 34: Konzentrationsverlauf der CTC-Komponenten in dotierten Plasmaproben als Funktion der Zeit und Temperatur (LC-MS/MS,  $n = 2$ )

Am ersten Versuchstag konnten bezogen auf die Summe von CTC und e-CTC bei einer Lagertemperatur von 5 °C Gehalte von 4,51 µg/mL und bei 39,5 °C 4,38 µg/mL ermittelt werden. Unter Berücksichtigung der Wiederholpräzision von 16,8 % bezogen auf eine Methodenpräzision für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Plasma von 6 % ist CTC, ermittelt als Summe von CTC und e-CTC, bei einer Temperatur von 5 °C nur zwei Tage, bei 39,5 °C nur einen Tag stabil. Ursache hierfür ist die rasche Isomerisierung von CTC und e-CTC zum iso-CTC und e-iso-CTC, wobei erwartungsgemäß bei einer Lagertemperatur von 39,5 °C die Geschwindigkeit der Reaktion deutlich höher ist als bei 5 °C. Die iso-CTC- und e-iso-CTC-Gehalte resultieren überwiegend aus der Umwandlung im Plasma, da eine Isomerisierung während der Probenvorbereitung weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Bereits am ersten Versuchstag konnten in den Plasmaproben iso-CTC und e-iso-CTC nachgewiesen werden. Bei einer Temperatur von 39,5 °C ließen sich schon am zweiten Versuchstag überwiegend nur noch iso-CTC und e-iso-CTC nachweisen. Bis zum Ende des Versuches hatte schließlich eine fast vollständige Umwandlung in die isomeren Verbindungen stattgefunden. Bezogen auf die Summe aller CTC-Komponenten konnten am ersten Versuchstag etwa 5 µg/mL festgestellt werden. Unter Berücksichtigung von iso-CTC und e-iso-CTC ist CTC über einen Zeitraum von fünf Tagen bei beiden Lagertemperaturen mit Gesamtgehalten von 4,98 µg/mL (5 °C) und 5,53 µg/mL (39,5 °C) stabil. Am achten Versuchstag konnte mit einer CTC-Gesamtkonzentration von 4,01 µg/mL (5 °C) und 3,48 µg/mL (39,5 °C) eine signifikante Konzentrationsabnahme festgestellt werden (**Abb. 34 a und b**).

Die in den Plasmaproben der „**Knochen-Plasma-Gemische**“ ermittelten CTC-Gehalte sind in **Abb. 35** dargestellt.



*Abb. 35: Konzentrationsverlauf der CTC-Komponenten in Plasma der „Knochen-Plasma-Gemische“ als Funktion der Zeit und Temperatur (LC-MS/MS, n = 2)*

Bereits am ersten Versuchstag konnten im Plasma CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC nachgewiesen werden. Aus dem Gesamt-CTC-Gehalt in Knochen von 54,27 µg/kg, siehe **Tab. 32**, ergibt sich bei vollständiger Elution eine maximal zu erwartende CTC-Konzentration von 32,56 µg/mL in Plasma. Mit Gesamtgehalten von etwa 35 ng/mL wurden am ersten Versuchstag 0,1 % der CTC-Komponenten aus dem Knochen freigesetzt. Die freigesetzte Gesamtmenge steigt über den Versuchszeitraum kontinuierlich an, obwohl nach den Stabilitätsuntersuchungen CTC in Plasma unter diesen Bedingungen nur

über einen Zeitraum von fünf Tagen stabil ist und nach diesem Zeitraum mit einem Abbau von CTC zu rechnen wäre. Es spielen also zwei gegenläufige Prozesse, zum einen das Herauslösen von CTC aus dem Knochen und zum anderen der Abbau von CTC eine Rolle. Am letzten Versuchstag wurden mit Konzentrationen von 101 ng/mL (5 °C) und 120 ng/mL (39,5 °C) 0,4 % (5 °C) und 0,4 % (39,5 °C) der im Knochen gespeicherten Substanzen freigesetzt (**Abb. 35 a und b**). Ein Temperatureinfluß auf die Freisetzung der im Knochen enthaltenen Tetracycline war also gering. Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC konnte in keiner der Plasmaproben festgestellt werden. Die in diesem Versuch ermittelten freigesetzten CTC-Gehalte lagen mit durchschnittlich 0,4 % deutlich unterhalb der Werte, die KÜHNE et al. [340] bei ihren *in vitro*-Versuchen ermittelt haben. So eluierte 0,3 mol/L HCl aus Knochen mit einem CTC-Gehalt von 41,80 mg/kg 35,3 % aus dem Knochen, wobei sie den CTC-Gehalt als Summe von CTC und e-CTC ermittelten.

Über die von KÜHNE et al. gewonnenen Erkenntnisse hinaus konnte durch die eigenen Untersuchungen belegt werden, daß auch unter nicht sauren Bedingungen eine Freisetzung aus dem Knochen *in vitro* möglich ist, wenn auch nur mit einem vergleichsweise geringen Freisetzungsgrad von 0,5 % bei ähnlichen CTC-Gehalten in Knochen. Diese Versuche erlauben jedoch keine Aussage darüber, ob die im Plasma der „Knochen-Plasma-Gemische“ nachgewiesenen CTC-Komponenten aus einer Freisetzung aus dem Knochen resultieren oder auf einer Metabolisierung bei der Lagerung der „Knochen-Plasma-Gemische“ und Aufarbeitung der Plasmaproben beruhen. Aufgrund der Produktverteilung im Knochen, siehe **Tab. 32**, und der Stabilitätsuntersuchungen von CTC in Plasma ist es aber wahrscheinlich, daß überwiegend CTC aus dem Knochen freigesetzt wurde, welches anschließend im Plasma isomerisierte und während der Probenvorbereitung epimerisierte.

Zusammenfassend konnte mit den durchgeführten Versuchen anhand des Modellansatzes eine *in vitro*-Freisetzung von CTC und/oder den Umwandlungsprodukten e-CTC und iso-CTC aus dem Knochen auch unter nicht sauren Bedingungen nachgewiesen werden. Dies gibt deutliche Hinweise darauf, daß eine Freisetzung von CTC auch *in vivo* stattfinden kann. Dies bedeutet, daß durch den intensiven Einsatz von Tetracyclinen in der Schweinemast auch bei bestimmungsgemäßer Anwendung mit einem Eintrag in die Nahrungskette zu rechnen ist. Auch nach einer Medikation ist eine Kontamination von zur Lebensmittelgewinnung dienenden Matrices wie Muskulatur, Leber und Niere *in vivo* möglich. Möglicherweise kann auch bei der Schlachtung, also der Zerteilung von Schweinen, sowie bei der Aufbewahrung von Fleisch, welches nicht vom Knochen abgetrennt wird, wie Koteletts etc., CTC freigesetzt werden und in andere Matrices übergehen. Damit ist durch Tetracyclintrückstände in Knochen auch mit einer Kontamination von knochenhaltigen Lebensmitteln zu rechnen. Insbesondere ist die Verwendung von Separatorenfleisch unter diesen Aspekten als bedenklich einzustufen, da dieses Fleisch geringe Tetracyclinegehalte aufweisen kann und damit durch eine subtherapeutische Aufnahme beim Menschen zu einer Resistenzausbildung führen könnte. Bei der Verarbeitung von knochenhaltigen Lebensmitteln spielen neben CTC vor allem auch die Bildung von Metaboliten eine Rolle.

Bei der Verarbeitung von knochenhaltigen Lebensmitteln reicht eine Erhitzung auch über 100 °C nicht aus, um sämtliche Tetracyclintrückstände zu zerstören, sondern führt, wie bereits am Anfang des Kapitels erwähnt, zur Bildung der im Vergleich zu den Muttersubstanzen toxischeren und stärker resistenzfördernden Anhydroverbindungen. Darüber hinaus werden zunehmend auch sogenannten Sekundärkreisläufen Beachtung geschenkt. Von KÜHNE et al. [342] wird darauf hingewiesen, daß nach der Fleischgewinnung eine Weiterverarbeitung der Knochen zu Fleischknochenmehl erfolgt, welches zunehmend auch Verwendung als Düngemittel für landwirtschaftlich genutzte Flächen findet. Hieraus

resultiert ein indirekter Eintrag in die Nahrungskette.

### 5.9.2.2 Fluoreszenz-Screening-Test

Neben der quantitativen chromatographischen Bestimmung der Tetracycline in Knochen, kann auch als Screening-Test die Fluoreszenz der Komplexe herangezogen werden. Die in Knochen eingelagerten Tetracycline zeigen bei Bestrahlung mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 366 nm eine gelbe Fluoreszenz, siehe **Abb. 36**, was dem qualitativen Nachweis der Tetracycline in Knochen dienen kann. Dies stellt eine einfache Methode dar, um festzustellen, ob eine Behandlung der Tiere stattgefunden hat. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzstärke und dem Tetracyclinegehalt herzustellen [285, 343, 344]. In neuerer Zeit gab es zunehmend Bestrebungen, über diesen qualitativen Nachweis hinaus, die Fluoreszenz der Knochen für eine semiquantitative Bestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie zu nutzen [345]. Die Schwierigkeit einer (semi)-quantitativen Bestimmung der Fluoreszenz liegt vor allem in der intrinsischen Fluoreszenz durch endogene Fluorophore in biologischen Matrices begründet, die zu Überlagerungen im Gesamtspektrum führt. So wird durch das im Knochen enthaltene Kollagen eine bläuliche Fluoreszenz hervorgerufen [346].

Aufgrund der Komplexität einer semiquantitativen Bestimmung von Tetracyclinen in Knochen sollte im Rahmen dieser Arbeit nur eine qualitative Fluoreszenzuntersuchung der während der Medikationsstudien entnommenen Knochenproben durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe und eine einfache visuelle Beurteilung der Fluoreszenzstärke und ein Vergleich dieser Befunde mit den Ergebnissen der LC-MS/MS-Untersuchung erfolgen. Eine Beurteilung der Fluoreszenzstärke und der Tetracyclinegehalte wird vor allem auch dadurch erschwert, daß häufig mehrere Tetracyclin-Derivate gleichzeitig eingesetzt werden und damit ein Vergleich nicht mehr möglich ist. Daher eignen sich die Proben der Medikationsstudien besonders gut für diesen Vergleich, da sichergestellt werden kann, daß nur CTC zum Einsatz kam.

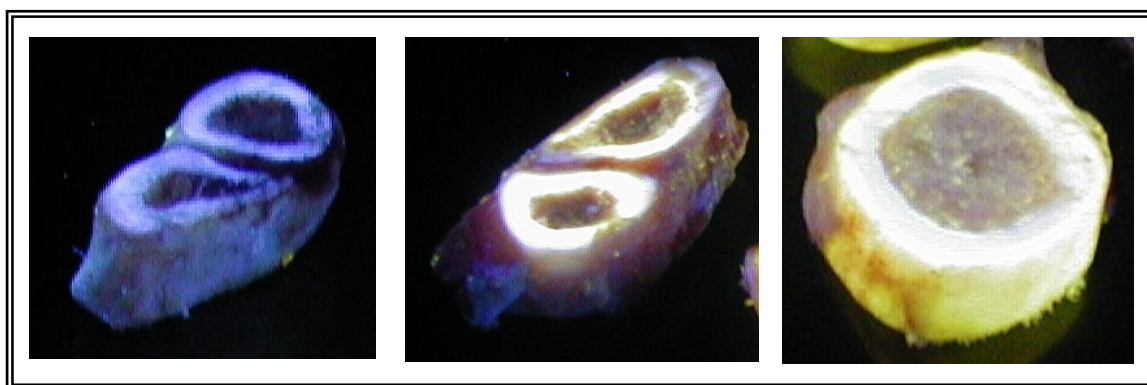
Die zu untersuchenden Knochen wurden in Scheiben geschnitten, von Fleischresten befreit und anschließend mit einer UV-Lampe bei 366 nm bestrahlt. Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß die Knochen der Tiere der FAL-Studie mit Gehalten zwischen 21,3 mg/kg und 54,3 mg/kg am stärksten fluoreszierten. Die Knochenproben der Versuchstiere der Haus Düsse Studie wiesen CTC-Gehalte zwischen 3,9 mg/kg und 21,2 mg/kg auf. Anhand der Knochenproben der Haus Düsse Studie, deren CTC-Gehalte zwischen 3,9 mg/kg und 21,2 mg/kg lagen, konnte belegt werden, daß mit steigendem CTC-Gehalt auch die Fluoreszenz sichtbar zunimmt. Die Untersuchung der Knochenproben der Kontrolltiere mit dem Fluoreszenz-Screening-Test ergab ausschließlich negative Befunde. Obwohl keine Fluoreszenz sichtbar war, konnten mit LC-MS/MS CTC-Gehalte im Bereich von 163 µg/kg bis 219 µg/kg nachgewiesen werden. Diese Befunde entsprechen denen von KÜHNE et al., die ebenfalls in nicht fluoreszierenden Knochen mittels HPLC-UV Tetracyclin-Gehalte fanden [285].

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Fluoreszenz-Screening-Test als einfache und schnelle Methode zum Nachweis einer Tetracyclinbehandlung dienen kann, wobei jedoch Knochen auch ohne sichtbare Fluoreszenz Tetracycline in geringen Mengen enthalten können.

### 5.9.2.3 Applikation von CTC und Ablagerungsmuster in Knochen

In der Literatur wird beschrieben, daß über den qualitativen Nachweis von Tetracyclinen hinaus mit

dem Fluoreszenz-Screening-Test anhand des Ablagerungsmusters von Tetracyclinen in Knochen auch eine Beurteilung des Applikationszeitpunktes möglich sei [339, 343, 344]. Einen großen Einfluß auf die Menge der eingelagerten Tetracycline hat der Zeitpunkt der Verabreichung in Bezug auf das Stadium des Knochenwachstums. Junge Tiere, die sich zum Zeitpunkt der Tetracyclinverabreichung im Stadium der Knochenmineralisierung befinden, lagern eine größere Menge des Wirkstoffes im Knochen ein als ältere Tiere [339]. Hat die letzte Applikation von Tetracyclinen erst kurz vor der Schlachtung stattgefunden, so zeigt sich eine zunehmende Fluoreszenz auf der Knochenoberfläche. Eine innere Ringbildung weist dagegen auf eine frühere Behandlung hin. Eigene Untersuchungen ergaben adäquate Befunde. In **Abb. 36** sind Knochenproben der Medikationsstudien bei UV-Bestrahlung dargestellt.



*Abb. 36: Fluoreszenz von Knochenproben bei UV-Bestrahlung (366 nm) (links: Kontrolltier 4 aus Haus Düsse, Mitte: Versuchstier 7 aus Haus Düsse, rechts: Tier 95 aus der FAL)*

Die linke Knochenprobe stammt von einem Kontrolltier aus der Haus Düsse-Studie und zeigte wie auch alle anderen Kontrollproben keine gelbe Fluoreszenz. Erkennbar ist die durch Kollagen hervorgerufene bläuliche Fluoreszenz. Die mittlere Knochenprobe stammt von einem Versuchstier der Haus Düsse-Studie, bei der Schweine mit CTC medikamentiert und drei Monate später geschlachtet wurden. Diese Knochenproben zeigten eine innere fluoreszierende Schicht, an der sich nach außen aufgrund des weiteren Wachstums eine nicht fluoreszierende Schicht anschließt. Die rechte Knochenprobe des Tieres 95 stammt aus der FAL-Studie. Da dieses Tier bis zur Schlachtung mit CTC medikamentiert wurde, zeigte sich im gesamten Knochengewebe, insbesondere auf der Knochenaußenseite, eine starke Fluoreszenz. Vier Tiere der FAL-Studie wurden nach Ablauf der Wartezeit von zwei Wochen geschlachtet. Die Knochenproben dieser Tiere zeigten ebenfalls eine vollständige Fluoreszenz im gesamten Knochen, wobei die Knochenprobe des Tieres 95 stärker fluoreszierte als die der anderen Tiere.

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen, daß das Ablagerungsmuster von Tetracyclinen Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der letzten Wirkstoffapplikation erlaubt. Eine fluoreszierende Knochenaußenseite deuten auf eine erst kurz vor der Schlachtung stattgefundene Medikation hin, während eine innere Ringbildung auf eine frühere Behandlung hinweist. Das Ablagerungsmuster kann jedoch nicht zur Überprüfung der Einhaltung von Wartezeiten herangezogen werden, da auch die Knochenproben der Tiere, die nach Ablauf der Wartezeit geschlachtet wurden, eine Fluoreszenz im gesamten Knochen aufwiesen.

### 5.9.3 Bilanzierungsstudie von Tier 95

Ziel dieser Studie war es, exemplarisch anhand der Proben des Tieres 95, das direkt nach Medikation geschlachtet wurde, eine Bilanzierung vorzunehmen. Der CTC-Gehalt sollte hierbei über die in **Kap. 5.4** durchgeführten Untersuchungen hinaus nicht nur als Summe von CTC und e-CTC, sondern als Total-Gehalt aus CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC ermittelt werden. Diese Ergebnisse sollten dazu dienen, den Eintrag von CTC sowie insbesondere auch der Metabolite in die Nahrungskette nach praxisüblicher Medikation von Schweinen in der Masttierhaltung besser beurteilen zu können. Neben der Untersuchung der Produktverteilung in den einzelnen Matrices sollte überprüft werden, ob möglicherweise noch weitere Metabolite eine Rolle spielen.

Das Tier 95 wurde drei Stunden nach der letzten Antibiotikafütterung zur Erreichung einer maximalen Plasmakonzentration geschlachtet, da nach dieser Zeit die maximalen Plasmaspiegel erreicht werden, siehe **Kap. 3.3**. Weil damit die gesetzlich vorgeschriebene Wartezeit von vierzehn Tagen nicht eingehalten wurde, konnte dieses Tier nicht der Lebensmittelgewinnung dienen, so daß diese Studie als anzeigepflichtiger Tierversuch durchgeführt wurde. Aus tierschutzrechtlichen Gründen blieb diese Bilanzierungsstudie auf ein Tier beschränkt. Eine statistische Absicherung der Daten kann daher nicht gewährleistet werden.

#### 5.9.3.1 Urin und Faeces

Die in *Urin* ermittelten Ausscheidungsmengen während den beiden Medikationsphasen sind in **Abb. 37** dargestellt (Einzeldaten siehe **Tab. A. 9** im Anhang).

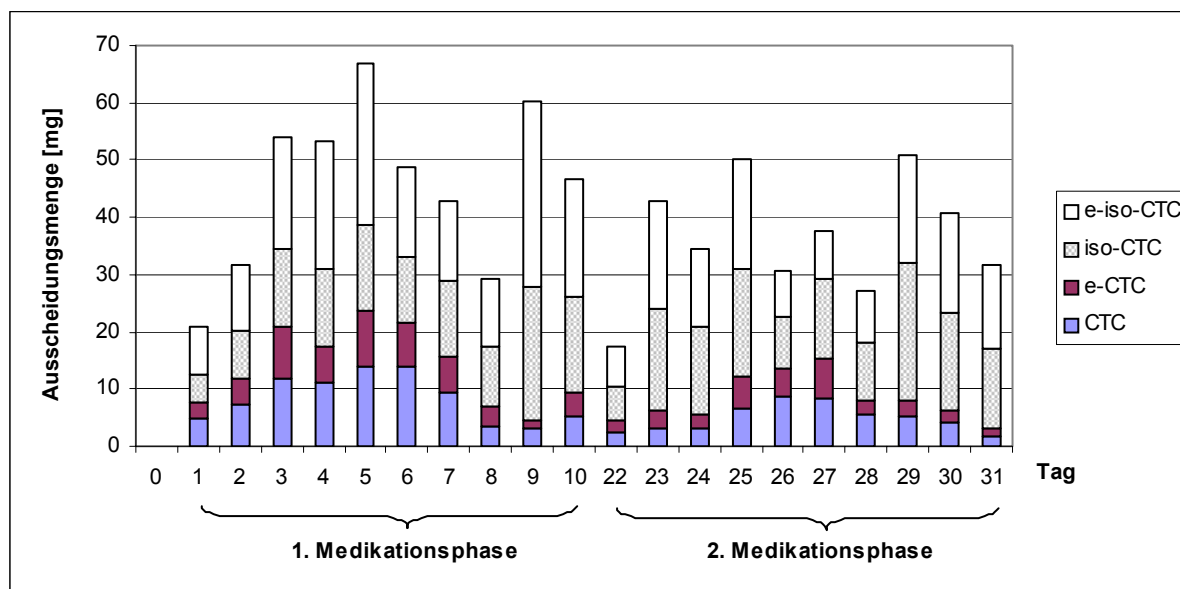


Abb. 37: Ausscheidungsmenge von CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC in Urin von Tier 95 (LC-MS/MS,  $n = 2$ )

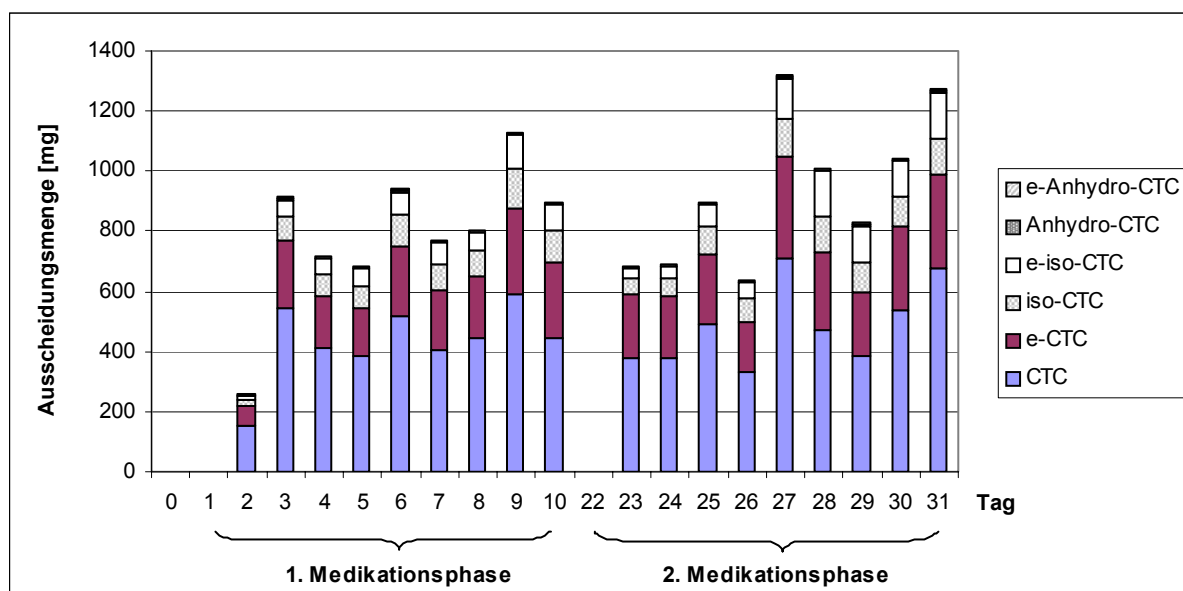
In den Urinproben konnten CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC sowie in Spuren keto-e-CTC nachgewiesen werden. Die Abbauprodukte Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC traten dagegen nicht auf. Die Ausscheidungsmengen von iso-CTC und e-iso-CTC überschreiten mit Werten von maximal 23,51 mg und 32,21 mg dabei weit die Ausscheidungsmengen von CTC und e-CTC mit Maximalwerten von 14,05 mg und 9,63 mg. Werden die Ausscheidungsmengen der einzelnen Verbindungen betrachtet, so

wird ersichtlich, daß sich das Produktverhältnis während der Medikationsphasen verändert. In Bezug auf die jeweiligen Epimerenpaare zeigte sich in beiden Medikationsphasen, daß mit steigenden Gesamt-CTC-Ausscheidungsmengen zunächst die prozentualen Anteile von CTC/e-CTC (Summe beider Verbindungen) an der Gesamt-CTC-Ausscheidungsmenge von etwa 30 % am ersten Medikationstag auf etwa 45 % nach fünf Medikationstagen steigt. Mit weitergehender Medikation nimmt der relative Anteil von CTC/e-CTC bis auf etwa 15 % stark ab und der Anteil von iso-CTC/e-iso-CTC bis auf etwa 85 % am jeweils letzten Medikationstag stark zu. Nach der Medikationspause von elf Tagen ist die Ausscheidungsmenge mit einem Wert von 17 mg immer noch verhältnismäßig hoch, wobei CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC nachgewiesen werden konnten.

Die in Kap. **Kap. 5.4.2.1** festgestellten Maxima im Kurvenverlauf des CTC-Gehaltes, ermittelt als Summe von CTC und e-CTC, siehe auch

**Abb. 27**, lassen sich unter Einbeziehung von iso-CTC und e-iso-CTC nicht mehr erkennen. Die in **Kap. 5.4.2.1** beschriebenen vermeintlichen Maxima resultieren demzufolge aus einer zunehmenden Isomerisierung von CTC und e-CTC während der Medikation. Ein Vergleich der Gesamt-Ausscheidungsmenge, ermittelt als CTC-Total-Gehalt, und der Ausscheidungsmenge, bestimmt als Summe von CTC und e-CTC, zeigt, daß sich die Ausscheidungsmengen unter Berücksichtigung der isomeren Verbindungen erheblich erhöhen. Während die durchschnittlichen Maximalwerte in **Kap. 5.4.2.1** zu 28 mg ermittelt wurden, beträgt die maximale Ausscheidungsmenge unter Berücksichtigung der Metabolite 67 mg.

Die in *Faeces* ermittelten Ausscheidungsmengen der CTC-Komponenten sind in **Abb. 38** dargestellt (Einzeldaten siehe **Tab. A. 10** im Anhang).



**Abb. 38:** Ausscheidungsmenge von CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC in *Faeces* von Tier 95 (LC-MS/MS,  $n = 2$ )

In *Faeces* konnten hauptsächlich CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, in geringen Mengen Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC sowie in Spuren keto-e-CTC nachgewiesen werden. Die prozentualen Anteile der Verbindungen CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC am Total-Gehalt stellen sich in *Faeces* völlig anders dar als in *Urin*. Während *Urin* bis zu 90 % iso-CTC und e-iso-CTC enthält, lassen sich in

Faeces maximal 22 % dieser Isomere nachweisen. Der erheblich geringere relative Gehalt an iso-CTC und e-iso-CTC ist sicherlich darauf zurückzuführen, daß die in Faeces enthaltenen CTC-Gehalte größtenteils aus dem nicht resorbierten Anteil stammen und damit stoffwechselbedingte Umwandlungen keine so erhebliche Rolle spielen.

Am ersten Versuchstag sind die CTC-Ausscheidungsmengen noch gering und betragen nur 1,2 mg CTC und 0,35 mg e-CTC. Weitere Produkte waren an diesem Versuchstag nicht feststellbar. In beiden Medikationsphasen steigt die Gesamt-CTC-Ausscheidungsmenge innerhalb der ersten drei Medikationstage zunächst an und bleibt dann annähernd konstant. Nach der Medikationspause von elf Tagen ist die Ausscheidungsmenge stark auf 1,75 mg gesunken und es konnten nur noch CTC, e-CTC und iso-CTC nachgewiesen werden. Innerhalb der ersten drei Medikationstage verschiebt sich die Produktverteilung der einzelnen CTC-Komponenten in Richtung der isomeren Verbindungen und bleibt anschließend mit gleichbleibenden Gesamtausscheidungsmengen ebenfalls konstant. Die relativen Anteile der CTC-Komponenten an der Gesamtausscheidungsmenge betragen dann etwa 55 % für CTC, 25 % für e-CTC, 10 % für iso-CTC, 8 % für e-iso-CTC, 1 % für Anhydro- und 1 % für e-Anhydro-CTC. Das hier festgestellte Ausscheidungsprofil, ermittelt als CTC-Total-Gehalt, entspricht dem in **Kap 5.4.2.1** als Summe von CTC und e-CTC ermittelten Ausscheidungsverhalten. Lediglich die Maximalausscheidungsmengen sind unter Berücksichtigung der Metabolite mit Werten von 1273 mg (CTC-Totalgehalt) größer als die in **Kap 5.4.2.1** festgestellten maximalen Ausscheidungsmengen von durchschnittlich 983 mg.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Urin- und Faecesuntersuchungen, daß unter Berücksichtigung der weiteren Metabolite deutlich höhere Ausscheidungsmengen gefunden werden.

### 5.9.3.2 Schlachtproben

Die in den Schlachtproben ermittelten Gehalte sind in **Tab. 33** aufgeführt. In Muskulatur und Leber lassen sich neben CTC und e-CTC die Metabolite iso-CTC und e-iso-CTC nachweisen, in Niere nur iso-CTC. In Knochen konnte zusätzlich zu CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC auch geringfügig die Dehydratationsprodukte Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC festgestellt werden. Eine Berücksichtigung der Metabolite führt zu einer prozentualen Erhöhung des CTC-Gehaltes um 49 % für Muskulatur, 30 % für Leber, 8 % für Niere und 3 % für Knochen im Vergleich zum CTC-Gehalt, ermittelt als Summe von CTC und e-CTC.

*Tab. 33: CTC-, e-CTC-, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC-Gehalte in den Schlacht- und Knochenproben von Tier 95 (LC-MS/MS, n = 2)*

Matrix	Einheit	CTC	e-CTC	Σ CTC+ e-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	Anhydro-CTC	e-Anhydro-CTC	Σ <sub>total</sub> CTC
Muskulatur	µg/kg	98,0	43,1	141,1	39,7	29,6	nn	nn	210,4
Leber	µg/kg	210,4	90,5	301,0	53,9	37,3	nn	nn	392,2
Niere	µg/kg	314,2	294,8	609,0	50,0	nn	nn	nn	659,0
Knochen	mg/kg	43,6	9,2	52,8	1,2	0,2	0,03	0,03	54,3

Die CTC-Gehalte, ermittelt als Summe von CTC und e-CTC, liegen in Höhe der MRL-Werte bzw. überschreiten diese geringfügig. Eine Berücksichtigung der isomeren Verbindungen führt zu einer



deutlichen Überschreitung der MRL-Werte. Ein Vergleich des Knochengehaltes dieses Tieres mit denen in den anderen Tieren der FAL-Studie, die vierzehn Tage später geschlachtet wurden, siehe **Tab. 31**, zeigt, daß die CTC-Gehalte im Knochen des Tieres 95 deutlich größer sind als in den anderen Knochenproben. Dies gibt Hinweise darauf, daß nach Medikationsende nicht die vollständige Menge des adsorbierten CTC im Knochen verbleibt, sondern durch Diffusion an das Blut abgegeben wird. Auf eine derartige Freisetzung von CTC aus dem Knochen weisen BRÜGGEMANN et al. in verschiedenen Studien hin [319, 339, 347].

### 5.9.3.3 Bilanzierung

Wie bereits in **Kap. 5.4.2.1** erwähnt, existieren eine Reihe von pharmakokinetischen Studien [42, 67, 68, 70, 74, 315, 316], basierend auf mikrobiologischen Bestimmungsmethoden sowie der Radioaktivitätsmessung nach Verabreichung von C14-markierten Tetracyclinen. Mit erstgenannter Methode lassen sich die applizierten Wirkstoffe nur unzureichend wiederfinden, da die entstehenden Metabolite nur eine geringe oder gar keine antibiotische Aktivität aufweisen. Mit der Radioaktivitätsmessung wird die zugeführte Wirkstoffmenge zwar quantitativ erfaßt, wobei mit dieser Methode keine Aussage über die Struktur entstandener Metabolite möglich ist. Es werden vielmehr auch undefinierbare „Bruchstücke“ des Antibiotikums erfaßt. Daher sollte mit dem entwickelten LC-MS/MS-Verfahren anhand eines Tieres eine ausführliche Bilanzierung, die auch die quantitative Bestimmung der Metabolite umfaßt, erfolgen. Eine Bestimmung mit HPLC-UV ist nicht möglich, da ihr Absorptionsmaximum von 275 nm in Realproben durch Begleitkomponenten gestört wird.

Es lassen sich mit den in **Kap. 5.9.3.1** aufgeführten Ausscheidungsmengen an CTC, e-CTC, iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC die insgesamt während beider Mediaktionsphasen ausgeschiedenen Mengen an CTC und Metaboliten berechnen, siehe **Tab. 34**.

*Tab. 34: Bilanzierung über die zugeführte CTC-Wirkstoffmenge und ausgeschiedene Menge als CTC oder Metabolite bei Tier 95*

Applizierte CTC-Menge		17,6 g						
Ausscheidungsmenge [g]		CTC	e-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	Anhydro-CTC	e-Anhydro-CTC	$\Sigma_{\text{total}}$ CTC
	Urin	0,14	0,09	0,27	0,32	nn	nn	<b>0,82</b>
	Faeces	8,3	4,0	1,6	1,4	0,07	0,1	<b>15,5</b>
$\Sigma$ (Urin+Faeces)		<b>16,32 g <math>\Delta</math> 93 %</b>						

Tier 95 hat über den gesamten Medikationszeitraum von der aufgenommenen CTC-Menge von 17,6 g über Urin 0,82 g und über Faeces 15,5 g in Form der oben aufgeführten Verbindungen wieder ausgeschieden hat. Insgesamt wurden 93 % der applizierten CTC-Wirkstoffmenge bereits während der Medikation über Urin und Faeces wieder ausgeschieden.

Zur Beurteilung der im Tierkörper verbleibenden Arzneimittelmengen können die in **Kap. 5.9.1** ermittelten Gehalte in den Schlacht- und Knochenproben herangezogen werden. Darüber hinaus wurde der

Gehalt der einzelnen Verbindungen im Plasma der am Schlachttag entnommenen Blutprobe dieses Tieres bestimmt. Das Plasma enthielt 38,2 µg/L CTC, 15 µg/L e-CTC, 40,8 µg/L iso-CTC und 33,1 µg/L e-iso-CTC. Als Zusammensetzung der Schweine wurden statistische Auswertungen umfangreicher Versuche an der Bundesforschungsanstalt Braunschweig-Völkenrode zugrunde gelegt. Hiernach bestehen die im Versuch eingesetzten Kastraten aus 71,2 % Fleisch und Fett, 10,5 % Magen, Darm, Lunge, Leber und Niere, 8,7 % Knochen und 3,5 % Blut [348]. Da zur Analyse kein Vollblut, sondern Plasma eingesetzt wurde, erfolgte zunächst die Bestimmung des Hämatokrit-Wertes von 0,5 in Anlehnung an die Zentrifugationsmethode [253]. Als Blutdichte wurde hierbei näherungsweise ein Wert von 1 g/mL angenommen [253]. Mit den so ermittelten Daten läßt sich in Form einer Hochrechnung eine Bilanzierung vornehmen, siehe **Abb. 39**.

Von der als CTC aufgenommenen Arzneimittelmenge von 17,6 g wurden 16,3 g, also 93 %, über Urin und Faeces als CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC oder e-Anhydro-CTC wieder ausgeschieden, wobei hauptsächlich die Ausscheidung über Faeces zu 88 % erfolgt ist und nur 5 % über Urin wieder ausgeschieden wurde. Diese Resultate stimmen gut mit den Ergebnissen von BRÜGGEMANN et al. [319] und KELLY et al. [349] überein. BRÜGGEMANN et al. fanden bei Legenhennen und KELLY et al. bei Ratten und Hunden 90 % bis 95 % der applizierten C14-CTC bzw. C14-TC-Menge, gemessen an der Radioaktivität, in Urin und Kot wieder. Lediglich 0,5 g, also 3 % der Arzneimittelmenge verbleiben im Tierkörper, wovon ein Großteil (2,75 %) im Knochen eingelagert wird. Auch diese Befunde stimmen mit den Angaben der oben genannten Autoren gut überein. Damit wurden von der zugeführten Arzneimittelmenge 16,81 g, entsprechend 96 %, analytisch erfaßt. Ein Vergleich dieser Bilanz mit den ermittelten CTC-Gehalten in Urin und Faeces des Tieres 95 in **Kap. 5.4.2.1** zeigt, daß sich unter Berücksichtigung von iso-CTC und e-iso-CTC der erfaßbare CTC-Gehalt erheblich erhöht. Mit den als Summe aus CTC und e-CTC ermittelten CTC-Gehalten wurden nur 70 % in Faeces und 2 % in Urin wiedergefunden. In den Schlachtproben spielt dagegen die Berücksichtigung von iso-CTC und e-iso-CTC für die Bilanzierung keine große Rolle, trotz zum Teil erheblich höherer Gesamtgehalte in den verschiedenen Matrices, siehe **Tab. 31**, da ohnehin auch unter Einbeziehung dieser Verbindungen nur ein geringer prozentualer Anteil von 3 % der zugeführten Arzneimittel im Tierkörper verbleibt. Es ist darauf hinzuweisen, daß die im Tier verbleibende Arzneimittelmenge auch aus einer Rückresorption der ausgeschiedenen Wirkstoffe im Darm, dem sogenannten enterohepatischen Kreislauf, resultieren kann [350]. Insbesondere können hierdurch auch Metabolisierungsprodukte wieder rückresorbiert werden.

Unter Berücksichtigung der Analysenpräzision, der Wiederfindung und der Genauigkeit der Hochrechnung bei der Bilanzierung in Bezug auf die Zusammensetzung des Schweines läßt sich sagen, daß nahezu die gesamte verfütterte Wirkstoffmenge wiedergefunden wurde. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, daß zwischen den beiden Medikationsphasen eine Pause von elf Tagen eingehalten wurde, in der keine Probenahmen von Urin oder Faeces stattgefunden haben. Die in diesem Zeitraum ausgeschiedene Arzneimittelmenge kann demzufolge nicht abgeschätzt werden. Es ist jedoch zu erwarten, daß die CTC-Gehalte in Faeces schnell abnehmen, da es sich hauptsächlich um nicht resorbiertes CTC handelt. Die in Urin vorhandenen CTC-Mengen sind ohnehin deutlich geringer als in Faeces, so daß die Urinausscheidung während der Medikationspause wahrscheinlich eine vernachlässigbare Rolle spielt.

Mit dieser Bilanzierungsstudie konnte gezeigt werden, daß dieses LC-MS/MS-Verfahren erstmals eine umfassende Bilanzierung unter Berücksichtigung von Metaboliten ermöglicht. Insbesondere können mit diesem Verfahren auch die Metabolite quantitativ bestimmt werden.

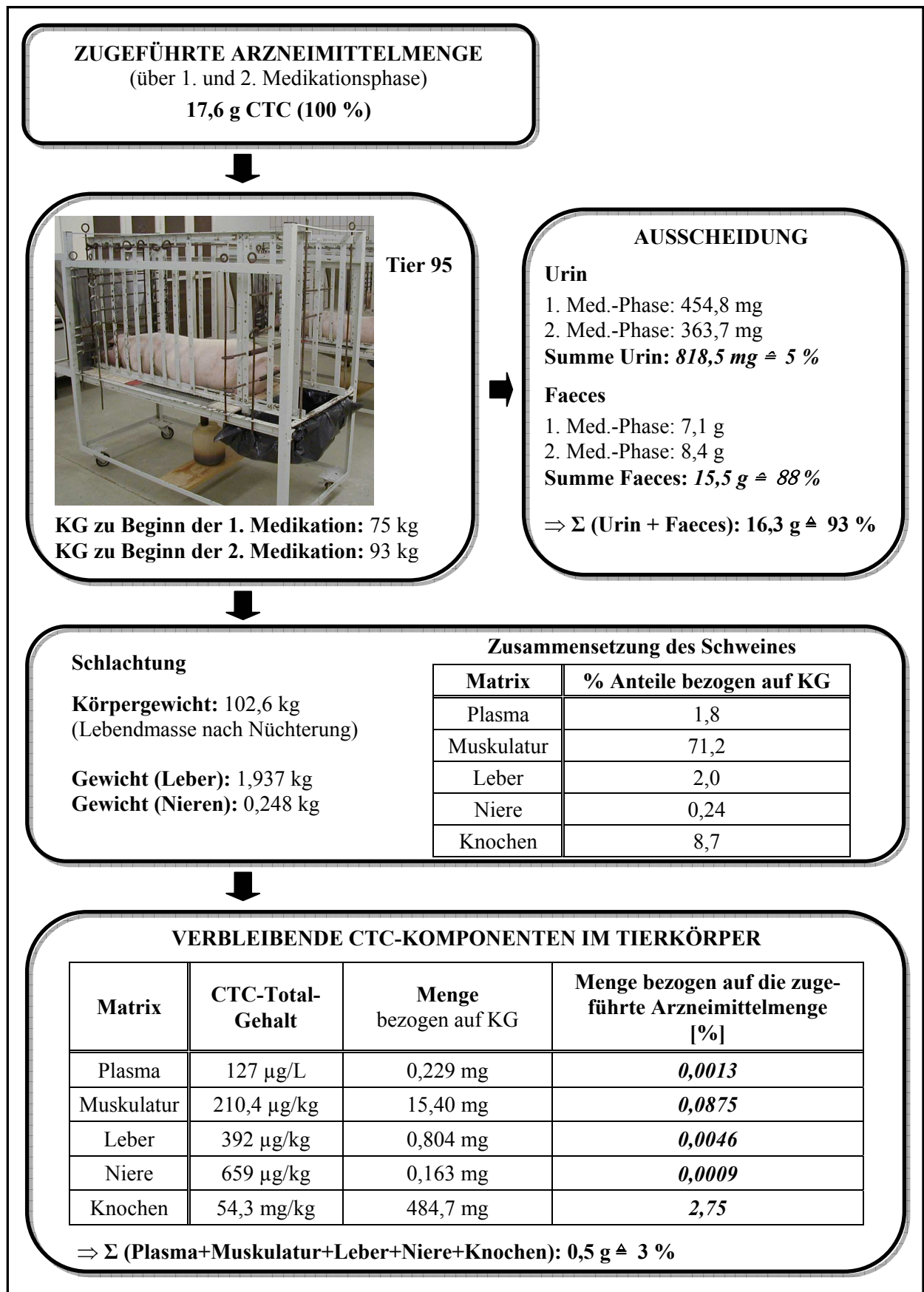


Abb. 39: CTC-Bilanzierung für Tier 95

### 5.9.4 Konsequenzen

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ohne Berücksichtigung von iso-CTC und e-iso-CTC von der zugeführten Arzneimittelmenge nur 13 g, also 74 %, entweder als Ausscheidungsprodukte oder als verbleibende Arzneimittelrückstände im Tierkörper erfaßt werden, unter Einbeziehung dieser Produkte 96 %. Damit ist eine quantitative Erfassung des Verbleibs des zugeführten Wirkstoffes erfolgt. Die bei der Bilanzierung mit berücksichtigten Abbauprodukte Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC für die Matrices Knochen und Faeces spielen mit prozentualen Anteilen am Gesamt-CTC-Gehalt von 0,1 % für Knochen und 0,5 % für Faeces nur eine untergeordnete Rolle. Dennoch bleibt zu diskutieren, ob diese Verbindungen aufgrund ihres 30-fach höheren Potentials, Resistenzen auszubilden, siehe **Kap. 3.4.1**, zur allgemeinen Resistenzsituation beitragen. Nach den Ergebnissen der Bilanzierungstudie ist davon auszugehen, daß 88 % der applizierten CTC-Menge über Faeces und 5 % über Urin als CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC oder e-Anhydro-CTC ausgeschieden werden. Damit ist mit einem hohen Eintrag von CTC-Komponenten in die Umwelt und dadurch auch mit einem indirekten Eintrag in die Nahrungskette zu rechnen.

Lediglich 3 % der aufgenommenen Wirkstoffmenge verbleiben im Tierkörper. Dennoch überschreiten die Gehalte in den Schlachtproben des Tieres 95, siehe **Tab. 31**, die entsprechenden MRL-Werte. Nach Ablauf der Wartezeit von 14 Tagen ließen sich in den übrigen vier Tieren durchschnittlich noch 1,4 % der applizierten Wirkstoffmenge nachweisen. Innerhalb der Wartezeit sind die Gesamt-CTC-Gehalte in Muskulatur um den Faktor 30 von 15,4 mg auf 0,5 mg, in Leber um den Faktor 40 von 804,4 µg auf 20,42 µg und in Niere um den Faktor 32 von 163,4 µg auf 5,2 µg gesunken. Nach diesem Zeitraum betrugen die Gehalte in den Schlachtproben bezogen auf die Summe von CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC für Muskulatur 6 %, für Leber und Niere 3 % der jeweiligen MRL-Werte.

Insgesamt zeigen die in **Kap. 5.4.2** und **Kap. 5.9.3** beschriebenen Bilanzierungsstudien, daß auch bei bestimmungsgemäßer Anwendung mit einem erheblichen Eintrag von CTC entweder in Form des ursprünglichen Wirkstoffes oder von Metabolite in die Nahrungskette zu rechnen ist. Als Hauptmetabolite treten hierbei e-CTC, iso-CTC sowie e-iso-CTC auf. Daneben lassen sich zum Teil auch Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nachweisen. Auch wenn diese Gehalte unterhalb der MRL-Werte liegen, so können sie trotzdem zu einer Resistenzbildung führen. Gerade geringe Gehalte, die unterhalb der MHK-Werte liegen, tragen zu einer Resistenzbildung bei [38]. Neben dem direkten Eintrag über tierische Lebensmittel sind auch indirekte Eintragspfade zu nennen. Zu diesen sogenannten Sekundärkreisläufen gehört der Eintrag von CTC über Gülleausbringung in die Umwelt sowie die Weiterverwendung und Weiterverarbeitung von knochenhaltigen Lebensmitteln z.B. als Düngemittel [342]. Darüber hinaus kann es bei der Zubereitung von tetracyclinhaltigen tierischen Lebensmitteln durch Braten oder Kochen zur Entstehung von Abbauprodukten mit im Vergleich zum Muttersubstanz toxischeren und stärker resistenzfördernden Eigenschaften kommen [339, 340]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, in die Ermittlung des CTC-Gehaltes neben dem Epimeren auch die Metabolite iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit einzubeziehen. Als Resultat dieser Untersuchungen sollten die MRL-Werte unter Berücksichtigung der Metabolite sowie der MHK-Werte nochmals überprüft werden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Chlortetracyclin (CTC) gehört zur Gruppe der Tetracyclin-Antibiotika, die häufig zur therapeutischen Behandlung in der Schweinemast eingesetzt werden. Das Antibiotikum wird den Tieren meist oral über das Futter verabreicht. Der hohe Einsatz von CTC in der Schweinemast in Form von Arzneimittelvormischungen als Fütterungsarzneimittel führte zu einem signifikanten Anstieg von Resistenzen. Die Entstehung und Verbreitung von Resistenzen wird dabei heutzutage zunehmend in einem mikrobiell-ökologischen Zusammenhang zwischen Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt gesehen. Nach dem derzeitigen Wissensstand kann jedoch noch keine klare Einschätzung des Gefährdungspotentials für den Verbraucher durch die veterinärmedizinische Anwendung von Tetracyclinen gegeben werden.

Es ist gesetzlich durch den MRL-Wert vorgeschrieben, den Tetracyclin-Gehalt als Summe der Muttersubstanz CTC und des Epimeren e-CTC zu ermitteln. Darüber hinaus bildet CTC in Abhängigkeit vom pH-Wert weitere Umwandlungs- und Abbauprodukte wie Isochlortetracyclin und Anhydrochlortetracyclin, die ebenfalls epimerisieren können. Bei den in der Literatur beschriebenen Analysenverfahren zur Bestimmung von Tetracyclinen findet nur eine ungenügende Berücksichtigung dieser Metabolite statt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist kein vollständig validiertes HPLC-Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclinen, welches auch die Metabolite umfaßt, bekannt. Als Ursache hierfür ist vor allem ein Mangel an kommerziellen Referenzsubstanzen für e-iso-CTC zu sehen. Weiterhin wurden diese Metabolite meist als unbedenklich für den Verbraucher eingestuft, da angenommen wurde, daß sie nur eine geringe oder gar keine antibiotische Wirksamkeit haben. Erst in neuerer Zeit findet neben der antibiotischen Aktivität auch die Toxizität und die resistenzfördernde Wirkung der Metabolite Beachtung. Der Einfluß der Metabolite auf die zunehmende Resistenzentwicklung ist aber bis heute nicht umfassend geklärt. Diese Arbeit verfolgte daher folgende Ziele:

Um nähere Erkenntnisse über die Aufnahme und den Verbleib des in der Schweinemast eingesetzten Antibiotikums Chlortetracyclin zu gewinnen, sollte im Rahmen eines Verbraucherschutzprojektes des MUNLV NRW in Zusammenarbeit mit verschiedenen Forschungsanstalten anhand von Mastdurchgängen unter kontrollierten Bedingungen das Ausscheidungsverhalten und die Rückstände in Schlachtproben untersucht werden. Im Rahmen einer ersten Medikationsstudie wurden in Zusammenarbeit mit dem Landwirtschaftszentrum Haus Düsse, Bad Sassendorf, Schweine unter landwirtschaftlich üblichen Bedingungen in einer Gruppe von 40 Tieren gehalten, definiert medikamentiert und das Ausscheidungsverhalten von CTC in Urin sowie die CTC-Rückstände in den Schlachtproben untersucht. Zur besseren Beurteilung, welche Menge der applizierten Wirkstoffe wieder ausgeschieden wird, erfolgte in einer zweiten Medikationsstudie an der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Braunschweig-Völkenrode, die Haltung von fünf Schweinen in Stoffwechselkäfigen, in denen die Tiere individuell gefüttert wurden und Urin und Faeces separat gesammelt wurde. Vier Tiere wurden nach Ablauf der Wartezeit von vierzehn Tagen geschlachtet. Nach Überprüfung, welche Metabolite in den Proben vorkommen, sollte anhand eines Tieres dieser Studie, das direkt nach Medikationsende geschlachtet wurde, eine Bilanzierung unter Berücksichtigung weiterer Metabolite erfolgen.

Im Einzelnen haben sich hieraus folgende Aufgabenstellungen ergeben:

- Entwicklung eines HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von CTC und e-CTC in Urin, Faeces, Plasma, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen und qualitativer Nachweis der Umwandlungs- und Abbauprodukte iso-CTC und Anhydro-CTC sowie deren Epimere
- Umfassende Validierung des Verfahrens unter Zugrundelegung der gültigen Richtlinien und Normen
- Ermittlung des CTC-Gehaltes in den bei den Medikationsstudien entnommenen Urin-, Faeces-, Plasma-, Muskulatur-, Leber-, Niere- und Knochenproben gemäß der EU-Verordnung EWG Nr. 2377/90 als Summe von CTC und e-CTC
- Feststellung, welche Metabolite neben e-CTC in den Proben zusätzlich vorkommen und Beurteilung, ob die in den Proben nachgewiesenen Metabolite in die Ermittlung des CTC-Total-Gehaltes mit einbezogen werden müssen
- Erweiterung des validierten Analysenverfahrens für die quantitative Bestimmung der weiteren Metabolite
- Quantifizierung von CTC und weiterer Metabolite in Schlachtproben
- CTC-Bilanzierung anhand eines Tieres unter Berücksichtigung weiterer Metabolite
- Untersuchung gebundener Tetracyclinrückstände in Knochen

Zur chromatographischen Bestimmung von CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit **HPLC-UV-MS/MS** erwies sich die YMC-ODS-AM-Trennsäule, basierend auf einem C 18-Material mit einem sehr geringen Metallionen-Gehalt, als optimal. Zur Trennung dieser Verbindungen mit einer guten symmetrischen Peakform zeigte sich ein Ameisensäure/Acetonitril-Gradient als geeignet. Zur Identifizierung der Substanzen wurden die Retentionszeiten, die UV-Maxima und mittels ESI-Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie erhaltenen Fragmentierungsmuster der einzelnen Verbindungen herangezogen. Die MS/MS-Detektion wurde im MRM-Modus und die Quantifizierung über den Totalionenstrom (TIC) der aufgenommenen Massenspuren durchgeführt.

Zur **Probenvorbereitung von Urin, Faeces, Plasma, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen** wurde ein Verfahren entwickelt, welches nach Extraktion der Probe mit McIlvain-Puffer eine Aufreinigung mittels Festphasenextraktion umfaßt. Dieses Verfahren eignet sich gleichermaßen für die oben angegebenen CTC-Komponenten. Als SPE-Sorbens erwies sich die Oasis HLB-Kartusche, basierend auf einem Copolymer-Material als optimal. Es wurde gezeigt, daß es während der Probenvorbereitung durch die Extraktion mit dem McIlvain-Puffer im schwach sauren Bereich zu einer erheblichen Epimerisierung kommt. Die Quantifizierung von CTC und e-CTC kann in Muskulatur, Plasma, Faeces und Knochen sowohl mit UV- als auch MS/MS-Detektion erfolgen, für Urin, Leber und Niere ist sie aufgrund einer mangelnden Selektivität nur mit MS/MS-Detektion möglich.

Die umfassende **Validierung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens** erfolgte nach den gültigen Normen und Richtlinien der DIN EN ISO/IEC 17025, der FDA sowie der EU-Richtlinie 2002/657/EG. Es wurden die Validierungsparameter Linearität, Selektivität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Richtigkeit und Präzision bestimmt. Die **Bestimmungsgrenzen** für die Bestimmung von CTC und e-CTC mit der MS/MS-Detektion lagen in Urin und Plasma bei 0,3 µg/L, in Leber und Niere bei 0,5 µg/kg, in Faeces bei 140 µg/kg und in Knochen bei 5 µg/kg. Für Muskulatur konnten mit der UV-Detektion Bestimmungsgrenzen von 8 µg/kg und für die MS/MS-Detektion 0,3 µg/kg erzielt werden. Die **Über-**

**prüfung der Linearität** ergab, daß für die Bestimmung von CTC und e-CTC mit der UV-Detektion die Kalbrierfunktionen auch in einem großen Konzentrationsbereich von 0,1 mg/L bis 100 mg/L einer linearen Funktion genügen, bei der MS/MS-Detektion eine Linearität aber nur in einem begrenztem Konzentrationsbereich gegeben ist. Für die Bestimmung von CTC und e-CTC mit der MS/MS-Detektion mußte daher der Arbeitsbereich von 0,005 mg/L bis 50 mg/L in drei Teilbereiche aufgeteilt werden. Die **Selektivität des Verfahrens** wurde durch einen Vergleich der Retentionszeiten, der UV-Spektren, der MS-Spektren, der Produkt-Ionen-Intensitäten sowie durch eine für CTC und e-CTC charakteristische Peaklöschung bewiesen. Die Bestimmung der **Richtigkeit** erfolgte über die Ermittlung der Wiederfindung, die aus der Wiederfindungsfunktion berechnet wurde. Die Wiederfindungen wurden in Abhängigkeit von der Matrix zwischen 36 % und 107 % ermittelt. Sie lagen damit teilweise unterhalb des akzeptierten Bereiches von 70 % und 110 %, können aber dennoch als akzeptabel betrachtet werden, da eine ausreichende Reproduzierbarkeit gegeben ist. Die **Meßpräzision** für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Muskulatur mit der MS/MS-Detektion betrug durchschnittlich 5 % und ist damit deutlich geringer als die geforderten 20 %. Die **Methodenpräzision** unter Wiederholbedingungen lag mit Werten von 6 % bis 8 % für Muskulatur, Urin, Plasma, Faeces, Leber und Niere nur geringfügig oberhalb der für Muskulatur ermittelten Meßpräzision. Für Knochen wurde aufgrund der Schwierigkeit, homogenes Probenmaterial zu gewinnen, eine höhere Methodenpräzision von 19 % ermittelt.

Im nächsten Schritt wurde das für die verschiedenen Matrices entwickelte und validierte Verfahren im Rahmen der Medikationsstudien angewendet. In der Medikationsstudie **im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse** wurden Schweine mit einer definierten Menge Chlortetracyclin medikamentiert und in regelmäßigen Abständen Urinproben zur Untersuchung des Ausscheidungsverhaltens genommen. Eine Versuchstiergruppe wurde mit CTC medikamentiert und eine unbehandelte Tiergruppe zur Kontrolle mitgeführt. Drei Monate nach Absetzen der Medikation erfolgte die Schlachtung aller Tiere, wobei den Tieren Muskulatur-, Leber-, Niere-, Knochen- und Blutproben entnommen wurden. Die während des Mastdurchganges durchgeführten Resistenzuntersuchungen haben gezeigt, daß die aus Faeces der Tiere isolierten *E. coli*-Bakterien hohe Anteile resistenter Keime aufwiesen. Die Untersuchung der Urinproben der Versuchstiere ergab, daß nach Absetzen der Medikation der CTC-Gehalt zwar zunächst stark abnahm, aber auch zum Zeitpunkt der Schlachtung im Urin CTC nachweisbar war. In allen bei der Schlachtung genommenen Proben konnten ebenfalls geringe CTC-Gehalte festgestellt werden, obwohl die Medikation drei Monate zurücklag. In Knochen konnten aber konnten hohe Gehalte von bis zu 21 mg/kg festgestellt werden. In den Knochenproben der Kontrolltiere konnten ebenfalls CTC-Gehalte ermittelt werden, die etwa 1 % der Gehalte in den Versuchstierknochenproben entsprachen, wobei als mögliche Eintragsquelle von CTC bei den Kontrolltieren eine Arzneimittelverschleppung im Stall diskutiert wurde. Anhand der Urin- und Faecesuntersuchungen der Proben aus der Medikationsstudie **an der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)** konnte gezeigt werden, daß über Urin 1 % bis 4 % und über Faeces 55 % bis 83 % der applizierten CTC-Menge als CTC und e-CTC wieder ausgeschieden wird. Die Gehalte in Faeces waren deutlich höher als in Urin, da CTC nur zu etwa 30 % resorbiert wird und die in Faeces nachgewiesenen CTC-Gehalte daher überwiegend aus dem nicht resorbierten Anteil des Arzneimittels stammen. Die ermittelten CTC-Gehalte in den Schlachtproben der Tiere, die nach Ablauf der Wartezeit geschlachtet wurden, lagen unterhalb der MRL-Werte. Die Höhe der CTC-Gehalte in Muskulatur, Leber und Niere war in beiden Medikationsstudien vergleichbar, obwohl die Schlachtung der Tiere in der Haus Düsse-Studie drei Monate, in der FAL-Studie zwei Wochen nach Medikationsende erfolgte.

Neben CTC und e-CTC wurden in Urin, Faeces, Plasma, Muskulatur, Leber, Niere und Knochen iso-CTC und e-iso-CTC, in Faeces und Knochen in Spuren auch Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nachgewiesen. Darüber hinaus konnte in vielen Proben noch ein weiteres zunächst noch unbekanntes Produkt festgestellt werden.

In guter Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur konnte dieses **zusätzlich in den Proben auftretende Produkt** anhand der UV- und Massenspektren als **keto-e-CTC** mit *cis*- oder *trans*-Konfiguration identifiziert werden. Es wurde erstmals die Möglichkeit einer massenspektrometrischen Unterscheidung der Keto-Enol-Tautomere anhand typischer Fragmentierungsreaktionen bzw. charakteristischer Produkt-Ionen aufgezeigt.

Nachfolgend wurde geprüft, ob es notwendig ist, bei der **Ermittlung des CTC-Gehaltes** über die gesetzlich vorgeschriebene Regelung hinaus, die eine Bestimmung des CTC-Gehaltes als Summe von CTC und e-CTC vorsieht, auch die **weiteren aufgetretenen Metabolite mit einzubeziehen**. Für diese Beurteilung wurde untersucht, welche Metabolite *in vivo* oder *in vitro* entstehen. Darüber hinaus erfolgte die Prüfung der antibiotischen Aktivität. Es wurde gezeigt, daß e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC in allen Matrices sowohl *in vivo* als auch *in vitro* entstehen können. Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC kommen nur in Faeces und Knochen vor, wobei diese Verbindungen in Faeces ausschließlich *in vivo* entstehen, in Knochen ist auch eine *in vitro*-Bildung aufgrund des salzsauren Aufschlusses bei der Probenvorbereitung möglich. Die Prüfung der antibiotischen Aktivität ergab eine antibiotische Unwirksamkeit von iso-CTC, alle übrigen Verbindungen sind antibiotisch aktiv. Damit wurde verdeutlicht, daß die Ermittlung des CTC-Gehaltes neben CTC und e-CTC auch die Metabolite iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit einschließen sollte.

Zur Untersuchung der antibiotischen Aktivität wurde der **Dreiplattentest** angewendet, wobei eine abnehmende antibiotische Aktivität in der Reihenfolge CTC, Anhydro-CTC, e-CTC, e-Anhydro-CTC festgestellt wurde. Es konnte gezeigt werden, daß es während der Durchführung des Testes zu einer erheblichen Umwandlung von CTC in die antibiotisch inaktive Verbindung iso-CTC kommt, was möglicherweise zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit lag auf der **quantitativen Bestimmung der Metabolite iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC**. Das für CTC und e-CTC validierte Analysenverfahren wurde für die Bestimmung dieser Metabolite optimiert. Insbesondere wurde gezeigt, daß das kommerziell nicht erhältliche e-iso-CTC durch Epimerisierung von iso-CTC in schwach saurer Lösung hergestellt werden kann. Mit diesem erweiterten HPLC-UV-MS/MS ist erstmals eine simultane quantitative Bestimmung der genannten CTC-Komponenten möglich.

Das Ziel, CTC und e-CTC durch alkalische Behandlung der Meßprobe in die isomeren Verbindungen zu überführen und damit über **iso-CTC und e-iso-CTC als Summenparameter** zu bestimmen, konnte für Standardlösungen erreicht werden. Die Übertragung dieser Methode auf Muskulatur erbrachte keine quantitative Umwandlung von CTC und e-CTC in iso-CTC und e-iso-CTC.

Im Anschluß daran erfolgte die **Ermittlung des CTC-Total-Gehaltes in den Schlachtproben** der Tiere der FAL-Studie, die nach Ablauf der Wartezeit geschlachtet wurden. Es wurde gezeigt, daß sich die CTC-Gehalte unter Einbeziehung von iso-CTC und e-iso-CTC erheblich erhöhen. Vor allem für Muskulatur konnte eine prozentuale Erhöhung des CTC-Gehaltes um 70 % festgestellt werden. Jedoch lagen auch die CTC-Total-Gehalte unterhalb der MRL-Werte. Dennoch könnte es unter Einbeziehung von iso-CTC und e-iso-CTC häufiger zu einer Überschreitung der MRL-Werte kommen. Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC kommen nur in Knochen vor und spielen mit prozentualen Anteilen von 0,1



% am CTC-Gesamt-Gehalt nur eine untergeordnete Rolle.

Da die Gehalte in Knochen mit Werten bis zu 28 mg/kg sehr hoch waren, wurde nachfolgend untersucht, ob durch diese **gebundenen Tetracyclinrückstände eine Gefährdung für den Verbraucher** resultieren kann. Die Ergebnisse des durchgeführten „Knochen-Plasma-Modellversuches“ belegen, daß CTC aus Knochen wieder herausgelöst werden und ins Plasma übergehen kann. Als Resultat dieses Versuches erscheint auch eine *in vivo* Freisetzung von CTC aus Knochen als sehr wahrscheinlich. Mit diesen Untersuchungen konnte die Annahme, daß Tetracycline irreversibel im Knochen eingelagert werden, widerlegt werden. Somit kann nicht davon ausgegangen werden, daß Tetracyclinrückstände in Knochen unbedenklich sind für den Verbraucher.

Bei der durchgeführten **Bilanzierung des Tiere 95 der FAL-Studie** wurde festgestellt, daß Urin neben CTC und e-CTC auch große Mengen an iso-CTC und e-iso-CTC enthält. Der prozentuale Anteil dieser Metabolite am CTC-Gesamtgehalt betrug in Urin bis zu 90 %. In Faeces war der Anteil dieser isomeren Verbindungen am Gesamt-Gehalt mit Maximalwerten von 22 % deutlich geringer. Darüber hinaus ließen sich in dieser Matrix auch Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nachweisen, die aber nur einen prozentualen Anteil von 2 % am CTC-Gesamtgehalt darstellen. Die CTC-Gehalte in den Schlachtproben dieses Tieres überschritten unter Einbeziehung von iso-CTC und e-iso-CTC den MRL-Wert deutlich, während die CTC-Gehalte, ermittelt als Summe von CTC und e-CTC, etwa in Höhe der MRL-Werte lagen. Die Bilanzierung ergab, daß von der applizierten Wirkstoffmenge 88 % über Faeces und 5 % über Urin wieder ausgeschieden wurden. Von der im Tierkörper verbleibenden Wirkstoffmenge wurde 2,75 % im Knochen eingelagert und nur 0,1 % verteilt in den übrigen Matrices wiedergefunden. Damit wurde gezeigt, daß von der applizierten Wirkstoffmenge 93 % über Urin und Faeces wieder ausgeschieden werden und damit mit einem erheblichen Umwelteintrag zu rechnen ist. Die im Tier verbleibende Arzneimittelmenge ist mit 3 % vergleichsweise gering. Von der applizierten Wirkstoffmenge wurde unter Einbeziehung von CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC oder Anhydro-CTC 96 % analytisch erfaßt. Damit konnte unter Berücksichtigung möglicher Fehlerquellen wie z.B. der Analysenpräzision, der Wiederfindung und der Genauigkeit der Zusammensetzung des Schweines die gesamte gefütterte Wirkstoffmenge wiedergefunden werden. Es wurde erstmals die Möglichkeit aufgezeigt, eine Bilanzierung, die eine quantitative Bestimmung der Metabolite von CTC mit einschließt, durchführen zu können. Es konnte somit eine umfassende Abschätzung des Rückstandsverhaltens des in der Schweinemast häufig eingesetzten Chlortetracyclin erfolgen.

Die durchgeführten Untersuchungen belegen, daß auch bei bestimmungsgemäßer Anwendung von CTC bei Schweinen Rückstände in tierischen Lebensmitteln unvermeidbar sind. Die den Schweinen applizierten Wirkstoffe können als ursprünglicher Wirkstoff oder als Metabolit in antibiotisch wirksamer, resistenzfördernder oder sonstiger toxischer Form in die Umwelt und die Nahrungskette gelangen. Die Ermittlung von Chlortetracyclinrückständen sollte daher nicht nur auf die Summe von CTC und e-CTC beschränkt bleiben, sondern es sollten auch die Metabolite iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit einbezogen werden. Vor dem Hintergrund, daß auch CTC-Gehalte unterhalb der MRL-Werte Resistenzen fördern können, sollten die MRL-Werte nochmals überprüft werden. Darüber hinaus ist vor allem ein nachhaltigerer Einsatz von Tetracyclinen in der Schweinemast anzustreben. Weiterführende Arbeiten sollten dazu dienen, basierend auf diesem HPLC-UV-MS/MS-Verfahren, die möglichen Einträge in Umweltkompartimente und die Nahrungskette weiter zu verfolgen.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Chemikalien

Die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Chemikalien sind nachfolgend alphabetisch geordnet aufgeführt.

Acetonitril (HPLC Gradient Grade; Roth/Karlsruhe)  
Ameisensäure reinst, 98-100 % (Merck/Darmstadt)  
Anhydrochlortetracyclin Hydrochlorid,  $\geq 97$  % (Acros/Schwerte)  
Chlortetracyclin Hydrochlorid,  $\geq 97$  % (Acros/Schwerte)  
Citronensäure (p. a.; Merck /Darmstadt)  
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei (p. a.; Merck/Darmstadt)  
Epianhydrochlortetracyclin Hydrochlorid,  $\geq 97$  % (Acros/Schwerte)  
Epichlortetracyclin Hydrochlorid,  $\geq 97$  % (Acros/Schwerte)  
Ethylendiamintetraessigsäure Dihydrat, EDTA (extra pure; Riedel-de-Haën /Seelze)  
Isochlortetracyclin Hydrochlorid,  $\geq 97$  % (Acros/Schwerte)  
Kaliumdihydrogenphosphat (reinst; Merck/Darmstadt)  
Methanol (p. a.; Merck/Darmstadt)  
Metaphosphorsäure; 40-50 % (w/w; p. a.; Merck/Darmstadt)  
Natriumchlorid (reinst; Fluka/Taufkirchen)  
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (reinst; Merck/Darmstadt)  
Natriumhydroxid, Plätzchen,  $\geq 99$  % (p. a.; Merck/Darmstadt)  
Perchlorsäure; 60 % (w/w; p. a.; Merck/Darmstadt)  
Pufferlösungen, pH 2 und pH 7 (gebrauchsfertig; Merck/Darmstadt)  
Salzsäure, 37 % (w/w; p. a.; Merck/Darmstadt)  
Wasser (bidestilliert über Quarzglas mit Destamat Bidest von Heraeus/Hanau)

### 7.2 Geräte

#### 7.2.1 HPLC-UV-MS/MS Triple Quadrupol-System

Sämtliche HPLC-UV-MS/MS-Untersuchungen wurden an einem System, bestehend aus einer HPLC-Anlage, der Alliance 2690, und einem Massenspektrometer, dem Quattro Ultima, der Firma Waters/Eschborn mit Ion-Spray-Interface und MassLynx-Auswertesoftware durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte durch Electrospray-Ionisation im positiven Meßmodus.

**LC-System:** Alliance 2690 (Waters)

**Chromatographische Bedingungen:**

<b>Fließmittel:</b>	<b>A:</b> H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN/HCOOH (89,5/10/0,5 (v/v/v)) <b>B:</b> H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN/HCOOH (39,5/60/0,5 (v/v/v))
<b>Flußrate:</b>	0,4 mL/min
<b>Vorsäule:</b>	YMC-ODS-AM, 19 x 3 mm, 5 µm (YMC)

<b>Säule:</b>	YMC-ODS-AM, 150 x 3 mm, 5 µm (YMC)		
<b>Autosampler:</b>	4 °C		
<b>Injektionsvolumen:</b>	20 µL		
<b>Detektion:</b>	UV (PDA 996, Waters); Meßbereich: 200-400 nm MS/MS (Quattro Ultima, Micromass/Waters) (ESI <sup>+</sup> ) <i>allgemeingültige Tune-Page-Parameter:</i>		
	Capillary Voltage [kV]:	3,5	Desolvation Gas Flow [L/h]: 500
	Cone [V]:	20	Ion Energy [V]: 1
	Source Temperature [°C]:	125	Entrance Potential [V]: 50
	Desolvation Temperature [°C]:	270	Exit Potential [V]: 50
	Cone Gas Flow [L/h]:	100	Multiplier [V]: 650
<b>Kompressor:</b>	SF 1 (Atlas Copco/Wilrijk, Belgium)		
<b>Stickstoffgenerator:</b>	NGM-11 vin (CMC/Eschborn)		
<b>Auswertng:</b>	MassLynx <sup>TM</sup> , Version 3.5; Micromass/Eschborn		

Die angegebenen Tune-Page-Parameter gelten für alle durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen. Messungen wurden sowohl im Full-Scan-Modus, Precursor-Ion-Scans und Produkt-Ion-Scans, als auch im MRM-Modus durchgeführt:

### 7.2.2 Probenzerkleinerung

Moulinette

Ultra-Turrax T 25; Dispergiergerät (Ika Labortechnik/Staufen)

Schneidmühle, Typ SM 2000 (Retsch/Haan)

### 7.2.3 Probenhomogenisierung

Horizontalschüttler HS 501 digital (Ika Labortechnik/Staufen)

Vortex-Rüttler, Minishaker MS 2 (Ika Labortechnik/Staufen)

### 7.2.4 Zentrifugen

Minifuge T (Heraeus Sepatech/Osterode)

Varifuge 3.OR (Heraeus Sepatech/Osterode)

### 7.2.5 SPE-Extraktionseinheit

Zur Durchführung der Festphasenextraktion wurde ein Vakuumfiltrationsgerät mit 12 Steckplätzen J.T. Baker spe-12 G (Baker/Gross-Gerau) eingesetzt. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde über aufgesetzte Kunststoffhähne reguliert und gegebenenfalls durch Anlegen eines Vakuums über eine Wasserstrahl- oder Membranpumpe erhöht.

### 7.2.6 TurboVap

Zum Einengen von Lösungen wurde ein TurboVap® LV Evaporator, Typ ZW 7001 (Zymark/Idstein) eingesetzt. Hierzu wurden die Lösungen in spezielle Reagenzgläser (Vap-Gläser) gefüllt, in einen entsprechenden Einsatz in einem Wasserbad temperiert und das Lösungsmittel im Luft- oder Stickstoff-

strom abgeblasen.

### 7.2.7 pH-Meter

Es wurde ein Digital-Mikroprozessor-pH-Meter der Firma Knick/Berlin eingesetzt. Vor jeder Messung erfolgte eine Kalibrierung des Gerätes mit gebrauchsfertigen Pufferlösungen der pH-Werte 2 und 7.

### 7.2.8 UV-Lampe

Zur Bestrahlung der Proben mit UV-Licht wurde eine UV-Lampe REPROSTAR II Transilluminator mit variabler Wellenlänge der Firma Camag/Berlin eingesetzt. Zur Sichtbarmachung der Fluoreszenz wurde eine Wellenlänge von 366 nm eingestellt.

## 7.3 Lösungen/Reagenzien

### 7.3.1 Mobile Phase

**Fließmittel A:** In einen 1000 mL-Meßkolben wurden etwa 700 mL bidest. H<sub>2</sub>O vorgelegt und 100 mL Acetonitril (HPLC Gradient Grade) sowie 5 mL konzentrierte Ameisensäure (reinst) zugegeben. Anschließend wurde mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt und gut gemischt. Der pH-Wert des Fließmittels betrug 2,2.

**Fließmittel B:** In einen 1000 mL-Meßkolben wurden etwa 200 mL bidest. H<sub>2</sub>O vorgelegt und 600 mL Acetonitril (HPLC Gradient Grade) sowie 5 mL konzentrierte Ameisensäure (reinst) zugegeben. Anschließend wurde mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt und gut gemischt. Der pH-Wert des Fließmittels betrug 2,6.

### 7.3.2 McIlvain-Puffer, pH 4 mit 0,1 mol/L EDTA

**McIlvain-Stammlösung:** Es wurden 284 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( $\hat{=}$  2 Mol) und 210 g Zitronensäure Monohydrat ( $\hat{=}$  1 Mol) mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt. Die Lösung wurde bei einer Temperatur von 4 °C bis 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

**EDTA-McIlvain-Puffer:** 100 ml McIlvain-Stammlösung wurden mit 800 mL bidest. H<sub>2</sub>O versetzt und 37,2 g EDTA ( $\hat{=}$  0,1 mol/L) darin aufgelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit Salzsäure (6 mol/L) auf 4 eingestellt und mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt.

### 7.3.3 Stammlösungen

Die Stammlösungen aller eingesetzten Substanzen wurden als Einzellösungen hergestellt und aliquotiert bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 10 mg der Festsubstanz in einen 10 mL-Meßkolben eingewogen und mit Methanol (p. a.) auf 10 mL aufgefüllt. Diese Lösung ( $\beta$  = 1 g/L) wurde dann in Aliquoten von 1 mL aufgeteilt und sofort tiefgefroren.

### 7.3.4 Standardlösungen

Die für die Versuche eingesetzten Standardlösungen in Form von Einzelstandardlösungen wurden durch Verdünnung aus den Stammlösungen mit Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v), pH 2,8 herge-

---

stellt, entsprechend der Stammlösung aliquotiert und ebenfalls bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt.

### 7.3.5 Kalibrierlösungen

Die Kalibrierlösungen der jeweiligen Epimerenpaaren (CTC/e-CTC, Anhydro-CTC/e-Anhydro-CTC, epimerisiertes iso-CTC) wurden aufgrund der Stabilität, bedingt durch die leichte Epimerisierung in schwach saurer Lösung, im Verhältnis 1:1 durch Verdünnung der Stammlösungen mit Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v) hergestellt, anschließend entsprechend der Stammlösungen aliquotiert und bei einer Temperatur von -80 °C eingefroren.

## 7.4 Medikationsstudien

### 7.4.1 Haus Düsse-Studie

Der Versuchablauf des Mastdurchganges im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse sowie die entnommenen Proben sind in **Tab. 35** tabellarisch dargestellt. Versuchstier 3 mußte während der Mastphase zusätzlich 2 x mit Tardomyocel und 5 x mit Baytril behandelt werden: 6 mL Tardomyocel am 17./19.6. und 5 mL Baytril am 20./21./22./24./28.6.

Tab. 35: Versuchsdurchführung und Beprobungsplan

Datum	Bemerkung	Matrix	Menge
26.05.2000	Einstellung der Tiere	-	-
29.05.2000	1. Probenahme (zur Erfassung des Grundstatus)	Urin	10-100 mL
30.05.2000	Beginn der Medikation	-	-
13.06.2000	Ende der Medikation	-	-
14.06.2000	2. Probenahme (erste Probenahme nach Medikationsende)	Urin	10-100 mL
27.06.2000	3. Probenahme	Urin	10-100 mL
11.07.2000	4. Probenahme	Urin	10-100 mL
25.07.2000	5. Probenahme	Urin	10-100 mL
08.08.2000	6. Probenahme	Urin	10-100 mL
22.08.2000	7. Probenahme	Urin	10-100 mL
28.08.2000	Probenahme bei der Schlachtung	Urin Muskulatur Knochen Blut Leber Niere	20-50 mL ca. 200 g Unterschenkel ca. 500 mL 150 - 200 g 150 - 200 g

In den nachfolgenden Tabellen sind einzelne Daten zum Alter, Geschlecht und Schlachtgewicht der am Versuch beteiligten Tiere sowie Angaben zur Versuchsdurchführung wie Buchtnummer des Stalls und Kennzeichnung der Tiere aufgeführt.

Tab. 36: Einzelne Daten zu den Kontrolltieren

Versuchstiernummer	Geschlecht	Geburtsdatum	Schlachtdatum	Bucht-nummer	Ohr-marke	Schlachtgewicht [kg]
1	Börge	10.03.2000	24.08.2000	49	1194	74.4
2	Börge	10.03.2000	24.08.2000	49	1175	77.2
3	Börge	16.03.2000	24.08.2000	49	1107	76.0
4	Börge	13.03.2000	24.08.2000	49	1217	75.8
5	Sauschwein	13.03.2000	24.08.2000	43	1220	74.0
6	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	43	1204	86.6
7	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	43	1289	79.6
8	Sauschwein	09.03.2000	24.08.2000	43	1082	78.0
9	Börge	10.03.2000	24.08.2000	41	1171	81.8
10	Börge	16.03.2000	24.08.2000	41	1138	87.8
11	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	47	1086	76.8
12	Börge	16.03.2000	24.08.2000	45	1141	88.8
durchschnittliches Schlachtgewicht [kg]:						79,7

Tab. 37: Einzelne Daten zu den Versuchstieren

Versuchstiernummer	Geschlecht	Geburtsdatum	Schlachtdatum	Bucht-nummer	Ohr-marke	Schlachtgewicht [kg]
1	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	44	1181	87.4
2	Sauschwein	04.03.2000	24.08.2000	44	1046	87.2
3	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	44	1182	33.0
4	Sauschwein	09.03.2000	24.08.2000	44	1079	71.8
5	Sauschwein	13.03.2000	24.08.2000	48	1223	76.6
6	Sauschwein	20.02.2000	24.08.2000	48	1218	82.0
7	Sauschwein	17.03.2000	24.08.2000	48	1123	83.6
8	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	44	1195	88.4
9	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	44	1176	92.4
10	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	44	1206	79.0
11	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	48	1193	84.8
12	Sauschwein	10.03.2000	24.08.2000	48	1089	77.0
durchschnittliches Schlachtgewicht [kg]:						78,6

Die im Rahmen der Medikationsstudie durchgeführten Probenahmen erfolgten mit Unterstützung des LEJ und fanden an den jeweils angegebenen Tagen vormittags statt. Die Proben wurden nach der Entnahme gekühlt zum SVUA Detmold transportiert und dort mit Ausnahme der Blutproben ohne weitere Bearbeitung bis zur Analyse tiefgefroren. Die Blutentnahme erfolgte in 500 mL-Gefäßen, die 7,5 mL einer gesättigten EDTA-Lösung (107 g Ethylendiamintetraessigsäure Dihydrat in 1 L bidest. Wasser) enthielten. Nach dem Transport zum SVUA Detmold wurden die Blutproben zur Gewinnung des Plasmas sofort bei 3300 g 15 Minuten ungebremst zentrifugiert und das Plasma als zellfreier Überstand abgenommen. Das so gewonnene Plasma wurde ebenfalls bis zur Analyse tiefgefroren. Die zur

Analyse notwendige Homogenisierung von Muskulatur, Leber und Niere erfolgte, wie in der Analysenvorschrift in **Kap. A. 9** im Anhang beschrieben. Die Knochenproben wurden zunächst im SVUA Detmold in der Sektion in Scheiben geschnitten, von Fleischresten befreit und anschließend im SVUA Krefeld in einer Knochenmühle (S. **Kap. 7.2.2**) gemahlen, wobei die Knochenproben beim Transport gekühlt wurden. Die Analyse der innerhalb der Studie entnommenen und gegebenenfalls homogenisierten Proben erfolgte nach der Analysenvorschrift (s. **Kap. A. 9** im Anhang) in einer Zweifach-Bestimmung. Die Konzentrationsbestimmung von CTC und e-CTC erfolgte ausschließlich über die massenspektrometrische Detektion.

### 7.4.2 FAL-Studie

**Aufzucht der Tiere:** Zunächst wurden Ferkel in einer Gruppe auf dem Flatdeck im Institut für Tierzucht, FAL Mariensee, ohne Arzneimitteleinsatz aufgezogen. Die Ferkel wurden mit einer Ohrmarke gekennzeichnet. Fünf Börgen, also Kastraten, wurden in der 18. KW 2001 zur Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig transportiert. Die Haltung in Stoffwechselkäfigen mit einer separaten Sammlung von Urin und Kot ist nur mit Börgen möglich. In der FAL wurden die Tiere bis zum Versuchsbeginn am 16.07.01 in einem separaten Stall in Einzelbuchten gehalten, um die Arzneimittelfreiheit der Tiere zu gewährleisten. Nachdem die Tiere ein Gewicht von 71-89 kg erreicht hatten, wurden die Tiere in Stoffwechselkäfigen aufgestellt.

**Haltung der Tiere in Stoffwechselkäfigen:** Nach der Einstellung in die Stoffwechselkäfige erfolgten zwei Medikationsphasen von jeweils zehn Tagen, unterbrochen von einer aus Tierschutzgründen notwendigen Pause von elf Tagen. Die Medikationen erfolgten vom 16.-26.07.2001 und 06.-16.08.2001. Urin und Kot wurden separat aufgefangen und täglich tierweise zu Gülle zusammengeführt. Zusätzlich wurden am Anfang, in der Mitte und am Ende der jeweiligen Medikationsphase Blutproben entnommen. Während der Medikationspause wurden die fünf Tiere in einem separaten Stall in Einzelbuchten gehalten, wobei der hierbei angefallende Kot und Urin verworfen wurde.

**Medikation der Tiere:** Die Medikation der Tiere, Art und Dauer, erfolgte unter praxisnahen therapieüblichen Bedingungen. Den Tieren wurde das Arzneimittel Chlortetracyclin 100 oral über das Trockenfutter (Mischung aus Gerste, Weizen, Sojaschrot, Mineralstoffzusammensetzung, 1% Sojaöl) verabreicht. Die Dosierung entsprach der maximal üblichen therapeutischen Anwendung, wobei sich die Applikationsmenge des Wirkstoffes nach dem Körpergewicht der Tiere richtete. Chlortetracyclin 100 enthält pro 1000 g Präparat 100 g des Wirkstoffes Chlortetracyclin (Hersteller: BELAPHARM), wobei nach Vorschrift pro kg Körpergewicht 100 mg des Präparates als Pulver eingesetzt wurden (also tägliche Dosis: 7 g Pulver/Tier (70 kg KGW)). Unter Berücksichtigung der Gewichtszunahme der Tiere während des Versuches wurde die Dosierung jeden zweiten Tag erhöht. Die Dosierung der Arzneimittel ist im einzelnen in **Tab. A. 2** und **Tab. A. 3** im Anhang aufgeführt. Die Fütterung der Tiere mit Antibiotika fand zweimal täglich, morgens und nachmittags, statt. Die Fütterungen mit Arzneimittel erfolgten vom 16.07.01 (nachmittags) bis zum 26.07.01 (vormittags) sowie vom 06.08.01 (nachmittags) bis zum 16.08.01 (vormittags).

**Einmischung in das Futter:** Die Einmischung der Arzneimittel in das Trockenfutter erfolgte in der FAL Braunschweig. Damit gewährleistet war, daß die Tiere tatsächlich die gesamte Arzneimittelmenge aufnehmen, wurden die Antibiotika täglich neu in das Futter eingemischt: Dazu wurde das Arzneimittel bei der täglichen Fütterung in die Mitte des Futters eingemischt, so daß das Tier zuerst das „An-

tibiotikafutter“ frißt. Dabei wurde von der Annahme einer durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme von 2,5 kg pro Tier ausgegangen.

**Schlachtung der Tiere:** Das Tier mit der Tiernummer 95 wurde mit dem Ziel einer Bilanzierung direkt nach Medikationsende am 16.08.2001 geschlachtet. Da die maximale Serumkonzentration ca. 3–4 h nach einer oralen Verabreichung erreicht wird, erfolgte die Schlachtung ungefähr 3 h nach der letzten Fütterung. Die letzte Fütterung fand um ca. 7.00 Uhr statt, die Schlachtung des Tieres um 10.00 Uhr. Nach der bei der Schlachtung durchgeführten Probenahmen von Leber, Niere, Muskulatur, Knochen, Blut, Urin und Kot erfolgte die Beseitigung des verbleibenden Tierkörpers durch die FAL Braunschweig-Völkenrode. Die übrigen vier Tiere wurden bis zum Ablauf der Wartezeit von 14 Tagen in einem separaten Stall in Einzelbuchten gehalten. Anschließend erfolgte am 30.08.2001 die Schlachtung und Beprobung (Leber, Niere, Muskulatur, Knochen, Blut, Urin und Kot) der Tiere.

**Probenahmen und Lagerung der Proben:** Zur Erfassung des Grundstatus wurden am Montag, den 16.07.01, vor Beginn der ersten Medikation Urin-, Kot- und Blutproben genommen. Die Probennahme fand am Vormittag statt. Am Montag Nachmittag wurde mit der Medikation der Tiere begonnen. Die folgenden Probenahmen von Urin und Kot erfolgten täglich nachmittags. Blutproben können bei Schweinen nicht so häufig entnommen werden, weshalb diese Probenahmen nur am Anfang, in der Mitte und am Ende einer jeden Medikationsphase durchgeführt wurden. Die Urin- und Kotproben wurden bis zur Abholung in der FAL tiefgefroren. Blutproben wurden in von der FAL zur Verfügung gestellten EDTA-Röhrchen entnommen, anschließend in der FAL zentrifugiert und die so erhaltenen Plasmaproben ebenfalls bis zur Abholung in der FAL tiefgefroren. Die tiefgefrorenen Proben wurden am Ende der ersten und zweiten Medikationsphase abgeholt. Die bei der Schlachtung des Tieres 95 entnommenen Proben wurden direkt nach Detmold zum SVUA Detmold transportiert. Die Schlachtproben der 14 Tage später geschlachteten Tiere wurden zunächst in der FAL bis zur Abholung tiefgefroren. Alle entnommenen Proben wurden beim Transport gekühlt, homogenisiert und anschließend bis zur Aufarbeitung wieder tiefgefroren. Die Homogenisierung der Proben erfolgte mit Ausnahme von Knochen im SVUA Detmold. Die Knochenproben wurden im SVUA Krefeld in einer Knochenmühle (s. **Kap. 7.2.2**) zerkleinert, wobei die Proben während des Transportes gekühlt wurden.

Das Alter und Schlachtgewicht der am Versuch beteiligten Börgen ist in **Tab. 38** zusammengefaßt.

*Tab. 38: Alter und Schlachtgewicht der Versuchstiere (Börgen)*

Versuchstiernummer	Geburtsdatum	Schlachtdatum	Schlachtgewicht [kg]
93	19.02.2001	16.08.2001	105,6
94	16.02.2001	30.08.2001	104,0
95	19.02.2001	30.08.2001	102,6
96	16.02.2001	30.08.2001	110,2
97	19.02.2001	30.08.2001	111,2

Die Analyse der innerhalb der Studie entnommenen und gegebenenfalls homogenisierten Proben erfolgte nach der allgemeinen Analysenvorschrift (s. **Kap. A. 9**) in einer Zweifach-Bestimmung. Die Konzentrationsbestimmung aller Verbindungen erfolgte ausschließlich über die MS/MS-Detektion.

Der Versuchablauf des Mastdurchganges an der FAL sowie die entnommenen Proben sind in **Tab. 39** tabellarisch dargestellt.



Tab. 39: Versuchsdurchführung und Beprobungsplan

Ver- suchstag	Datum	Bemerkung	Matrix	Menge
0	16.07.2001	Einstellung der Tiere in Stoffwechselkäfige (Probenahme zur Erfassung des Grund- status)	Blut Urin Kot	20 30 mL 50-100 mL 20-30 g
1-10	17.07.- 26.07.2001	1. Medikationsphase (Haltung der Tiere in Stoffwechselkäfigen) tägliche Probenahme	Urin Kot	50-100 mL 20-30 g
4, 10	20./26.07. 2001	Probenahme	Blut	20 30 mL
11-21	27.07.- 05.08.2001	Medikationspause (Haltung der Tiere außerhalb der Stoffwechselkäfige)	--	--
21	06.08.2001	erneute Einstellung der Tiere in Stoffwechselkäfige	Blut Urin Kot	20 30 mL 50-100 mL 20-30 g
22-31	06.08.- 16.08.2001	2. Medikationsphase (Haltung der Tiere in Stoffwechselkäfigen) tägliche Probenahme	Urin Kot	50-100 mL 20-30 g
25, 31	10./16.08. 2001	Probenahme	Blut	20 30 mL
31	16.08.2001	Schlachtung eines Tieres direkt nach Medikationsende	Blut Urin Kot Leber Niere Muskulatur Knochen	20 30 mL 50-100 mL 20-30 g vollständig vollständig Oberschenkel Oberschenkel
31-46	16.08.- 30.08.2001	Haltung von vier Tieren bis zum Ablauf der Wartezeit außerhalb der Stoffwechselkäfige	--	--
46	30.08.2001	Schlachtung der Tiere	Blut Urin Kot Leber Niere Muskulatur Knochen	20 30 mL 50-100 mL 20-30 g vollständig vollständig Oberschenkel Oberschenkel

## 7.5 Methodenentwicklung

### 7.5.1 Chromatographische Bestimmung

Zur Entwicklung der Gradientenmethode wurden Standardlösungen aus CTC, e-CTC, iso-CTC und Anhydro-CTC ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) einzeln sowie auch als Mischlösung in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v), pH 2,8 mit der in **Kap. 7.2.1** beschriebenen Gerätekombination chromatographisch unter Einsatz von Ameisensäure und Acetonitril als Fließmittel (Fließmittel **A**:  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCOOH}$

(89,5/10/0,5 (v/v/v); **B**: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (39,5/60/0,5 (v/v/v)) untersucht. Der unter Verwendung der C-18-HPLC-Säule YMC-ODS-AM (150 x 3 mm, 3 µm; RSC Chromatographie/Reinhardshagen) entwickelte und optimierte Gradientenverlauf ist in **Tab. 40** aufgeführt.

Tab. 40: Zeitlicher Verlauf des Ameisensäure-Acetonitril-Gradienten

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	90	10
1,5	80	20
12	60	40
15	40	60
18	0	100
22	0	100
25	90	10
29	90	10

Zur Auswahl der chromatographischen Trennsäule wurden die in **Tab. 41** aufgeführten RP-Säulen auf ihre Eignung zur Trennung von CTC sowie der Abbau- und Umwandlungsprodukte hin untersucht. Hierzu wurden Mischstandardlösungen aus CTC, e-CTC, iso-CTC und Anhydro-CTC ( $\beta = 10$  mg/L) in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v), pH 2,8 mit der in **Tab. 40** dargestellten Gradientenmethode jeweils dreimal chromatographisch untersucht.

Tab. 41: Eingesetzte Reversed-Phase-HPLC-Säulen

Bezeichnung	Phase	End-capping	Dimension [mm]	Partikel-/Porengröße	Hersteller
YMC-ODS-AM	C 18	unpolar	150 x 3	3 µm, 120 Å	YMC Europe/Schermbeck
RSC-Gel C 18 Aq	C 18	polar	250 x 4	5 µm, 120 Å	RSC/Reinhardshagen
RSC-Gel 120 C 18 L	C 18	unpolar	125 x 4	5 µm, 120 Å	RSC/Reinhardshagen
YMC-Pack Phenyl	Phenyl	unpolar	150 x 2,1	3 µm, 120 Å	YMC Europe/Schermbeck

Zur Ermittlung der UV-Absorptionsmaxima unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen wurden mittels UV-Detektion der in **Kap. 7.2.1** beschriebenen Gerätekombination die UV-Spektren von CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC, injiziert als Mischlösung ( $\beta = 10$  mg/L) in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v), pH 2,8, im Wellenlängenbereich von 200-400 nm aufgenommen.

Zur Ermittlung des Fragmentierungsmusters bei der massenspektrometrischen Detektion mit dem Triple Quadrupol-System erfolgte die Aufnahme von Precursor- und Produkt-Ionen-Scans im Bereich von  $m/z$  100-800 und  $m/z$  60-500 durch Direktinjektion von Standardlösungen über eine Spritzenpumpe (Havard Apparatus von Applied Biosystems/Darmstadt) mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 µL/min. Die hierzu eingesetzten Standardlösungen (10 mg/L) wurden zur Annäherung an die HPLC-Elutionsbedingungen durch Verdünnung der Stammlösungen mit Fließmittel A/Fließmittel B (50/50) (v/v) hergestellt. Anschließend erfolgte für die Messung im MRM-Modus die Optimierung der Einstellungen im Interface (Erzeugung des Precursor-Ions) sowie der Kollisionsenergien (Erzeugung der Produkt-Ionen). Die hierbei erhaltenen optimalen Parameter sind in der Analysenvorschrift in **Kap. A. 9** aufgeführt.

## 7.5.2 Stabilität von CTC und e-CTC in Lösung

Zur Untersuchung der Stabilität und der Epimerisierungsrate von CTC wurde zunächst eine Standardlösung von CTC in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v) ( $\beta = 10$  mg/L) bei Temperaturen von 5 °C, 25 °C und 40 °C über einen Zeitraum von 60 h aufbewahrt und die Konzentration mittels HPLC-UV bei einer Wellenlänge von 275 nm in Zeitintervallen von 3 h bestimmt. Zusätzlich wurde eine Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC im Verhältnis 1:1 in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v) ( $\beta = 10$  mg/L) bei einer Temperatur von 5 °C über einen Zeitraum von 60 h aufbewahrt und ebenso wie bei den Einzelstandardlösungen die Konzentrationen mit HPLC-UV in Intervallen von 3 h ermittelt. Zur Untersuchung der Langzeitstabilität von CTC und e-CTC in Kalibrierlösungen (s. **Kap. 7.3.5**) wurden aliquotierte Mischstandardlösungen aus CTC und e-CTC im Verhältnis 1:1 in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v) ( $\beta = 10$  mg/L) bei einer Temperatur von -80 °C über einen Zeitraum von sechs Monaten gelagert. In Zeitabständen von zwei Wochen wurde ein Aliquot entnommen und die Konzentration von CTC und e-CTC mit HPLC-UV ermittelt.

## 7.5.3 Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung

### 7.5.3.1 Auswahl der SPE-Materials

Zur Auswahl eines geeigneten SPE-Materials für die Bestimmung von CTC und e-CTC wurden zu 10 mL EDTA-McIlvain-Puffer 200  $\mu$ L CTC-Standardlösungen der Massenkonzentrationen 10 mg/L und 100 mg/L zudotiert und mit den in **Tab. 42** angegebenen SPE-Kartuschen Festphasenextraktionen durchgeführt. Alle Kartuschen wurden zunächst mit 3 mL Methanol und 3 mL bidest. H<sub>2</sub>O konditioniert. Anschließend erfolgte die Aufgabe der EDTA-McIlvain-Puffer-CTC-Lösung und ein Waschschritt, bestehend aus 2 x 3 mL 5%igem Methanol. Die Elution erfolgte fraktioniert mit 3 x 2 mL Methanol, die Fraktionen wurden im TurboVap bei einer Temperatur von 30 °C eingengt und der Rückstand mit 200  $\mu$ L MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) wieder aufgenommen.

Tab. 42: Untersuchte SPE-Phasen

Bezeichnung	Phase	Festbettmenge [mg]	Dimension der Kartusche [mL]	Hersteller
Chromabond Tetracycline	C 18	500	6	Macherey & Nagel/Düren
Oasis HLB	Copolymer	200	6	Waters/Eschborn
Nexus	Copolymer	200	6	Varian/Darmstadt

### 7.5.3.2 Einfluß der Zusammensetzung des Extraktionsmittels

Zur Untersuchung des pH-Wert-Einflusses des Extraktionsmittels und des EDTA-Zusatzes auf die Wiederfindung wurden McIlvain-Puffer der pH-Werte 2, 3, 4, 5 und 6 hergestellt, indem zu 100 mL McIlvain-Stammlösung 800 mL bidest. H<sub>2</sub>O gegeben wurde, dem EDTA-McIlvain-Puffer zusätzlich 3,72 g (0,01 mol/L) EDTA. Der pH-Wert der Pufferlösungen wurde mit HCl (6 mol/L) oder NaOH (2 mol/L) eingestellt und die Lösung mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt. Zu 10 mL des jeweiligen Puffers wurden 200  $\mu$ L einer CTC-Standardlösung ( $\beta = 10$  mg/L) zudotiert und die SPE wie folgt durchgeführt: Die Kartuschen wurden mit 3 mL Methanol und 3 mL bidest. H<sub>2</sub>O konditioniert, anschließend die dotierten Pufferlösungen auf die Kartuschen aufgegeben und die Kartuschen 2 x mit 3 mL 5%igem

Methanol gewaschen. Die Elution der Analyten erfolgte mit 3 mL Methanol. Das erhaltene Eluat wurde im TurboVap (s. **Kap. 7.2.6**) bei einer Temperatur von 30 °C eingengt und der Rückstand mit 200 µL MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) wieder aufgenommen.

### 7.5.3.3 Wiederfindungsstudien mit CTC und e-CTC

Zu 10 mL EDTA-McIlvain-Puffer (0,1 mol/L EDTA) wurden 200 µL von Einzelstandardlösungen der Substanzen CTC und e-CTC ( $\beta = 10$  mg/L) zudosiert und die SPE wie unter **Kap. 7.5.3.5** beschrieben durchgeführt.

### 7.5.3.4 Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung von CTC und e-CTC

Um zu überprüfen, in welchem Schritt der Probenvorbereitung eine Epimerisierung stattfindet, wurden anhand von Standardlösungen von CTC und e-CTC Teilschritte des SPE-Verfahrens durchgeführt und die resultierenden Gehalte der jeweiligen Epimerenpaare mittels HPLC-UV (s. **Kap. 7.2.1**) ermittelt. Die Durchführung der einzelnen Versuche wurde bereits in **Kap. 5.2.2.4** beschrieben (s. **Tab. 8**).

### 7.5.3.5 Zusammenfassung des SPE-Verfahrens

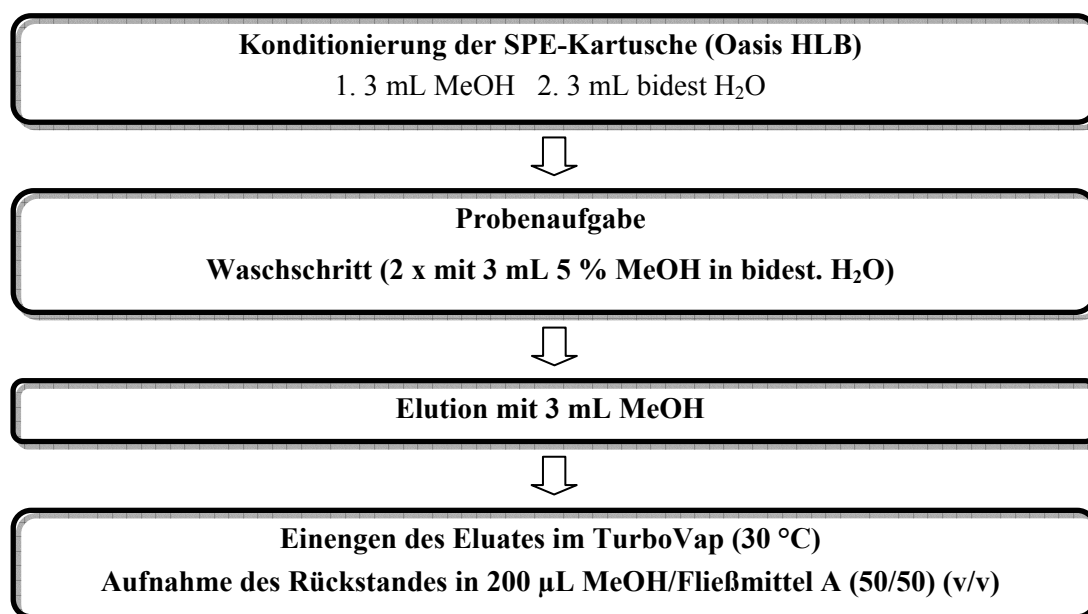


Abb. 40: Vorgehensweise bei der Festphasenextraktion

## 7.5.4 Probenvorbereitung verschiedener Matrices

Für die nachfolgend beschriebenen Wiederfindungsstudien von CTC in Urin, Plasma, Faeces, Muskulatur, Leber und Niere wurde nicht belastetes Probenmaterial aus den durchgeführten Medikationsstudien verwendet.

### 7.5.4.1 Urin, Plasma und Kot

**Urin:** Es wurden 5 mL Urin in ein 10 mL-PP-Röhrchen (Merck/Darmstadt) gegeben. Nach Zugabe

von 4 mL EDTA-McIlvain-Puffer wurde 15 Minuten bei 3300 g bei einer Temperatur von 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur SPE eingesetzt und wie unter **Kap. 7.5.3.5** beschrieben aufgearbeitet.

**Plasma:** Das für die nachfolgend beschriebenen Versuche eingesetzte Plasma wurde aus EDTA-Vollblut der im Rahmen der Medikationsstudie im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse entnommenen Blutproben der unbehandelten Kontrolltiere gewonnen. Die Gewinnung des Plasmas ist in **Kap. 7.4** beschrieben. Zur Ermittlung eines geeigneten Fällungsreagenzes für die Proteinabtrennung wurden zu 5 mL Plasma in einem verschließbaren 10 mL-PP-Röhrchen (Merck/Darmstadt) 200 µL einer CTC-Lösung ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) zudosiert und 5 mL eines Fällungsreagenzes zugegeben. Als Fällungsreagenzien wurden Acetonitril, Methanol, 6%ige  $\text{HClO}_4$  (w/w) sowie eine Mischung aus Perchlorsäure und Metaphosphorsäure eingesetzt. (6%ige  $\text{HClO}_4$  (w/w): Zu 50 g bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  werden 10 g 60%ige Perchlorsäure gegeben und mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 g aufgefüllt; 6%  $\text{HClO}_4$  (w/w) / 2%  $\text{HPO}_3$  (w/w): Zu 50 g bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  werden 4 g Metaphosphorsäure und 10 g 60%ige Perchlorsäure gegeben und mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 g aufgefüllt.) Die Proben wurden 30 min auf einem Horizontalschüttler (s. **Kap. 7.2.3**) bei 250 Schübe/min geschüttelt und danach 15 Minuten bei 3300 g und einer Temperatur von 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur pH-Wert-Einstellung für die SPE mit EDTA-McIlvain-Puffer pH 4 versetzt, indem der Überstand in ein Zentrifugenglas überführt, anschließend das PP-Röhrchen mit 5 mL EDTA-McIlvain-Puffer gespült, ebenfalls in das Zentrifugenglas überführt und schließlich weitere 20 mL EDTA-McIlvain-Puffer zugegeben wurde. Anschließend erfolgte die Festphasenextraktion nach dem allgemeinen Extraktionsverfahren (s. **Kap. 7.5.3.5**).

**Faeces:** Zur Ermittlung eines geeigneten Extraktionsmittels wurden analog **Kap. 7.5.3.2** EDTA-McIlvain-Puffer der pH-Werte 2, 3 und 4 mit 0,01 mol/L EDTA sowie EDTA-McIlvain-Puffer pH 4 mit 0,1 mol/L EDTA hergestellt, jeweils 10 mL zu mit 200 µL einer CTC-Lösung ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) dotierten Kotproben (Einwaage: 0,5 g) (Nullproben aus der Medikationsstudie an der FAL) in ein verschließbares 10 mL-PP-Röhrchen (Merck/Darmstadt) gegeben und 15 Minuten bei 260 Schübe/min auf einem Horizontalschüttler (s. **Kap. 7.2.3**) geschüttelt. Anschließend wurde 15 min bei 3300 g und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 30 mL-Zentrifugenglas gegeben. Das Pellet wurde noch zweimal mit 10 mL McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA extrahiert. Die Extrakte wurden jeweils 15 Minuten bei 260 Schübe/min auf dem Schüttler geschüttelt und anschließend 15 min bei 3300 g und 10°C zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden nochmals 10 min bei 3300 g zentrifugiert und der Überstand zur Festphasenextraktion (s. **Kap. 7.5.3.5**) verwendet.

#### 7.5.4.2 Muskulatur, Leber und Niere

**Muskulatur:** Zur *Wahl des Extraktionsmittels* wurden analog **Kap. 7.5.3.2** EDTA-McIlvain-Puffer (s. **Kap. 7.3.2**) pH 2, 3 und 4 mit 0,01 mol/L und 0,1 mol/L EDTA, McIlvain-Puffer pH 4 ohne EDTA sowie Mischungen aus Methanol und McIlvain-Puffer pH 2, 3 und 4 mit 0,1 mol/L EDTA im Verhältnis 20/80 (v/v) hergestellt. Muskulatur wurde in einer Moulinette zerkleinert, 5 g dieser zerkleinerten Matrix in ein 80 mL-Zentrifugenglas eingewogen und mit 200 µL einer CTC-Lösung ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) dotiert. Zu den Proben wurden 15 mL der oben genannten Extraktionsmittel gegeben und 1 min (nach Stoppuhr) mit dem Ultraturrax bei 8000 U/min homogenisiert. Die homogenisierte Probe wurde 25 min bei 3300 g zentrifugiert (gekühlte Zentrifuge: 10 °C). Das Pellet wurde mit weiteren 15 mL Extraktionsmittel erneut 1 min mit dem Ultraturrax bei 8000 U/min homogenisiert und 25 min bei 3300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und wiederum 15 min bei 3300 g zentrifugiert.

Der so erhaltene Probenextrakt wurde mittels SPE gereinigt und aufkonzentriert (s. **Kap. 7.5.3.5**).

**Leber:** Zur *Ermittlung eines geeigneten Extraktionsmittels* wurden dieselben Extraktionsmittel wie für die Aufarbeitung von Muskulatur untersucht (s. oben). Die Probenzerkleinerung und weitere Aufarbeitung entsprach der von Muskulatur. Die Aufreinigung mittels SPE erfolgte nach dem allgemeinen Verfahren (s. **Kap. 7.5.3.5**). Die *Überprüfung von Matrixeffekten bei der massenspektrometrischen Detektion* erfolgte durch jeweils dreifache Aufarbeitung nicht belasteter Leberproben nach dem Standardverfahren (s. Analysenvorschrift in **Kap. A. 9** im Anhang). Die Aufnahme des eingengten Eluates der SPE wurde jedoch nicht in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v), sondern in einer CTC-Standardlösung in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v) aufgenommen. Die Konzentration in den Meßproben entsprachen Gehalten von 20 µg/kg, 100 µg/kg und 800 µg/kg. Diese Matrixstandards wurden mit den Solventstandards verglichen und damit der Matrixeinfluß ermittelt.

**Niere:** Zur *Ermittlung eines geeigneten Extraktionsmittels* wurden dieselben Extraktionsmittel wie für die Aufarbeitung von Muskulatur untersucht (s. vorne). Die Probenzerkleinerung und weitere Aufarbeitung entsprach der von Muskulatur. Die Aufreinigung mittels SPE erfolgte nach dem allgemeinen Verfahren (s. **Kap. 7.5.3.5**).

### 7.5.4.3 Optimierung des Extraktionsverfahrens für Muskulatur

**Extraktion aus der Matrix:** Zur *Ermittlung der notwendigen Anzahl von Extraktionsschritten* erfolgte zum einen die Aufarbeitung von mit 200 µL einer CTC-Lösung ( $\beta = 10$  mg/L) dotierten Muskulaturproben, zum anderen wurden CTC-haltige Proben untersucht, indem alle Proben dreimal mit 15 mL des Extraktionsmittels MeOH/EDTA-McIlvain-Puffer pH 4 (0,01 mol/L) (20/80, v/v) extrahiert wurden und die drei einzelnen erhaltenen Extrakte nach dem SPE-Verfahren (s. **Kap. 7.5.3.5**) weiter bearbeitet worden sind. Als Probenmaterial für die Dotierungsversuche diente Muskulatur aus der Medikationsstudie in Haus Düsse, als CTC-haltige Proben wurde Muskulatur des Tieres 95 der Medikationsstudie an der FAL Braunschweig eingesetzt.

**SPE-Verfahren:** Zur *Optimierung der SPE-Bedingungen* erfolgte die Dotierung von 36 nicht belasteten Muskulaturproben mit 200 µL einer CTC-Standardlösung ( $\beta = 10$  mg/L). Die Proben wurden wie oben beschrieben mit Methanol/McIlvain-Puffer pH 4 (20/80) (v/v) als Extraktionsmittel aufgearbeitet und nach dem SPE-Verfahren (s. **Kap. 7.5.3.5**) aufgereinigt mit Ausnahme der Waschlösung, für dessen Optimierung Methanol/Wasser-Mischungen der Verhältnisse 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100 hergestellt und eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt wurde.

### 7.5.4.4 Knochen

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche dienten als Probenmaterial CTC-haltige Knochen aus der Medikationsstudie in Haus Düsse sowie an der FAL. Zur Zerkleinerung wurden diese zunächst von Fleischresten befreit, mit einer Knochensäge in der Pathologie des SVUA Detmold in Scheiben gesägt, und am SVUA Krefeld mit einer Knochenmühle (s. **Kap. 7.2.2**) gemahlen. Die Proben wurden beim Transport gekühlt und bis zur Analyse im SVUA Detmold tiefgefroren.

Zur *Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels* wurden EDTA-McIlvain-Puffer pH 2, 3 und 4 mit 0,01 mol/L EDTA analog **Kap. 7.5.3.2** hergestellt sowie HCl (1 mol/L) als Extraktionsmittel eingesetzt. 1 g mit einer Knochenmühle (s. **Kap. 7.2.2**) gemahlene Knochen (Medikationsstudie im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse) wurden in ein 10 mL verschließbares Reagenzglas aus Polypropylen ge-

geben. Nach Zugabe von 15 mL des Extraktionsmittels wurde die Probenlösung über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde 45 min bei 260 Schübe/min auf einem Horizontalschüttler (s. **Kap. 7.2.3**) geschüttelt und der Extrakt über einen Faltenfilter (595 ½ von Schleicher & Schüll/Dassel) in ein 10 mL-Zentrifugenglas filtriert. Das PP-Röhrchen wurde mit 6 mL bidest. H<sub>2</sub>O gespült und über den Faltenfilter zum Probenextrakt gegeben. Im Falle des Einsatzes von 1 mol/L HCl als Extraktionsmittel wurde anschließend der pH-Wert mit 2 mol/L NaOH auf ca. 4 eingestellt. Der durch 15-minütige Zentrifugation (gekühlte Zentrifuge: 10 °C) bei 3300 g erhaltene Überstand aller Filtrate wurde zur Festphasenextraktion verwendet.

Die Überprüfung der *Stabilität von CTC und e-CTC im salzsauren Extraktionsmittel* erfolgte durch Lagerung einer CTC-Einzelstandardlösung ( $\beta = 10$  mg/L) und einer Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC ( $\beta = 10$  mg/L) in 1 mol/L HCl bei einer Temperatur von 5 °C über einen Zeitraum von 12 h und einer Konzentrationsbestimmung in Intervallen von 1 h mittels HPLC-UV (275 nm).

## 7.6 Validierung des Analysenverfahrens

Die nachfolgend beschriebenen Validierungsuntersuchungen wurden mit der in **Kap. 7.2.1** angegebenen HPLC-Anlage mit der Kopplung aus UV- und massenspektrometrischen Detektion (MS/MS) durchgeführt. Die beschriebenen Validierungsparameter wurden sowohl für die UV- als auch für die MS/MS-Detektion ermittelt. Die Aufarbeitung von Muskulaturproben erfolgte nach der Beschreibung in **Kap. 7.5.4.2**. Um für die Validierung ausreichend unbelastetes Probenmaterial zu erhalten, wurde Fleisch von einem Bio-Metzger bezogen und vorab auf nachweisbare CTC-Rückstände geprüft.

### 7.6.1 Linearer Bereich

Zur Bestimmung des linearen Bereiches für das HPLC-UV-Verfahren wurden Kalibrierlösungen aus CTC und e-CTC, siehe **Kap. 7.3.5**, der Konzentrationen 0,1 mg/L; 0,18 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L und 100 mg/L hergestellt und zehnfach analysiert. Für die massenspektrometrische Detektion wurden Konzentrationen von 0,001 mg/L; 0,0025 mg/L; 0,005 mg/L; 0,01 mg/L; 0,02 mg/L; 0,04 mg/L; 0,05 mg/L; 0,06 mg/L; 0,08 mg/L; 0,1 mg/L; 0,12 mg/L; 0,14 mg/L; 0,16 mg/L; 0,18 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L und 100 mg/L ausgewählt.

### 7.6.2 Kalibriergeraden

Der Arbeitsbereich mit der UV-Detektion wurde nach Überprüfung der Linearität mittels linearer Regression mit einer Massenkonzentration von 0,18 mg/L bis 100 mg/L festgelegt. Zur Ermittlung der Kalibriergeraden wurde eine Zehnfach-Bestimmung von zehn über den Arbeitsbereich verteilte Konzentrationen von 0,18 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L und 100 mg/L durchgeführt.

Die Regressionsanalyse ergab für den gewählten vorläufigen Arbeitsbereich mit der massenspektrometrischen Detektion keinen linearen Zusammenhang, so daß der Arbeitsbereich in drei Teilbereiche aufgeteilt wurde. Zur Ermittlung der drei Kalibriergeraden wurden mit jeweils sieben über die Arbeitsteilbereiche verteilte Konzentrationen von 0,005 mg/L bis 0,08 mg/L (0,005 mg/L; 0,01 mg/L; 0,02 mg/L; 0,04 mg/L; 0,05 mg/L; 0,06 mg/L; 0,08 mg/L), von 0,1 mg/L bis 0,5 mg/L (0,1 mg/L; 0,12

mg/L; 0,14 mg/L; 0,16 mg/L; 0,18 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L) und von 1 mg/L bis 50 mg/L (1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L; 7,5 mg/L; 10 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L) zehn Bestimmungen durchgeführt.

### 7.6.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden Kalibrierlösungen sowie mit CTC dotierte Muskulaturproben in der Nähe der Nachweisgrenze jeweils sechsfach analysiert. Die Konzentrationen der Standardlösungen betrugen 0,0025 mg/L; 0,005 mg/L; 0,075 mg/L; 0,01 mg/L; 0,025 mg/L; 0,05 mg/L; 0,075 mg/L; 0,1 mg/L und 0,2 mg/L, die Muskulaturproben wurden mit 200 µL von CTC-Standardlösungen der angegebenen Konzentrationen auf Gehalte von 0,1 µg/kg; 0,2 µg/kg; 0,3 µg/kg; 0,4 µg/kg; 0,8 µg/kg; 2 µg/kg; 3 µg/kg; 4 µg/kg und 8 µg/kg dotiert und nach dem im Anhang in der Analysenvorschrift beschriebenen Verfahren aufgearbeitet.

### 7.6.4 Selektivität

#### 7.6.4.1 Selektivitätstest durch Peaklöschung nach alkalischer Behandlung

Zur Löschung des CTC- und e-CTC-Peaks wurde Muskulatur (Tier 95, FAL) zunächst nach der im Anhang beschriebenen Analysenvorschrift aufgearbeitet, wobei der Endrückstand des eingengten Eluates der SPE nicht in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v), sondern in 100 µL MeOH + 100 µL 1%ige NaOH (w/w), pH 12 aufgenommen und anschließend 30 Minuten im Wasserbad bei 60°C erwärmt wurde. Zum Vergleich wurde dieselbe Muskulaturprobe nach der allgemeinen Analysenvorschrift aufgearbeitet und analysiert.

#### 7.6.4.2 Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten

Zum Vergleich der Retentionszeiten des CTC- und e-CTC-Peaks wurde Muskulatur nach der im Anhang beschriebenen Analysenvorschrift aufgearbeitet und analysiert. Zusätzlich wurde eine Kalibrierlösung der Massenkonzentration 1 mg/L und mit der in **Kap. 7.2.1** beschriebenen HPLC-UV-MS/MS-Gerätekombination chromatographiert.

#### 7.6.4.3 Selektivitätstest durch Vergleich der UV- und MS-Spektren

Zum Vergleich der UV- und MS-Spektren dienten die in **Kap. 7.6.4.2** angegebene Probe und Standardlösung. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei der UV-Detektion in einem Wellenlängenbereich von 250 nm bis 400 nm, bei der MS/MS-Detektion wurde ein Produkt-Ionen-Scan des Precursor-Ions mit  $m/z$  479 im Massenbereich von  $m/z$  100 bis  $m/z$  500 aufgenommen.

### 7.6.5 Richtigkeit

Zur Ermittlung der Wiederfindungsfunktion wurden CTC-Standardlösungen dem kompletten Analysenverfahren unterzogen. Dazu wurden zu 9 mL des Extraktionsmittels MeOH/EDTA-McIlvaine-Puffer, pH 4 (0,01 mol/L) (20/80) (v/v) 200 µL von CTC-Lösungen der Konzentrationen 0,025, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 und 10 mg/L zudosiert, nach der allgemeinen Analysenvorschrift aufgearbeitet und mit HPLC-UV-MS/MS vermessen. Es wurde jeweils eine siebenfache Bestimmung durchgeführt. Für die UV-Detektion ergaben sich aufgrund der Bestimmungsgrenze von CTC und e-CTC von 0,18 mg/L



fünf Konzentrationstufen von 0,5 mg/L bis 10 mg/L, für die massenspektrometrische Detektion lagen alle sieben Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze. Anschließend wurde die Wiederfindungsfunktion für Muskulatur aufgestellt, indem zu jeweils 5 g Muskulatur 200 µL von CTC-Standardlösungen der Konzentrationen 0,025, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 und 10 mg/L zudosiert, nach der Analysenvorschrift im Anhang aufgearbeitet und mittels HPLC-UV-MS/MS vermessen wurde.

### **7.6.6 Matrixbedingte Signalbeeinflussung bei der massenspektrometrischen Detektion**

#### **7.6.6.1 Matrixkalibrierung**

Zur Überprüfung von suppressiven Effekten bei der MS/MS-Detektion wurde nicht belastete Muskulatur in fünfzehn Aliquote aufgeteilt und nach der im Anhang beschriebenen Vorschrift aufgearbeitet, wobei der Endrückstand des eingengten Eluates der SPE nicht in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v), sondern in CTC-Standardlösungen in Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v) der Massenkonzentrationen 0,25 mg/L; 1 mg/L und 10 mg/L, entsprechend einer Fünf-Fach-Bestimmung, aufgenommen wurde.

#### **7.6.6.2 Kontinuierliche Nachsäulen-Injektion von CTC**

Zur weiteren Aufdeckung von Matrixeffekten erfolgte die kontinuierliche Zuführung einer CTC-Standardlösung zum HPLC-Fluß während des gesamten Chromatographielaufes nach Injektion einer unbelasteten Muskulaturprobe. Der Gradientenverlauf sowie die Flußrate entsprachen der allgemeinen Analysenvorschrift im Anhang. Über ein T-Stück wurde dem HPLC-Fluß „post-column“ eine CTC-Standardlösung der Massenkonzentration 10 mg/L über eine Spritzenpumpe (Havard Apparatus der Firma Applied Biosystems/Darmstadt) mit einer Flußrate von 2,5 µL/min zugeführt. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte durch Aufnahme eines Produktions-Scans im Massenbereich  $m/z$  von 100 bis  $m/z$  500 des Precursor-Ions  $m/z$  479.

### **7.6.7 Präzision**

#### **7.6.7.1 Meßpräzision**

Zur Ermittlung der Meßpräzision wurden fünf Muskulaturproben der Tiere 93-97 aus der Medikationsstudie in der FAL in Braunschweig nach der allgemeinen Analysenvorschrift im Anhang aufgearbeitet und achtfach mittels HPLC-UV-MS/MS chromatographisch vermessen.

#### **7.6.7.2 Methodenpräzision**

Zur Ermittlung der Methodenpräzision wurden die Muskulaturproben der Tiere 93-97 aus der Medikationsstudie an der FAL in Braunschweig in jeweils acht Aliquote von 5 g aufgeteilt, nach der allgemeinen Analysenvorschrift im Anhang aufgearbeitet und mittels HPLC-UV-MS/MS vermessen.

---

## 7.6.8 Validierungsparameter für Urin, Kot, Plasma, Knochen, Leber und Niere

Analog der in den vorangehenden Kapiteln beschriebene Vorgehensweise sind für Urin, Kot, Plasma, Knochen, Leber und Niere einzelne Validierungsparameter für die MS/MS-Detektion ermittelt worden. Als Probenmaterial diente mit Ausnahme von Faeces, wofür die Nullprobe der Medikationsstudie an der FAL in Braunschweig eingesetzt wurde, die unbelasteten Proben der Kontrolltiere aus der Medikationsstudie im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurde zu 5 mL Urin, 5 mL Plasma, 5 g Niere und 5 g Leber 200  $\mu$ L CTC-Standardlösung der Massenkonzentrationen 250  $\mu$ g/L und 2,5 mg/L auf Gehalte von 10  $\mu$ g/kg und 100  $\mu$ g/kg zudotiert und nach dem allgemeinen Verfahren analysiert. Im Falle von Faeces wurde zu 0,5 g Probenmaterial 400  $\mu$ L CTC-Standardlösung der Konzentrationen 62,5 mg/L und 625 mg/L auf Gehalte von 50  $\mu$ g/kg und 500  $\mu$ g/kg zudotiert und entsprechend aufgearbeitet und vermessen. Für alle Matrices erfolgte für jede Konzentrationsstufe eine sechsfache Bestimmung. Zur Ermittlung der Validierungsparameter für Knochen wurde CTC-haltiges Probenmaterial aus der Medikationsstudie in Haus Düsse eingesetzt, wobei die Probeneinwaage 1 g betrug. Anhand der hierbei erhaltenen Analysenergebnisse erfolgte die Berechnung der Methodenpräzision als Mittelwert beider Konzentrationsstufen. Der Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze lag das Signal-Rausch-Verhältnis zugrunde, wobei analog **Kap. 5.3.2** die Nachweisgrenze das dreifache und die Bestimmungsgrenze das neunfache Grundrauschen beträgt. Die Ermittlung des Signal-Rausch-Verhältnisses erfolgte anhand von jeweils zwölf ausgewählten Chromatogrammen der untersuchten Proben der Medikationsstudie im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse.

## 7.7 Identifizierung tautomerer Verbindungen von CTC

Zur Überprüfung, aus welchen Substanzen die weitere in Realproben auftretende Verbindung entsteht, wurden Einzelstandardlösungen aus CTC, e-CTC und iso-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) ( $\beta$  = 10 mg/L) bei einer Temperatur von 80 °C zwei Stunden im Wasserbad erwärmt und anschließend chromatographisch mittels HPLC-UV-MS/MS vermessen. Zur Identifizierung tautomerer Verbindungen mit HPLC-UV wurde eine Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC in 1 mol/L HCl ( $\beta$  = 10 mg/L) nach einer Lagerung von 12 Stunden bei einer Temperatur von 5 °C chromatographisch vermessen. Zur Identifizierung tautomerer Verbindungen von CTC mittels MS/MS wurde eine Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) ( $\beta$  = 10 mg/L) bei einer Temperatur von 80 °C zwei Stunden im Wasserbad erwärmt. Die so erhaltene Lösung enthält neben CTC, e-CTC, iso-CTC und e-iso-CTC auch die zusätzlich in Realproben auftretende isomere Verbindung. Diese Lösung wurde chromatographisch mit LC-MS/MS durch Aufnahme von Produkt-Ionen-Scans von m/z 100-500 des Precursor-Ions mit m/z 479 bei verschiedenen Kollisionsenergien von 25 eV, 30 eV, 35 eV und 40 eV vermessen.

## 7.8 *In vitro*-Bildung von Metaboliten des CTC

Zur Untersuchung, von Umwandlungsreaktionen wurden analog **Kap. 7.5.2** Einzelstandardlösungen von CTC-, e-CTC-, iso-CTC-, Anhydro-CTC- und e-Anhydro-CTC-Lösungen ( $\beta$  = 10 mg/L) in MeOH/Fließmittel A (50/50) (pH 2,8) bei einer Temperatur von 40 °C über einen Zeitraum von 60 h auf-

bewahrt und in Zeitintervallen von einer Stunde mit HPLC-UV-MS/MS chromatographisch vermessen.

## 7.9 Antibiotische Aktivitäten

### 7.9.1 Agar-Diffusionstest

**Nährboden:** Zur Nährbodenherstellung wurde ein Trockennährboden der Zusammensetzung: 3,45 g Fleischpepton; 3,45 g Caseinpepton; 5,1 g NaCl und 13 g Agar verwendet. Der Trockennährboden wurde in 1 L bidest. H<sub>2</sub>O aufgelöst und zur Pufferung 0,1 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Einstellung der pH-Werte (6; 7,2; und 8) mit 0,1 mol/L HCl oder 0,1 mol/L NaOH. Der pH-Wert der Nährböden wurde nach dem zur Sterilisation durchgeführten Autoklavieren (15 Minuten, T = 121 °C) überprüft. Zur Vorbereitung des Nährbodens auf den DPT wurden 500 mL des so verflüssigten Nährbodens auf eine Temperatur von 50 °C abgekühlt und mit 0,5 mL einer Sporensuspension unter Schütteln gleichmäßig vermischt und 15 mL Petrischalen gegossen, so daß nach dem Erstarren eine gleichmäßige Schichtdicke von 2 mm vorhanden war. Nach dem Erstarren des Nährbodens wurden die Petrischalen sofort bei einer Temperatur von 3 °C bis 5 °C gekühlt und innerhalb von drei Tagen verwendet.

**Testkeim und Sporensuspension:** Als Testkeim wurde *Bacillus subtilis* BGA (Merck/Darmstadt) verwendet. (Die Testkeime sind einer Überprüfung der Sensibilität sowie der Resistenzeigenschaften unterzogen worden.) Zur Herstellung der Sporensuspension wurde ein Nährboden mit der oben genannten Zusammensetzung auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und nach Überschichten mit 1 mL der bezogenen Keimsuspension zehn Tage bei einer Temperatur von 30 °C bebrütet. Danach wurde der Testkeim mit steriler physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt. Die Abschwemmung wurde 10 Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, dem Sediment nochmals NaCl-Lösung zugegeben und 10 Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und die Suspension 30 Minuten bei einer Temperatur von 70 °C erhitzt. Die so gewonnene Sporensuspension wurde mit NaCl-Lösung so verdünnt, daß eine Keimdichte von 10<sup>7</sup>/mL resultierte. Die Überprüfung der Keimdichte erfolgte als kulturelle Keimzählung im Oberflächenverfahren.

**Dreiplattentest (DPT):** Zur Durchführung des Dreiplattentestes nach der Agar-Loch-Methode wurde mit einem Probenstanzgerät ein Loch mit einem Durchmesser von 8 mm in die Agarplatten gestanzt und 25 µL einer methanolischen Standardlösung von CTC, e-CTC, Anhydro-CTC, e-Anhydro-CTC und iso-CTC (β = 100 mg/L) in das Loch gegeben. Die mit der Standardlösung beschickten Agarplatten wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 30 °C 18 bis 24 Stunden bebrütet.

**Auswertung:** Die Hemmzone wurde als Radius in mm angegeben und zwischen dem Lochrand und der Wachstumsgrenze ausgemessen. Vollständige Wachstumshemmung mit einer Hemmzone von mindestens 2 mm ist als positiver Befund, eine Hemmzone von 1 mm bis 2 mm als zweifelhafter Befund anzusehen.

### 7.9.2 Abbaureaktionen während des Agar-Diffusionstestes

Zur zeitabhängigen Untersuchung von Abbaureaktionen während des DPT wurde der Test mit methanolischen Standardlösungen von CTC, e-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC und unterschiedli-

che Bebrütungszeiten durchgeführt, indem zu Agar-Platten der pH-Werte 6; 7,2 und 8, siehe **Kap. 7.9.1**, 25 µL methanolischer Einzellösung von CTC, e-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC einer Konzentration von 100 mg/L gegeben und die Agar-Platten bei einer Temperatur von 30 °C über Zeiträume von 1, 2, 3, 18, 20, 22 und 24 Stunden bebrütet wurden. Nach Ausmessen der Hemmhöfe erfolgte die Extraktion der Agar-Platten mit Methanol. Es wurden zweimal 50 µL Methanol in die ausgestanzten Löcher gegeben und anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 mL) überführt. Danach wurde der Agar, bei dem ein Hemmhof entstanden ist, ausgeschnitten und ebenfalls in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Nach weiterer Zugabe von 900 µL Methanol wurde die so erhaltene Agar-Methanol-Mischung gut geschüttelt. Nach Abzentrifugieren des Agars bei 4100 g für 15 min. wurden die Extrakte ohne weitere Aufarbeitung mittels LC-MS/MS vermessen.

## 7.10 Methodenentwicklung zur quantitativen Bestimmung weiterer CTC-Metabolite

### 7.10.1 Herstellung einer Standardlösung aus iso-CTC und e-iso-CTC

Zur Herstellung einer Mischstandardlösung aus iso-CTC und e-iso-CTC wurde eine Standardlösung von iso-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) ( $\beta$  = 100 mg/L) hergestellt, in verschraubbare PP-Röhrchen (14 mL, 16 x 100 mm; Merck/Darmstadt) gefüllt, verschraubt und 90 Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von 60 °C erwärmt. Die so erhaltene Mischstandardlösung enthielt iso-CTC und e-iso-CTC in einem Massenverhältnis von etwa 1:1. Ein Teil der iso-CTC-Lösung wurde nicht erwärmt, um die Konzentration von iso-CTC in dem epimerisierten Standard ermitteln zu können. Beide Lösungen wurden 1:10 verdünnt und mittels HPLC-UV-MS/MS vermessen. Der Gehalt an e-iso-CTC im epimerisierten Standard ergibt sich als Differenz des iso-CTC-Gehaltes in beiden Lösungen. Durch Verdünnen dieses epimerisierten Standards kann dann eine Kalibriergerade von iso-CTC und e-iso-CTC aufgenommen werden.

### 7.10.2 Linearer Bereich

**iso-CTC und e-iso-CTC:** Zur Bestimmung des linearen Bereiches für das HPLC-UV-Verfahren wurden Kalibrierlösungen aus iso-CTC und e-iso-CTC, siehe **Kap. 7.10.1**, der Konzentrationen 0,05 mg/L; 0,1 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L und 10 mg/L hergestellt und achtfach analysiert. Für die massenspektrometrische Detektion wurden Konzentrationen von 0,01 mg/L; 0,025 mg/L; 0,05 mg/L; 0,1 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L und 10 mg/L ausgewählt.

**Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC:** Zur Bestimmung des linearen Bereiches für das HPLC-UV-Verfahren wurden Kalibrierlösungen aus Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC im Massenverhältnis 1:1 in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) der Konzentrationen 0,025 mg/L; 0,05 mg/L; 0,1 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L und 10 mg/L hergestellt und achtfach analysiert. Für die massenspektrometrische Detektion wurden Konzentrationen von 0,01 mg/L; 0,025 mg/L; 0,05 mg/L; 0,1 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L und 10 mg/L ausgewählt.

### 7.10.3 iso-CTC und e-iso-CTC als Summenparameter

**Standardlösungen:** Zur Untersuchung, unter welchen Bedingungen eine vollständige Isomerisierung von CTC und e-CTC stattfindet, wurden Mischstandardlösungen aus CTC und e-CTC in MeOH/(1%ige NaOH, w/v) (50/50) (v/v) (pH 11,5) (jeweils:  $\beta = 10$  mg/L) über einen Zeitraum von 30 Minuten bei Temperaturen von 60, 70, 80 und 90 °C im Wasserbad erwärmt ( $n = 5$ ) und chromatographisch vermessen. Zum Vergleich wurde eine entsprechende Mischstandardlösung ohne Erwärmen ( $\beta = 10$  mg/L) sowie eine Mischstandardlösung aus CTC und e-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) ( $\beta = 10$  mg/L) vermessen ( $n = 5$ ).

**Muskulatur:** Die Muskulaturproben der Versuchstiere 1, 3, 7, 9 und 12 der Medikationsstudie im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse sowie die des Tieres 95 aus der Medikationsstudie an der FAL wurden zunächst nach der allgemeinen Analysenvorschrift (siehe Anhang) aufgearbeitet. Das Eluat der Festphasenextraktion wurde in 200  $\mu$ L Methanol aufgenommen und der so erhaltene Probenextrakt halbiert. Zu der einen Hälfte der Probenextrakte wurden 100  $\mu$ L Fließmittel A, zur anderen Hälfte der Proben wurden zur alkalischen Behandlung 100  $\mu$ L 1%ige NaOH (w/v) (pH 11,5) gegeben. Die alkalisch behandelten Proben wurden 30 Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von 60 °C erwärmt. Alle erhaltenen Extrakte wurden mittels HPLC-UV-MS/MS chromatographisch vermessen.

### 7.10.4 Wiederfindung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC

Zu 10 mL EDTA-McIlvain-Puffer, pH 4 (0,1 mol/L EDTA) wurden 200  $\mu$ L von Einzelstandardlösungen der Substanzen iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC ( $\beta = 10$  mg/L) zudosiert und die SPE wie unter **Kap. 7.5.3.5** beschrieben durchgeführt.

### 7.10.5 Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC

Um zu überprüfen, in welchem Schritt der Probenvorbereitung eine Epimerisierung stattfindet, wurden anhand von Standardlösungen von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC Teilschritte des SPE-Verfahrens durchgeführt und die resultierenden Gehalte der jeweiligen Epimerenpaare mittels HPLC-UV (s. **Kap. 7.2.1**) ermittelt. Die Quantifizierung von e-iso-CTC erfolgte durch externe Kalibrierung mit einer iso-CTC-Standardlösung bei einer Wellenlänge von 275 nm. Die Durchführung der einzelnen Versuche wurde bereits in **Kap. 5.8.2.2** beschrieben (s. **Tab. 8**).

## 7.11 Gebundene CTC-Rückstände in Knochen

### 7.11.1.1 Freisetzung von CTC aus Knochen

Zur Überprüfung einer *in vitro*-Freisetzung von CTC aus Knochen wurde CTC-haltiges gemahlene Knochenmaterial mit unbelastetem Plasma gemischt, über mehrere Tage aufbewahrt und in verschiedenen Zeitabständen der Gehalt an CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC ermittelt. Das für den Versuch eingesetzte Plasma wurde aus Heparin-Vollblut gewonnen. Die Blutproben wurden vom Schlachthof Paderborn (Westfleisch) bezogen, wobei zunächst mehrere Blutproben auf nachweisbare Rückstände von CTC mit dem in **Kap. A. 9** im Anhang beschriebenen Verfahren untersucht wurden. Die zur Probenahme notwendigen Gefäße mit der Heparin-Lösung wurden

uns von der Firma Kabe zur Verfügung gestellt. Die Gefäße enthielten 41 i.U./mL Li-Heparin, gelöst in bidest. Wasser (5%ig), entsprechend der entnommenen Blutmenge von 1 L. Als Knochenmaterial dienten die Knochenproben des Tieres 95 aus der Medikationsstudie an der FAL. Die Zerkleinerung der Knochen erfolgte, wie in **Kap. 7.5.4.4** beschrieben. Nach Bestimmung der Gehalte von CTC und Metabolite im Knochen (siehe **Kap. A. 9** im Anhang) und der Gewinnung des Plasmas erfolgte die Inkubation von vier Knochen-Plasmaproben. Von den durch Versetzen von 15 g Knochen mit 25 mL Plasma hergestellten Knochen-Plasmaproben wurden zwei bei einer Temperatur von 5 °C und zwei bei einer Temperatur von 39,5 °C aufbewahrt.

Um die Stabilität von CTC in Plasma unter diesen Bedingungen zu überprüfen, wurden folgende vier Plasmaproben hergestellt: Zu 20 mL Plasma wurde 200 µg CTC, entsprechend einer Konzentration von 10 µg CTC/mL Plasma, zudosiert. Zwei dieser Proben wurden entsprechend der Knochen-Plasma-Proben bei einer Temperatur von 5 °C aufbewahrt, die anderen beiden bei 39,5 °C. Der pH-Wert aller Proben betrug 7,6. Über einen Versuchszeitraum von neun Tagen wurden den Proben an den Versuchstagen 1, 2, 3, 4, 5, 8 und 9 jeweils 1 mL Plasma entnommen und mit dem in **Kap. A. 9** im Anhang aufgeführten Verfahren analysiert.

#### 7.11.1.2 Fluoreszenz-Screening-Test

Die in Scheiben geschnittenen und von Fleischresten befreiten Knochenproben der Medikationsstudien im Landwirtschaftszentrum Haus Düsse und an der FAL wurden zur Untersuchung der Fluoreszenz der in den Knochen eingelagerten Calcium-Tetracyclin-Komplexe mit einer UV-Lampe (s. **Kap. 7.2.8**) bei einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt.

---

## 8 Literatur

- [1] R. Sattelberger; *Arzneimittelrückstände in der Umwelt - Bestandsaufnahme und Problemdarstellung*; Bericht des Umweltbundesamtes; Wien; **1999**
- [2] H.-H. Frey, W. Löscher; in: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*; Enke Verlag, Stuttgart; 2. Aufl.; **2002**; 592-597
- [3] I. Schmerold; in: *Wiener Mitteilungen: Arzneimittel in der aquatischen Umwelt: Umwelttoxikologische Risikoabschätzung bei Tierarzneimitteln*; **2002**; 178; 83-89
- [4] F.R. Ungemach; *Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang*; **1999**; Tierärztl. Prax.; 27 (G); 335-340
- [5] F. Ungemach; *Figures on the quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation*; **2000**, Acta vet. scand.; suppl. 93; 89-98
- [6] H. Trolldenier, R. Kroker; *Übersicht verfügbarer Chemotherapeutika in der Veterinärmedizin*; Dtsch. Tierärztebl.; **1998**; 10; 996-997
- [7] W. Schmitz; *Antibiotika und Chemotherapeutica*; in: *Arzneimittelverordnungsreport '97*; Gustav Fischer Verlag Stuttgart; **1997**; 64-81
- [8] D.G. Kennedy, A. Cannavan, R.J. McCracken; *Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues*; **2000**; J. Chromatogr. A; 882; 37-52
- [9] G.K. Poon, G. Kwei, R. Lyons, Q. Chen, V. Didolkar, C.E.C.A. Hop; *Integating Qualitative and Quantitative Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Analysis to Support Drug Discovery*; **1999**; Rapid. Commun. Mass Spectrom.; 13; 1943-1950
- [10] H. Trolldenier; *Antibiotika in der Tierhaltung*; **1998**; Dtsch. Tierärztebl.; 4; 352-353
- [11] F.J. Schenck, P.S. Gallery; *Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 99-109
- [12] A.D. Cooper, C.S. Creaser, W.H.H. Farrington, J.A. Tarbin, G. Shearer; *Development of multi-residue methodology for the HPLC-Determination of veterinary drugs in animal tissues*; **1995**; Food Addit. Contam.; 12 (2); 167-176
- [13] A.H. Farnleitner, R.L. Mach; in: *Wiener Mitteilungen: Antibiotika und Resistenzproblematik in aquatischen Systemen*; **2002**; 178; 151-178
- [14] H. Trolldenier; *Überblick zum Resistenzgeschehen schweinepathogener Erreger von 1976-1998 in der ehemaligen DDR und in den jetzigen Neuen Bundesländern*; **2001**; Tierärztl. Umschau; 56; 292-298
- [15] Zwischenbericht zum Forschungsvorhaben: *Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei Salmonella- und E. coli-Isolaten vom Tier, Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt*
- [16] ANON.; *Resistenzfassung und -auswertung in der Veterinärmedizin*; **1997**; Bundesgesundheitsbl.; 11; 431-434
- [17] Kommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln (Deutsche Forschungsgemeinschaft): *Die Verwendung von Tetracyclinen bei lebensmittelliefernden Tieren*; Harald Boldt Verlag; **1978**
- [18] K.A. Dawson, B.E. Langlois, T.S. Stahly, G.L. Cromwell; *Multiple antibiotic resistance in fecal, cecal and colonic coliforms from pigs fed therapeutic and subtherapeutic concentrations of chlortetracycline*; **1983**; J. animal science; 57 (5); 1225-1234
- [19] L.H. Wieler, G. Baljer; *Rationaler Umgang mit Antibiotika in der Veterinärmedizin*; Dtsch. Tierärztebl.; 47 (3); 227
- [20] R. Helmuth; *Molekulare Mechanismen der Resistenz und ihrer Ausbreitung am Beispiel der Salmonellen*; **1999**; Tierärztl. Prax.; 27 (G); 306-309
- [21] G. Pschorn; *Bericht zur Lage*; **2000**; Dtsch. Tierärztebl.; 48 (1); 8-12
- [22] L.H. Wieler, G. Baljer; *Antibiotika und Resistenzproblematik: hygienische und immunologische Alternativen*; **1999**; Tierärztl. Prax.; 27 (G); 341-347
- [23] A.O. Summers; *Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology*; **2002**; Clin. Infect. Dis.; 34 (3); 85-92
- [24] B. Schlatterer; *Bakterielle Resistenzen – Stand und Entwicklungen bei Isolaten aus Mensch und Tier*; **1995**; Dtsch. tierärztl. Wochenschr.; 102; 251-256
- [25] B. Halling-Sørensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhof, S.E. Jorgensen; *Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment – A Review*; **1998**; Chemosphere; 36 (2); 357-393
- [26] A.S. Ahl, B. Buntain; *Risk and the food safety chain: animal health, public health and the environment*; **1997**; Rev. sci. Off. int. Epiz.; 16 (1); 322-330
- [27] R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz, K.-L. Kratz; *Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*; **1998**; J. Chromatogr. A; 815; 213-223
- [28] R. Hirsch, T.A. Ternes, K.-L. Kratz; *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*; **1999**; Sci. Total Environ.; 225; 109-118
- [29] M.-L. Loke, S. Jespersen, R. Vreeken, B. Halling-Sørensen, J. Tjørnelund; *Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems*; **2003**; J. Chromatogr. B; 783; 11-23
- [30] G. Hamscher, S. Sczesny, A. Abu-Qare, H. Höper, H. Nau; *Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hor-*

- monell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden; **2000**; Dtsch. Wschr.; 107 (8); 332-334
- [31] BLAC-Arbeitsgruppe ( Bund/Länderausschuß für Chemikaliensicherheit): *Auswirkungen der Anwendung von Clofibrinsäure und anderer Arzneimittel auf die Umwelt und Trinkwasserversorgung*; Hamburg; **1998**
- [32] B. Halling-Sørensen, G. Sengelov, F. Ingerslev, L.B. Jensen; *Reduced Antimicrobial Potencies of Oxytetracycline, Tylosin, Sulfadiazin, Streptomycin, Ciprofloxacin, and Olaquinox Due to Environmental Processes*; **2003**; Arch. Environ. Contam. Toxicol.; 44; 7-16
- [33] A.B.A. Boxall, D.W. Kolpin, B. Halling-Sørensen, J. Tolls; *Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks?*; **2004**; Environmental Science; August 1; 287 A-294 A
- [34] L. Nozal, L. Arce, B.M. Simonet, A. Rios, M. Valcarcel; *Rapid determination of trace levels of tetracyclines in surface water using continuous flow manifold coupled to a capillary electrophoresis system*; **2004**; Anal. Chim. Acta; 517; 89-94
- [35] M. Silvia Diaz-Cruz; *Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge*; **2003**; Trends in Analytical Chemistry; 22 (6); 340-351
- [36] S. Thiele-Bruhn; *Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review*; **2003**; J. Plant Nutr. Soil Sci.; 166; 145-167
- [37] W. Dürckheimer; *Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungsbeziehungen*; **1975**; Angew. Chem.; 87 (21); 751-784
- [38] M.E. Langewische, H. Bottermann; *Bedeutung von Arzneimittel-Rückständen für das Resistenzgeschehen und die Expression von Virulenzfaktoren unterhalb der MRL-Werte/subinhibitorischer Konzentrationen antimikrobieller Wirkstoffe*; **2003**; Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle; 10 (3); 300-309
- [39] H.J.C.F. Nelis, A.P. De Leenheer; *Metabolism of Minocycline in Humans*; **1982**; Drug Metabolism Disposition; 10 (2); 142-146
- [40] R.G. Kelly, L.M. Peets, K.D. Hoyt; *A Fluorometric Method of Analysis for Tetracycline*; **1969**; Anal. Biochem.; 28; 222-229
- [41] A. Reja, L. Moreno, J.M. Serrano, D. Santiago; *Concentration-Time Profiles of Oxytetracycline in Blood, Kidney, and Liver of Tench (Tinca Tinca L) After Intramuscular Administration*; **1996**; Vet. Human. Toxicol.; 38 (5); 344-347
- [42] C.G. Durbin, J.J. DiLorenzo, W.A. Randall, J. Wilner; *Antibiotic Concentration and Duration in Animal Tissues and Fluids II. Chicken Blood, Tissue, and Eggs*; *Antibiotics Annual 1953-1954*; 428-432
- [43] V. Ramazza, M. Zucchi, A. Lanzoni, C. Bianchi; *Presence of oxitetracycline in pig farming after higher dosages and longer administration times in comparison to the suggested ones*; **1996**; in: EURORESIDUE III (Vol.2): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 814-818
- [44] S. Croubels, K. Baert, J. De Busser, P. De Backer; *Residue Study of doxycycline and 4-epidoxycycline in pigs medicated via drinking water*; **1998**; Analyst; 123; 2733-2736
- [45] R. Lindberg, P.-A. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind; *Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards*; **2004**; Chemosphere; 57; 1479-1488
- [46] R. Ueno, A. Kinoshita, J. Wakabayashi; *Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in eel and its fate in a closed aquatic environment*; **2004**; Aquaculture; 235; 53-63
- [47] U. Gräfe; in: *Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 1. Aufl.; **1992**; 1-40
- [48] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel; in: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftsverlag, Mannheim; 5. Aufl.; **1988**; 580-715
- [49] H. Auterhoff, J. Knabe, H.-D. Höltje; in: *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart; 13. Aufl.; **1994**; 741-795
- [50] A.M. Walter, L. Heilmeyer; in: *Antibiotika-Fibel*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 4. Aufl.; **1975**; 2-108, 319-361
- [51] H. Brandis, G. Pulverer; in: *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 6. Aufl.; **1988**; 13-64
- [52] Aufbau von Bakterienzellen; Abbildung von der homepage: <http://mi-staging.svhfi.securitas.net/sicherheitsnet/-shop/content/3-935658-40-0/leseprobe/bakterienzelle.htm>
- [53] H.G. Schlegel; in: *Allgemeine Mikrobiologie*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 5. Aufl.; **1981**; 13-56
- [54] N.A. Campbell; in: *Biologie*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 1. Aufl.; **1997**; 546-566
- [55] Homepage der Paul-Ehrlich-Gesellschaft; Abbildung der Wirkmechanismen von Antibiotika; aus: <http://www.p-e-g.de>
- [56] L.A. Mitscher, A.C. Bonacci, T.D. Sokoloski; *Circular Dichroism and Solution Conformation of the Tetracycline Antibiotics*; **1968**; Tetrahedron Lett.; 51; 5361-5364
- [57] R. Brunner, A. Rank, K. Riedl et al.; in: *Die Antibiotika-Tetracycline*; Verlag Hans Carl, Nürnberg; Band 1, Teil 2; **1962**; 311-625
- [58] J. Koza; *Synthesis of 7-Substituted Tetracycline Derivatives*; **2000**; Org. Lett.; 2 (6); 815-817
- [59] H. Muxfeldt; *Synthese eines Terramycin-Bausteins*; **1962**; Angew. Chem.; 21; 825-828
- [60] H. Muxfeldt; *Synthesen in der Tetracyclin-Reihe*; **1962**; Angew. Chem.; 13; 443-478
- [61] M.C. Roberts; *Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution*; **1996**; FEMS Microbiol. Rev.; 19; 1-24



- [62] D. Schnappinger, W. Hillen; *Tetracyclines: antibiotic action, uptake and resistance mechanism*; **1996**; Arch. Microbiol.; 165; 359-369
- [63] P.H. List, L. Hörhammer; in: *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*; Springer-Verlag; Berlin; 4. Aufl.; **1967**; 1090-1117
- [64] A.H. Kline, R.J. Blattner, M. Lunin; *Transplacental Effect of Tetracyclines on Teeth*; **1964**; JAMA; 188 (2); 178-180
- [65] S. Tanase, H. Tsuchiya, J. Yao, S. Ohmoto, N. Takagi, S. Yoshida; *Reversed-phase ion-pair chromatographic analysis of tetracycline antibiotics – Application to discolored teeth*; **1998**; J. Chromatogr. B; 706; 279-285
- [66] S. Pfeifer, B. Gildemeister, H.-H. Borchert, M. Otto; in: *Biotransformation von Arzneimitteln*; Verlag Chemie; Weinheim; Band 3; **1979**; 9-454
- [67] A. Anadon, M.R. Martinez-Larranaga, M.J. Diaz, P. Bringas, M.C. Fernandez, M.L. Fernandez-Cruz, J. Iturbe, M.A. Martinez; *Pharmacokinetics of doxycycline in broiler chickens*; **1994**; Avian Pathol.; 23; 79-90
- [68] H.J. Eisner, F.E. Stirn, A.C. Dornbush, J.J. Oleson; *The enhancement of serum levels of Aureomycin in experimental animals*; **1953**; J. Pharm. Exp. Ther.; 108; 442-449
- [69] A. Marzo, L. Dal Bo; *Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic application*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 17-34
- [70] R.A. Pollet, C.E. Glatz, D.C. Dyer, H.J. Barnes; *Pharmacokinetics of chlortetracycline potentiation with citric acid in the chicken*; **1983**; Am. J. Vet. Res.; 44; 1718-1721
- [71] J. Fabre, J.S. Pitton, J.P. Kunz; *Distribution and Excretion of Doxycyclin in Man*; **1966**; Chemotherapia; 11; 73-85
- [72] A.M. Doi, M.K. Stoskopf, G.A. Lewbart; *Pharmacokinetics of oxytetracycline in the red pacu (Colossoma brachypomum) following different routes of administration*; **1998**; J. Vet. Pharmacol. Therap.; 21; 364-368
- [73] E. Pittenauer; in: *Wiener Mitteilungen: Abbau und Verhalten von Arzneimittelwirkstoffen in der Umwelt*; **2002**; 178; 17-33
- [74] H.K. Eisner, R.J. Wulf; *The metabolic Fate of Chlortetracycline and some comparisons with other Tetracyclines*; **1963**; J. Pharmaceutical Experimental Therapeutics; 142; 122-131
- [75] F. Baquero; *Antibiotic-selective environments*; **1998**; Clin. Infect. Dis.; 27 (1); 5-11
- [76] L.A. Mitscher, S.P. Pillai, E.J. Gentry, D.M. Shankel; *Multiple Drug Resistance*; **1999**; Med. Res. Rev.; 19 (6); 477-496
- [77] L. Stryer; *Biochemie*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 4. Aufl.; **1996**, 861-873
- [78] G. Breitfellner, R. Neuhold; *Untersuchungen zur Frage der Kreuzresistenz von Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin an 40 Staphylokokkenstämmen*; **1964**; Chemotherapia; 8; 30-40
- [79] W. Hinrichs, C. Kisker, M. Düvel, A. Müller, K. Tovar, W. Hillen, W. Saenger; *Structure of the Tet Repressor-Tetracycline Complex and Regulation of Antibiotic Resistance*; **1994**; Science; 264; 418-419
- [80] V. Burdett; *Streptococcal tetracycline resistance mediated at a level of protein synthesis*; **1986**; J. Bacteriol.; 165; 564-569
- [81] G.G. Guiney Jr.; P. Hasegawa, C.E. Davis; *Expression in Escherichia coli of cryptic tetracycline resistance genes from Bacteroides R plasmids*; **1984**; Plasmid; 11; 248-252
- [82] B.S. Speer, L. Bedzyk, A.A. Salyers; *Evidence that novel tetracycline resistance gene found on two Bacteroides transposons encodes an NADP-requiring oxidase*; **1991**; J. Bacteriol.; 173; 176-183
- [83] T. Lederer, M. Kintrop, M. Takahashi, P.-E. Sum, G. A. Ellestad, W. Hillen; *Tetracycline Analogs Affecting Binding to Tn10-Encoded Tet Repressor Trigger the Same Mechanism of Introduction*; **1996**; Biochemistry; 35; 7439-7446
- [84] J. Degenkolb, M. Takahashi, G. A. Ellestad W. Hillen; *Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: Determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor*; **1991**; Antimicrob. Agents Chemother.; 35 (8); 1591-1595
- [85] BgVV; *Antibiotikaresistenzen*; **1997**; Dtsch. Tierärztebl.; 45 (6); 532
- [86] G.K. Jim, P.T. Guichon, O.C. Schunicht, B.K. Wildman, C.W. Booker; *Introduction of the Issues Related to Antimicrobial Resistance in Beef Production*; **1999**; The Bovine Proceedings 32; 71-72
- [87] W. Woltersdorf, U. Schmidt; *Einfluß von Be- und Verarbeitungstechnologien auf Antibiotika-Rückstände im Fleisch*; in: *Rückstände in Fleisch und Fleischerzeugnissen*; Forschungsbericht der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG); Harald Boldt Verlag KG Boppard; **1975**; 60-72
- [88] U. Schmidt, W. Woltersdorf; *Rückstände im Fleisch nach therapeutischer oder nutritiver Verabreichung von Antibiotika*; in: *Rückstände in Fleisch und Fleischerzeugnissen*; Forschungsbericht der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG); Harald Boldt Verlag KG Boppard; **1975**; 73-83
- [89] D. Großklaus; in: *Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln*; Verlag Paul Parey Berlin; 1. Aufl.; **1989**, 35-39
- [90] C.T. Chiou, G. Sheng, M. Manes; *A partition-limited model for the plant uptake of organic contaminants from soil and water*; **2001**; Environ. Sci. Technol.; 35; 1437-1444
- [91] H. Hung, D. Mackay; *A novel and simple model of the uptake of organic chemicals by vegetation from air and soil*; **1997**; Chemosphere; 35 (5); 959-977
- [92] J.P. Langhammer, F. Führ, H. Büning-Pfaue; *Verbleib von Sulfonamid-Rückständen aus der Gülle in Boden und Nutzpflanzen*; **1989**; Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.; 44; 93
- [93] M. Grote; Forschungsauftrag: Versuche und Untersuchungen zur umweltverträglichen und standortgerechten Landwirtschaft; Abschlußbericht vom **14.01.2005**: „Antimikrobiell-einträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“; Hrsg.: Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes

NRW, Düsseldorf

- [94] C.G. Daughton, T.A. Ternes; *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change*; **1999**; Environ. Health Perspec.; 107 (6); 907-939
- [95] B. Gooß; *Erstellung des internetbasierten Antibiotika-Informationssystems „VetAbis“ für einen verantwortungsvollen Umgang mit Antibiotika in der Rinderpraxis*; **2001**; Dissertation; Freie Universität Berlin
- [96] E. Alcaide, E. Garay; *R-plasmid transfer in Salmonella spp. isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters*; **1984**; Appl. Environ. Microbiol.; 48; 435-438
- [97] E. Tzelepi; *Antibiotic susceptibilities of Yersinia enterocolitica and Y. intermedia isolates from aquatic environments*; **1999**; J. Med. Microbiol.; 48; 157-160
- [98] P.M. Koenraad; *Antibiotic susceptibility of campylobacter isolates from sewage and poultry abattoir drain water*; **1995**; Epidemiol. Infect.; 115; 475-483
- [99] J. Kamphues; *Risiken der Medikation von Futter und Wasser in Tierbeständen*; **1996**; Deutsche tierärztl. Wochenschrift; 103; 250-256
- [100] M. Kietzmann, W. Markus, J. Chavez, W. Bollwahn; *Arzneimittelrückstände in unbehandelten Schweinen*; **1995**; Dtsch. tierärztl. Wochenschr.; 102; 441-442
- [101] P. Dorn, J. Neudegger, H.O. Knöppler; *Zur Problematik der Wirkstoffverschleppung bei der Mischfutterherstellung am Beispiel Nicarbazin*; **1988**; Tierärztl. Umsch.; 43; 524-529
- [102] B. Jülicher; *Tierarzneimittelrückstände und Lebensmittelüberwachung – Auswirkungen des EG-Rechts*; Bundesgesundhbl.; **1992**; 6; 281-286
- [103] Fleischhygienegesetz (FHG) vom 8.7.1993 (BGBl. I, S. 1189) in der Fassung vom 22.12.1997 (BGBl. I, S. 3224, 3240)
- [104] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG) vom 19.10.1994 (BGBl. I, S. 3018) in der Fassung vom 5.11.1997 (BGBl. I, S. 2631, 2638)
- [105] A. Somogyi; *Gesundheitliche Bedeutung von Rückständen pharmakologisch wirksamer Substanzen in der Tierhaltung*; Bundesgesundhbl.; **1982**; (25) 11; 365-370
- [106] 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 (<http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/swp/003695en.pdf>)
- [107] BgVV, BTK; *Verbot der Anwendung von bestimmten Arzneimitteln bei Lebensmittel liefernden Tieren*; **1997**; Dtsch. Tierärztebl.; 45 (5); 434-436
- [108] G. Eisenbrand, M. Metzler; in: *Toxikologie für Chemiker: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1. Aufl.; **1994**; 148-172
- [109] VO Nr. 2377/90 (2000): *Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs*
- [110] W. Prügner; *Anwendung von Arzneimitteln bei lebensmittelliefernden Tieren: gesetzliche Aspekte*; **1994**; Tierärztl. Umschau; 49; 647-653
- [111] Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) (Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen) in der Fassung vom 25.2.1998
- [112] I. Schmerold, S. Scheid; *Rückstandsproblematik beim Einsatz von Tierarzneimitteln: Höchstmengen und Wartezeit*; **1994**; Tierärztl. Umsch.; 49 (11); 709-713
- [113] I. Schmerold, F.R. Ungemach; *Das neue Konzept zur Festlegung von Rückstandshöchstmengen für Futterzusatzstoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs*; **1998**; Wiener Tierärztliche Monatsschrift; 85; 267-272
- [114] Official Journal of the European Union; *amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin (2004/25/EC)*; **2004**
- [115] U. Körner; *Tetracyclin-Rückstände in Tiermehlen und Fleischknochenmehlen*; **2000**; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- [116] EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Committee for Veterinary Medicinal Products; *Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline-Summary Report (1-3) in: EMEA (Hrsg.)/MRL/023/95*; **1995**; ([http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/Tetracyclines\(3\)02395.pdf](http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/Tetracyclines(3)02395.pdf))
- [117] *Evaluation of certain drug residues in food*; Fiftieth report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives; WHO; Geneva; 50-54; **1999**
- [118] Food and Drug Administration; *Tolerances of residues of new animal drugs in food*; Subpart B: Specific tolerances for residues of new animal drugs; **1996**
- [119] Y. Liang, M.B. Denton, R.B. Bates; *Stability studies of tetracycline in methanol solution*; **1998**; J. Chromatogr. A; 827; 45-55
- [120] V. Naggar, N.A. Daabis, M.M. Motawi; *Effect of Solubilizers on the Stability of Tetracycline*; **1974**; Pharmazie; 29; H.2; 126-129
- [121] V. Naggar, N.A. Daabis, M.M. Motawi; *Solubilization of Tetracycline and Oxytetracycline*; **1974**; Pharmazie; 29; H.2; 122-125
- [122] T. Strittmatter, M. Siewert; *Zur Qualitätsbeurteilung der Tetracycline: Übersicht zur Stabilität und Analytik der Tetracyclinderivate*; **1981**; Pharm. Ztg.; 126 (39); 1951-1954

- [123] C.R. Stephens, K. Murai, K.J. Brunings, R.B. Woodward; *Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics*; **1956**; J. Am. Chem. Soc.; 4155-4158
- [124] J.M. Wessels, W.E. Ford, W. Szymczak, S. Schneider; *The Complexation of Tetracycline and Anhydrotetracycline with  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ : A Spectroscopic Study*; **1998**; J. Phys. Chem. B; 102; 9323-9331
- [125] J.L. Claizzi, P.R. Klink; *pH-Partition behavior of Tetracyclines*; **1969**; J. Pharm. Sci.; 58; 1184-1189
- [126] H.A. Duarte, S. Carvalho, E.B. Paniago, A.M. Simas; *Importance of Tautomers in the Chemical Behavior of Tetracyclines*; **1999**; J. Pharm. Sci.; 88 (1); 111-120
- [127] H. Lanig, M. Gottschalk, S. Schneider, T. Clark; *Conformational Analysis of Tetracycline using Molecular Mechanical and Semiempirical MO-Calculations*; **1999**; J. Mol. Model.; 5; 46-62
- [128] H.F. Dos Santos, W.B. De Almeida, M.C. Zerner; *Conformational Analysis of the Anhydrotetracycline Molecule: A Toxic Decomposition Product of Tetracycline*; **1998**; J. Pharm. Sci.; 87 (2); 190-195
- [129] G. Kuschinsky, H. Lüllmann; in: *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 12. Aufl.; **1989**; 451-453
- [130] A. Albert; *Avidity of Terramycin and Aureomycin for Metallic Cations*; **1953**; Nature; 4370; 201
- [131] A. Albert, C.W. Rees; *Avidity of the Tetracyclines for the Cations of Metals*; **1956**; Nature; 4505; 433-434
- [132] W.A. Baker, P.M. Brown; *Metal Binding in Tetracyclines. Cobalt(II) and Nickel(II) Complexes*; **1966**; J. Am. Chem. Soc.; 88 (6); 1314-1317
- [133] M. Navak-Pekli, M. E.-H. Mesbah, G. Pethö; *Equilibrium studies on tetracycline-metal ion systems*; **1996**; 14; 1012-1029
- [134] F.C.S. de Paula, S. Carvalho, H.A. Duarte, E.B. Paniago, A.S. Mangrich, E.C. Pereira-Maia; *A physiochemical study of the tetracycline coordination to oxovanadium(IV)*; **1999**; J. Inorg. Biochem.; 76; 221-230
- [135] W.B. De Almeida, H.F. Dos Santos, M.C. Zerner; *Atheoretical Study of the Interaction of Anhydrotetracycline with Al(III)*; **1998**; J. Pharm. Sci.; 87 (9); 1101-1108
- [136] P.D. Bryan, K.R. Hawkins, J.T. Stewart, A.C. Capomacchia; *Analysis of Chlortetracycline by High Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Alkaline-induced Fluorescence Detection*; **1992**; Biomed. Chromatogr.; 6; 350-310
- [137] J.R.D. McCormick, S.M. Fox, L.L. Smith, B.A. Bitler, J. Reichenthal, V.E. Origoni, W.H. Muller, R. Winterbottom, A.P. Doerschuk; *Studies of the Reversible Epimerization Occurring in the Tetracycline Family. The Preparation, Properties and Proof of Structure of Some 4-epi-Tetracyclines*; **1957**; J. Am. Chem. Soc.; 79; 2849-2858
- [138] D.A. Hussar, P.J. Niedergall, E.T. Sugita, J.T. Doluisio; *Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives*; **1968**; J. Pharm. Pharmac.; 20; 539-546
- [139] E.G. Remmers, G.M. Sieger, A.P. Doerschuk; *Some Observations on the Kinetics of the C-4 Epimerization of Tetracycline*; **1963**; J. Pharm. Sci.; 52; 752-756
- [140] E.E. Martinez, W. Shimoda; *Liquid Chromatographic Determination of Epimerization of Chlortetracycline Residue to 4-epi-Chlortetracycline Residue in Animal Feed, Using McIlvain's Buffer as Extractant*; **1989**; J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 72 (5); 848-850
- [141] Homepage der Universität Freiburg; Eigenschaften von Tetracyclinen: <http://www.fschemie.uni-freiburg.de/pharmi/Pharm.Chem.64-73.pdf>
- [142] S.A. Barker, C.C. Walker; *Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods*; **1992**; J. Chromatogr.; 624; 195-209
- [143] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, M.P. Carey, W.J. Blanchflower, S.A. Hewitt; *Iso-and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 327-337
- [144] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, S.A. Hewitt, J.D.G. McEvoy; *Metabolism of chlortetracycline: drug accumulation and excretion in the hen's egg*; **1998**; Analyst; 123; 2443-2447
- [145] S. Sczesny; *Analytik von Tetracyclinen in Umwelt- und Lebensmittelproben mittels selektiver Extraktionsverfahren und sensitivem Nachweis durch HPLC gekoppelt mit mikrobiologischem Assay und Tandem-Massenspektrometrie*; **2001**; Dissertation; Tierärztliche Hochschule Hannover
- [146] S. Sczesny, H. Nau, G. Hamscher; *Residue Analysis of Tetracyclines and Their Metabolites in Eggs and in the Environment by HPLC Coupled with a Microbiological Assay and Tandem Mass Spectrometry*; **2003**; J. Agric. Food Chem.; 51; 697-703
- [147] W.J. Blanchflower, R.J. McCracken, D.A. Rice; *Determination of Chlortetracycline Residues in Tissues Using High-Performance Liquid Chromatography With Fluorescence Detection*; **1989**; Analyst; 114; 421-423
- [148] Y. Zhao, Y. Ci, W. Chang; *Fluorescence enhancing by alkaline degradation of tetracycline antibiotics and its application*; **1997**; Science in China B; 40 (4); 434-441
- [149] W. Naidong, E. Roets, R. Busson, J. Hoogmartens; *Separation of keto-enol-tautomers of chlortetracycline and 4-epichlortetracycline by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene)copolymer*; **1990**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 8 (8); 881-889
- [150] W. Naidong, S. Hua, E. Roets, R. Busson, J. Hoogmartens; *Investigation of keto-enol tautomerism and ionization of doxycycline in aqueous solutions*; **1993**; Int. J. Pharm.; 96; 13-21
- [151] E. Weidenberg; *Vergleich verschiedener Aufschlußverfahren zur Herstellung von Gelatine aus Knochen im Hinblick auf Rückstände von Tetracyclinen*; **2002**; Dissertation; Tierärztliche Hochschule Hannover

- [152] F. Krämer-Horaczynska; *High-Performance Liquid Chromatographic Procedures for the Quantitative Analysis of 15 Tetracycline Derivatives in Small Blood Samples*; **1991**; J. Chromatogr. Sci.; 29; 107-113
- [153] G. Zurhelle; *Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse: Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetracycline bei Legehennen*; **2000**; Dissertation; Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal
- [154] K. De Braekeleer, A. de Juan, D.L. Massart; *Purity assessment and resolution of tetracycline hydrochloride samples analysed using high-performance liquid chromatography with diode array detection*; **1999**; J. Chromatogr. A; 832; 67-86
- [155] K. Dierick, N. Hamers; *Preparation and evaluation of control samples used for the microbiological screening tests on antibiotic residues*; **1996**; in: EUORESIDUE III (Vol.1): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 377-381
- [156] L. Okerman, K. De Wasch, J. Van Hoof; *An inhibition test intended to detect and to differentiate between penicillins, cephalosporins, tetracyclines and quinolones, for use in muscle tissue from different animal species*; **2000**; in: EUORESIDUE IV (Vol.2): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 802-808
- [157] H. Offereins, I. Engelen, B.G.M. Jongerius-Gortemaker, E.M.L. Geijp, F.M.P. de Bruijn, J. Stark, A.A. Bergwerff; *Premi®-Test for screening for antimicrobial substances in fish fillets*; **2000**; in: EUORESIDUE IV (Vol.2): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 786-791
- [158] S. Croubels, L. Okerman, K. Vanoosthuyze, J. Van Hoof, C. Van Peteghem; *Confirmation of tetracycline residues by HPLC after microbiological and ELISA screening of kidney and meat tissue*; **1996**; in: EUORESIDUE III (Vol.1): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 362-366
- [159] K. Tsuji, J.H. Robertson; *Formation of trimethylsilyl derivatives of tetracyclines for separation and quantification by gas-liquid chromatography*; **1973**; Analytical Chemistry; 45; 2136-2140
- [160] C.-X. Zhang, Z.-P. Sun, D.-K. Ling, Y.-J. Zhang; *Separation of tetracycline and its degradation products by capillary zone electrophoresis*; **1992**; J Chromatogr.; 627; 281-286
- [161] Y.M. Li, V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens; *Capillary zone electrophoresis of minocycline*; **1996**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 14; 1095-1099
- [162] J. Zhou, G.C. Gerhardt, A. Baranski, R. Cassidy; *Capillary electrophoresis of some tetracycline antibiotics coupled with reductive fast cyclic voltammetric detection*; **1999**; J. Chromatogr. A; 839; 193-201
- [163] M.J. Ruiz-Angel, R.D. Caballero, E.F. Simo-Alfonso, M.C. Garcia-Alvarez-Coque; *Micellar liquid chromatography: suitable technique for screening analysis*; **2002**; J. Chromatogr. A; 947; 31-45
- [164] Y.-C. Chen, C.-E. Lin; *Migration behavior and separation of tetracycline antibiotics by micellar electrokinetic chromatography*; **1998**; J Chromatogr. A; 802; 95-105
- [165] A. Pena, L.P. Palilis, C.M. Lino, M.I. Silveira, A.C. Calokerinos; *Determination of tetracycline and its major degradation products by chemiluminescence*; **2000**; Anal. Chim Acta; 405; 51-56
- [166] S. Marczyński; *Chemiluminescent Method for Determination of Tetracycline, Chlortetracycline, Minocycline, Doxycycline, and Demeclocycline*; **2000**; Biopolymers (Biospectroscopy); 57; 365-372
- [167] J. Kurittu, M. Karp, M. Korpela; *Detection of tetracyclines with luminescent bacterial strains*; **2000**; Lumin.; 15; 291-297
- [168] S.A. Barker, C.C. Walker; *Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods*; **1992**; J. Chromatogr.; 624; 195-209
- [169] P.J. Kijak, M.G. Leadbetter, M.H. Thomas, E.A. Thompson; *Confirmation of Oxytetracycline, Tetracycline and Chlorotetracycline Residues in Milk by Particle Beam Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*; **1991**; Biolog. Mass Spectrom.; 20; 789-795
- [170] H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto; *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in food*; **2000**; J. Chromatogr. A; 882; 109-133
- [171] B. Axisa, A.R. Naylor, P.R.F. Bell, M.M. Thompson; *Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues*; **2000**; J. Chromatogr. B; 744; 329-365
- [172] H. Oka, Y. Ito, Y. Ikai, T. Kagami, K. Harada; *Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 309-319
- [173] J.D. MacNeil, V.K. Martz, G.O. Korsrud, C.D.C. Salisbury, H. Oka, R.L. Epstein, C.J. Barnes; *Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in Edible Animal Tissues, Liquid Chromatographic Method: Collaborative Study*; **1996**; J. of AOAC international; 79 (2); 405-417
- [174] U. Jürgens; *Zur hochdruckflüssigchromatographischen Analyse von Arzneimittelrückständen in Honig*; **1981**; Z. Lebensm. Unters. Forsch.; 173; 356-358
- [175] D.N. Heller; *Structure Elucidation of Tetracycline Antibiotics Using Electrospray Ionization and Multiple Stages of Mass Spectrometry*; **1992**; U.S. Food & Drug Administration, Center for Veterinary Medicine; Laurel, MD 20708
- [176] A. Posyniak, J. Zmudzki, S. Semeniuk, J. Niedzielska, R. Ellis; *Determination of Tetracycline Residues in Animal Tissues by Liquid Chromatography*; **1998**; Biomed. Chromatogr.; 12; 294-299
- [177] T. Agasoster; *Automated determination of oxytetracycline residues in muscle, liver, milk and egg by on-line dialysis and post-column reaction detection*; **1992**; 9 (6); 615-622
- [178] G. Zurhelle, E. Müller-Seitz, M. Petz; *Automated residue analysis of tetracyclines and their metabolites in whole egg*,

- egg white, egg yolk and hen's plasma utilizing a modified ASTED system; **2000**; J. Chromatogr. B; 739; 191-203
- [179] J.H. Knox, J. Jurand; *Mechanism of reversed-phase separation of tetracyclines by high-performance liquid chromatography*; **1979**; J. Chromatogr.; 186; 763-782
- [180] H.Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada, K.-I. Harada, M. Uchiyama, H. Asukabe, M. Suzuki; *Determination of eight tetracyclines using thin-layer and high-performance liquid chromatography*; **1987**; J. Chromatogr.; 393; 285-296
- [181] Y. Vander Heyden, D.L. Mussart, Y. Zhu, J. Hoogmartens; J. De Beer; *Ruggedness tests on the high performance liquid chromatography assay of the United States Pharmacopeia 23 for tetracycline.HCl: comparison of different columns in an interlaboratory approach*; **1996**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 14; 1313-1326
- [182] N.H. Khan, P. Wera, E. Roets, J. Hoogmartens; *Quantitative analysis of tetracycline by high performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene packing materials*; **1990**; J. Liquid Chromatogr.; 13 (7); 1351-1374
- [183] H. Oka, M. Suzuki; *Comparison of analytical methods for determination of impurities in tetracycline pharmaceutical preparations*; **1984**; J. Chromatogr.; 314; 303-311
- [184] X. Ding, S. Mou; *Ion chromatographic analysis of tetracyclines using polymeric column and acidic eluent*; **2000**; J. Chromatogr. A; 897; 205-214
- [185] J. Diana, G. Ping, J. Hoogmartens; *Development and Validation of an Improved Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Oxytetracycline*; **2002**; Chromatographia; 56; 313-318
- [186] A.G. Kazemifard, D.E. Moore; *Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations*; **1997**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 16; 689-696
- [187] R.J. McCracken, W.J. Blanchflower, S.A. Haggan, D.G. Kennedy; *Simultaneous Determination of Oxytetracycline, Tetracycline and Chlortetracycline in Animal Tissues Using Liquid Chromatography, Post-column Derivatization With Aluminium, and Fluorescence Detection*; **1995**; Analyst; 120; 1763-1766
- [188] D.S. Vienneau, C.G. Kindberg; *Development and Validation of a sensitive method for tetracycline in gingival crevicular fluid by HPLC using fluorescence detection*; **1997**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 16; 111-117
- [189] K. Iwaki, N. Okumura, M. Yamazaki; *Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*; **1992**; J. Chromatogr.; 623; 153-158
- [190] A. Pena, A. Carmona, A. Barbosa, C. Lino, I. Silveira, B. Castillo; *Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection*; **1998**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 18; 839-845
- [191] W.M.A. Niessen; *Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 53-75
- [192] L. Romanyshyn, P.R. Tiller; C.E.C.A. Hop; *Bioanalytical applications of fast chromatography to high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometric quantitation*; **2000**; Rapid. Commun. Mass. Spectrom.; 14; 1662-1668
- [193] A.L. Burlingame, R.K. Boyd, S.J. Gaskell; *Mass spectrometry*; **1998**; Anal. Chem.; 70; 647R-705R
- [194] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, A. Cannavan, S.A. Hewitt; *Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 77-98
- [195] C.M. Lock, L. Chen, D.A. Volmer; *Rapid Analysis of Tetracycline Antibiotics by Combined Solid Phase Microextraction/High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*; **1999**; Rapid. Commun. Mass. Spectrom.; 13; 1744-1754
- [196] W.M.A. Niessen; *State-of-art in liquid chromatography-mass spectrometry*; **1999**; J. Chromatogr. A; 856; 179-197
- [197] A.K. Lykkeberg, B. Halling-Sørensen, C. Cornett, J. Tjørnelund, S.H. Hansen; *Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS*; **2004**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 34; 325-332
- [198] B. Halling-Sørensen, A. Lykkeberg, F. Ingerslev, P. Blackwell, J. Tjørnelund; *Characterization of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS*; **2003**; Chemosphere; 50; 1331-1342
- [199] W.C. Andersen, J.E. Roybal, S.A. Gonzales, S.B. Turnipseed, A.P. Pfenning, L.R. Kuck; U.S Food and Drug Administration; *Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry*; **2005**; Analytica Chimica Acta; 529 (1-2) 145-150
- [200] G. Alfredsson, C. Branzell, K. Granelli, A. Lundstroem; *Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by dipstick test and LC-MS/MS*; **2005**; Analytica Chimica Acta; 529 (1-2); 47-51
- [201] R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich; in: *A Global View of LC-MS*; Global View Publishing, Pittsburgh; 2<sup>nd</sup> Edition; **2002**
- [202] H. Budzikiewicz; in: *Massenspektrometrie*; Wiley-VCH, Weinheim; 4. Aufl.; **1998**; 74-75
- [203] R.A. Bethem, R.K. Boyd; *Mass Spectrometry in Trace Analysis*; **1998**; J. Am. Soc. Mass Spectrom.; 9; 643-648
- [204] F.W. McLafferty; *Tandem mass spectrometric analysis of complex biological mixtures*; **2001**; J. Mass. Spectrom.; 212; 81-87
- [205] X. Tong, I.E. Ita, J. Wang, J.V. Pivnichny; *Characterization of a technique for rapid pharmacokinetic studies of multiple co-eluting compounds by LC-MS/MS*; **1999**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 20; 773-784
- [206] W. Mück; *Quantitative analysis of pharmacokinetic study samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*; **1999**; Pharmazie; 54 (9); 639-644
- [207] E. Gelpi; *Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry*; **1995**; J. Chroma-

- togr. A; 703; 59-80
- [208] H. Oka, H. Nakazawa, K.I. Harada, J.D. MacNeil; *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*; AOAC International, Arlington; **1995**
- [209] A.M. Kamel, P.R. Brown, B. Munson; *Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Tetracycline, Oxytetracycline, Chlorotetracycline, Minocycline, and Methacycline*; **1999**; Anal. Chem.; 71; 968-977
- [210] W.J. Blanchflower, R.J. McCracken, A.S. Haggan, D.G. Kennedy; *Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry*; **1997**; J. Chromatogr. B; 692; 351-360
- [211] H. De Ruyck, H. De Ridder, R. Van Renterghem, F. Van Wambeke; *Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to feeding trial*; **1999**; Food Addit. Contam.; 16 (2); 47-56
- [212] C.R. White, W.A. Moats, K.L. Faecesula; *Optimization of a liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk*; **1993**; AOAC international; 76; 549-554
- [213] J.P. Sharma, R.F. Beville; *Improved high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of tetracyclines in plasma, urine and tissues*; **1978**; J. Chromatogr.; 166; 213-220
- [214] J. Scheurer, C.M. Moore; *Solid-Phase Extraction of Drugs from Biological Tissues-A Review*; **1992**; J. Anal. Toxicol.; 16; 264-269
- [215] E.J. Mulders, D. Van De Lademaat; *Determination of residues of Tetracycline antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography*; **1990**; J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 7 (12) 1829-1835
- [216] N. Furusawa; *High-Performance Liquid Chromatographic Determination/Identification of Oxytetracycline and Sulphadimidine in Meat and Eggs*; **1999**; 49 (7); 369-373
- [217] Macherey-Nagel SPE Applikation 203; *Tetracycline aus Muskulatur*; **1998**
- [218] Y. Ikai, H. Oka, N. Kawamura, M. Yamada, K.-I. Harada, M. Suzuki; *Systematic simultaneous Analysis of residual tetracyclines in animal tissues using thin-layer and high-performance liquid chromatography*; **1987**; J. Chromatogr.; 411; 313-323
- [219] H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura; *A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using tandem cartridge clean up system*; **1987**; J. Chromatogr.; 389; 417-426
- [220] H. Oka, H. Matsumoto, K. Uno, K.-I. Harada, S. Kadowaki, M. Suzuki; *Application of prepacked C<sub>18</sub> cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver*; **1985**; J. Chromatogr.; 325; 265-274
- [221] H. Oka, Y. Ikai, Y. Ito, J. Hayakawa, K.-I. Harada, M. Suzuki, H. Odani, K. Maeda; *Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by electrospray high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; **1997**; J. Chromatogr. B; 693; 337-344
- [222] H. Kataoka, H.L. Lord, S. Yamamoto, S. Narimatsu, J. Pawliszyn; *Development of Automated In-Tube SPME/LC/MS Method for Drug Analysis*; **2000**; J. Microcolumn Separations; 12 (9); 493-500
- [223] D.A. Volmer; *Neue Methoden in der MS für die schnelle Analyse biomedizinisch relevanter Wirkstoffe*; **1998**; Chemie in Labor und Biotechnik, 49 (11); 414-420
- [224] W.H.H. Farrington, J. Tarbin, J. Bygrave, G. Shearer; *Analysis of trace residues of tetracyclines in animal tissues and fluids using metal chelate affinity chromatography/HPLC*; **1991**; Food Addit. Contam.; 8 (1); 55-64
- [225] A.D. Cooper, G.W.F. Stubbings, M. Kelly, J.A. Tarbin, W.H.H. Farrington, G. Shearer; *Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography-high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 321-326
- [226] *Bestimmung von Rückständen an Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin und deren Epimeren, Doxycyclin und Demeclocyclin in Milch-HPLC-Methode*; in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; **2000**
- [227] BgVV; *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)*; **1995**; Bundesgesundheitsbl.; 10; 410-413
- [228] A.R. Long, L.C. Hsieh, M.S. Malbrough, C.S. Short, S.A. Barker; *Matrix solid phase dispersion and liquid chromatographic determination of oxytetracycline in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue*; **1990**; J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 73; 864-867
- [229] G. Zurhelle, M. Petz, E. Müller-Seitz, E. Siewert; *Tetracyclines and their metabolites in egg white and yolk*; **1999**; Z. Lebensm. Unters. Forsch. A; 208; 299-300
- [230] H.W.M. Bisschop, D.J. Radstake, A.G. Stern; *On-line dialyse as a tool in the analysis of residues of veterinary drugs*; **2000**; in: EUORESIDUE IV (Vol.1): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 220-225
- [231] R.W. Fedeniuk, P.J. Shand; *Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 3-15
- [232] P. Vinas, N. Balsalobre, C. Lopez-Erroz, M. Hernandez, Cordoba; *Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey*; **2004**; J. Chromatogr. A; 1022; 125-129
- [233] J. Ding, U.D. Neue; *A New Approach to the Effective Preparation of Plasma Samples for Rapid Drug Quantitation Using On-line Solid-Phase Extraction Mass Spectrometry*; **1999**; Rapid. Commun. Mass Spectrom.; 13; 2151-2159
- [234] N.C. Dias, C.F. Poole; *Mechanistic Study of the Sorption Properties of Oasis® HLB and its Use in Solid-Phase Extrac-*

- tion; **2002**; Chromatographia; 56; 269-275
- [235] J. Zhu, D.D. Snow, D.A. Cassada, S.J. Monson, R.F. Spalding; *Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; **2001**; J. Chromatogr. A; 928; 177-186
- [236] S. Reverte, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marce; *Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry*; **2003**; J. Chromatogr. A; 1010; 225-232
- [237] S.-P. Khong, Y.-A. Hammel, P.A. Guy; *Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*; **2005**; Rapid Commun. Mass Spectrom.; 19 (4); 493-502
- [238] N. Haagsma, M.J.B. Marcel; *A rapid fluorimetric screening method for chlortetracycline, oxytetracycline, and tetracycline in pig meat and kidney tissues*; **1989**; Zeitsch. für Lebensmitteluntersuchung und Forschung; 188 (3); 227-231
- [239] N. Van Eeckhout, J. Castro Perez, J. Cllaereboudt, R. Vandeputte, C. Van Peteghem; *Determination of tetracyclines in bovine kidney by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line extraction and clean-up*; **2000**; Rapid. Commun. Mass. Spectrom.; 14; 280-285
- [240] B. Bergner-Lang, E. Mikisch; *Zur Bedeutung von Oxytetracyclin-, Tetracyclin- und Chlortetracyclin-Rückständen bei der HPLC-Bestimmung in Lebensmitteln tierischer Herkunft*; **1994**; Deutsch. Lebensm. Rundsch.; 90 (2); 39-41
- [241] G. Schwartzman, L. Wayland, T. Alexander, K. Furnkranz, G. Selzer; *Chlortetracycline Hydrochloride*; **1979**; Analytical Profiles of Drug Substances; Vol. 8; Academic Press; 101-137
- [242] V.H. Vartanian, B. Goolsby, J.S. Brodbelt; *Identification of Tetracycline Antibiotics by Electrospray Ionization in a Quadrupole Ion Trap*; **1998**; J. Am. Soc. Mass Spectrom.; 9; 1089-1098
- [243] A. Di Corcia, M. Nazzari; *Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products*; **2002**; J. Chromatogr. A; 974; 53-89
- [244] S. Kromidas; in: *Qualität im analytischen Labor*; VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim; 1. Aufl.; **1995**; 181-206
- [245] S. Horii; *Liquid chromatographic Determination of Oxytetracycline and Chlortetracycline Residues in Animal Tissues*; **1994**; J. Liquid Chromatogr.; 17 (1); 213-221
- [246] J. Hoogmartens; *Liquid Chromatography of Chlortetracycline*; **1993**; Pharmeuropa; 5 (2); 149-150
- [247] F. Kondo, S. Morikawa, S. Tateyama; *Simultaneous Determination of Six Tetracyclines in Bovine Tissue, Plasma and Urine by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*; **1989**; J. Food Protection; 52 (1); 41-44
- [248] R.K. Boyd; *Quantitative Trace Analysis by Combined Chromatography and Mass Spectrometry Using External and Internal Standards*; **1993**; Rapid Commun. Mass Spectrom.; 7; 257-271
- [249] B.W. LeDuc, D.J. Greenblatt, H. Friedman; *Automated high-performance liquid chromatographic analysis of tetracycline in urine*; **1989**; J. Chromatogr.; 490; 474-477
- [250] B.G. Charles, J.J. Cole, P.J. Ravenscroft; *Method for rapid determination of urinary tetracycline by high-performance liquid chromatography*; **1981**; J. Chromatogr.; 222; 152-155
- [251] C. Eckers, J.D. Henion, G.A. Maylin, D.S. Skrabalak, J. Vessman, J.C. Greenfield; *Micro LC/MS Applications: Steroids, Antibiotics and other biological active compounds*; **1983**; Int. J. Mass Spectrom.; 46; 205-208
- [252] A. Weimann, G. Bojesen; *Analysis of tetracyclines in raw urine by column-switching high-performance liquid chromatography and mass spectrometry*; **1999**; J. Chromatogr. B; 721; 47-54
- [253] H. Greiling, A. M. Gressner; in: *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*; Schattauer Verlag, Stuttgart; 2. Aufl.; **1989**; 31-38, 928-940
- [254] W. Pschyrembel; in: *Klinisches Wörterbuch*; de Gruyter Verlag, Berlin; 257. Aufl.; **1994**
- [255] G. Jander; in: *Maßanalyse*; Walter de Gruyter Verlag; 14. Aufl.; **1986**
- [256] R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W. Winkelman; in: *Clinical Chemistry*; Harper & Row Publisher Hagerstowns, 2. Aufl.; **1974**
- [257] J.M. Prevosto, B. Beraud, V. Cheminel, Y. Gaillard, C. Mounier, J.F. Chaulet; *Determination of doxycycline in human plasma and urine samples by high-performance liquid chromatography. Application for drug monitoring in malaria chemoprophylaxis*; **1995**; Ann. Biol. Clin.; 53; 29-32
- [258] A. Weimann, G. Bojesen; *Analysis of tetracycline, Oxytetracycline and chlortetracycline in Plasma Extracts by electrospray tandem mass-spectrometry and liquid chromatography*; **1998**; Anal. Lett.; 31 (12); 2053-2066
- [259] M. Hernandez, F. Borrull, M. Calull; *Determination of Oxytetracycline and Some Impurities in Plasma by Non-Aqueous Capillary Electrophoresis Using Solid-Phase Extraction*; **2000**; Chromatographia; 52; 279-284
- [260] X.-H. Chen, J.-P. Franke, K. Ensing, J. Wijsbeek, R.A. de Zeeuw; *Pitfalls and Solutions in the Development of a Fully Automated Solid-Phase Extraction Method for Drug Screening Purposes in Plasma and Whole Blood*; **1993**; J. Anal. Toxicol.; 17; 421-426
- [261] M.D.F. Santos, H. Vermeersch, J.P. Remon, M. Schelkens, P. De Backer, R. Ducatella, F. Haesebrouck; *Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma*; **1996**; J. Chromatogr. B; 682; 301-308
- [262] D. Farin, G. Piva, I. Gozlan, R. Kitzes; *High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Doxycycline in Human Plasma*; **1998**; Chromatographia; 47; 547-549
- [263] H.J. Mascher; *Determination of minocycline in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection after liquid-liquid extraction*; **1998**; J. Chromatogr. A; 812; 339-342



- [264] S.P. Katrukha, E.T. Gneushev, V.G. Kukes; *Determination of tetracyclines in plasma by high-performance liquid chromatography*; **1981**; Siberian Scientific-Research Institute of Pulp and Paper; 3; 379-383
- [265] M.A. Rudek, C.L. March, K.S. Bauer Jr., J.M. Pluda, W.D. Figg; *High-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection for quantitating COL-3, a chemically modified tetracycline, in human plasma*; **2000**; J. Pharm. Biom. Anal.; 22; 1003-1014
- [266] W. Naidong, H. Bu, Y.-L. Chen, W.Z. Shou, X. Jiang, T.D.J. Halls; *Simultaneous development of six LC-MS-MS methods for the determination of multiple analytes in human plasma*; **2002**; J. Pharm. Biomed. Anal.; 28; 1115-1126
- [267] Y. Hsieh, M.S. Bryant, G. Gruela, J.-M. Brisson, W.A. Korfmacher; *Direct analysis of plasma samples for drug discovery compounds using mixed-function column liquid chromatography tandem mass spectrometry*; **2000**; Rapid. Commun. Mass Spectrom.; 14; 1384-1390
- [268] W.A. Moats; *Determination of tetracycline antibiotics in tissues and blood serum of cattle and swine by high-performance liquid chromatography*; **1986**; J. Chromatogr.; 358 (1); 253-259
- [269] C.A. Kan, H.J. Keukens, E. Boers; *Nicarbazin Residues in Broiler Muscle, Liver and Litter/Faeces: Early Exposure or Recirculation*; **1996**; in: EUORESIDUE III (Vol.2): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 591-595
- [270] T. Hamoir, D. Courtheyn, H. De Brabander, P. Delahaut, F. Smets, L. Hendriks, G. Pottie; *Recent Developments in the Isolation and Detection of Anabolics in Faeces*; **1996**; in: EUORESIDUE III (Vol.1): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 471-475
- [271] J. van Dijk, H.J. Keukens; *The stability of some veterinary drugs and coccidiostats during composting and storage of laying hen and broiler faeces*; **1996**; in: EUORESIDUE III (Vol.2): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 357-360
- [272] J. Sunderland, A.M. Lovering, C.M. Tobin, A.P. MacGowan, J.M. Roe, A.A. Delson; *Determination by HPLC of chlortetracycline in pig feces*; **2003**; Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 52 (1); 135-137
- [273] G. Hamscher, S. Sczesny, H. Höper, H. Nau; *Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*; **2002**; Anal. Chem.; 74, 1509-1518
- [274] R. Böhm; *Auswirkungen von Rückständen von Antiinfektiva in tierischen Ausscheidungen auf die Güllebehandlung und den Boden*; **1996**; Dtsch. tierärztl. Wschr.; 103; 264-268
- [275] G. Hamscher, S. Sczesny, A. Abu-Qare, H. Höper, H. Nau; *Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden*; **2000**; Dtsch. tierärztl. Wschr.; 107; 332-334
- [276] M.-L. Loke, S. Jespersen; R. Vreeken, B. Halling-Sørensen; J. Tjørnelund; *Determination of oxytetracycline and its degradation products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobis test systems*; **2003**; J. Chromatogr. B; 783; 11-23
- [277] M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag; *Fate of Antibiotics in food chain and environment originating from pigfattening (Part 1)*; **2004**; Fresenius Envir. Bull.; 13 (11 b); 1216-1224
- [278] A.D. Cooper, J.A. Tarbin, W.H.H. Farrington, G. Shearer; *Effects of extraction and spiking procedures on the determination of incurred residues of oxytetracycline in cattle kidney*; **1998**; Food Addit. Contam.; 15 (6); 645-650
- [279] J.M. Degroot, B. W. De Bukanski, S. Srebrnik; *Multiresidue Analysis of tetracyclines in kidney by HPLC and Photodiode Array Detection*; **1993**; J. Liquid Chromatogr.; 16 (16); 3515-3529
- [280] E.E. Martinez, W. Shimoda; *Liquid Chromatographic Determination of Tetracycline Residues in Animal Feeds*; **1987**; Food and Drug Administration; Animal Drug Research Center; Denver, CO 80225
- [281] R.D. Caballero, J.R. Torres-Lapasio, M.C. Garcia-Alvarez-Coque; G. Ramis-Ramos; *Rapid Liquid Chromatographic Determination of Tetracyclines in Animal Feeds Using a Surfactant Solution as Mobile Phase*; **2002**; Anal. Lett.; 35 (4); 687-705
- [282] H. Oka, H. Matsumoto, K. Uno, K.-I. Harada, S. Kadowaki, M. Suzuki; *Improvement of Chemical Analysis of Antibiotics- VIII. Application of Prepacked C18 Cartridge for the Analysis of Tetracycline Residues in Animal Liver*; **1985**; J. Chromatogr.; 325; 265-274
- [283] H. Oka, K. Uno, K.-I. Harada, K. Yasaka, M. Suzuki; *Improvement of Chemical Analysis of Antibiotics- V. A Simple Method for the analysis of Tetracyclines using reversed-phase high-performance liquid chromatography*; **1984**; J. Chromatogr.; 298; 435-443
- [284] K. Frgalova, A. Hera, J. Valova; *Determination of oxytetracycline in tissue of veal calves by high performance liquid chromatography and ELISA*; **1996**; in: EUORESIDUE III (Vol.1): Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food (Veldhoven, The Netherlands); 407-410
- [285] U. Körner, M. Kühne, S. Wenzel; *Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 1: Methodology and examination of field samples*; **2001**; Food Addit. Contam.; 18 (4); 293-302
- [286] M. Kühne, U. Körner, S. Wenzel; *Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: The effect of heat treatments on bound tetracycline residues*; **2001**; Food Addit. Contam.; 18 (7); 593-600
- [287] V. Neitzel, K. Middeke; in: *Praktische Qualitätssicherung in der Analytik*; VCH-Verlag mbH, Weinheim; 1. Aufl.; **1994**
- [288] S. Kromidas; in: *Validierung in der Analytik*; WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim; 1. Aufl.; **1999**
- [289] S. Kromidas; in: *Handbuch Validierung in der Analytik*; WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim; 1. Aufl.; **2000**



- [290] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert; in: *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*; VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim; 1. Aufl.; **1992**
- [291] Deutsche Institut für Normung e.V.; DIN EN ISO/IEC 17025; *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*; **2000**
- [292] FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); *Reviewer Guidance – Validation of Chromatographic Methods*; **1994**
- [293] Deutsche Institut für Normung e.V.; DIN 32645; *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung*; **1994**
- [294] ICH: Q2A; *Guideline for industry, text on validation of analytical procedures: definitions and terminology*; **1995**; International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use
- [295] ICH: Q2B; *Guidance for industry, validation of analytical procedures: methodology*; **1996**; International Conference on Harmonisation
- [296] EU-Richtlinie 2002/657/EG; Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 221; *Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen*; **2002**
- [297] Empfehlung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft auf Vorschlag ihrer Arbeitsgruppe „Pharmakologisch wirksame Stoffe“: *Validierung von Verfahren zur Untersuchung auf pharmakologisch wirksame Stoffe im Routinelabor*; **2003**; Lebensmittelchemie; 57; 73-104 (Anlage 3)
- [298] S. Kromidas, R. Klinkner, R. Mertens; *Methodenvalidierung im analytischen Labor*; **1995**; Nachr. Chem. Tech. Lab.; 43 (6); 669-676
- [299] V. Neitzel; *Die Kalibration von Analysenverfahren (Teil 1): Lineare Kalibrierfunktionen*; **2002**; CLB Chemie in Labor und Biotechnik; 53 (1); 9-13
- [300] V. Neitzel; *Die Kalibration von Analysenverfahren (Teil 2): Nicht lineare Kalibrierfunktionen*; **2002**; CLB Chemie in Labor und Biotechnik; 53 (2); 44-47
- [301] V. Neitzel; *Die Kalibration von Analysenverfahren (Teil 3): Besondere Kalibrierfunktionen*; **2002**; CLB Chemie in Labor und Biotechnik; 53 (3); 90-93
- [302] IUPAC; *Richtlinien zur Nomenklatur in der Chromatographie*; **1993**; Pure and Applied Chemistry; 65; 819-872
- [303] F. Mandel; *LC/MS(/MS)-Kopplung*; **2001**; Labo Trend; 66; 40-46
- [304] A.L. Cinquina, F. Lomgo, G. Anastasi, L. Giannetti, R. Cozzani; *Validation of a high performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle*; **2003**; J. Chromatogr. A; 987; 227-233
- [305] B.K. Choi, D.M. Hercules, A.I. Gusev; *Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression*; **2001**; J. Chromatogr. A; 907; 337-342
- [306] B. Law, D. Temesi; *Factors to consider in the development of generic bioanalytical high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric methods to support drug discovery*; **2000**; J. Chromatogr. B; 748; 21-30
- [307] G. Balizs, A. Hewitt; *Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry*; **2003**; Analytica Chimica Acta; 492; 105-131
- [308] R.E. Ardrey; in: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*; WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim; 1. Aufl.; **2003**
- [309] M. Stüber, T. Reemtsma; *Evaluation three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS*; **2004**; 378 (4); 910-916
- [310] M. Cherlet, M. Schelkens, S. Croubels, P. De Backer; *Quantitative multi-residue analysis of chlortetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry*; **2003**; Anal. Chim. Acta; 492; 199-213
- [311] G. Hamscher, H.T. Pawelzick, S. Szesny, H. Nau, J. Hartung; *Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers?*; **2003**; Environmental Health Perspective; 111 (13); 1590-1594
- [312] A. Vockel, H.-A. Wagener, W. Klemm, K. Röwer, A. Mehlich, M. Grote; *Bestimmung von Tetracyclinrückständen mittels LC-MS/MS in lebensmittelliefernden Schweinen*; **2001**; Lebensmittelchemie; 55; 67-68
- [313] A. Vockel, K. Röwer, K. Vogel, A. Mehlich, M. Stolz, B. Brand, M. Grote; Sonderprogramm Verbraucherschutz 2000-2002; Abschlußbericht: „Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung“; **2004**; Hrsg.: Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes NRW, Düsseldorf; www.lej.nrw.de
- [314] C.R. Kilroy, W.F. Hall, D.P. Bane, R.F. Bevil, G.D. Koritz; *Chlortetracycline in swine - bioavailability and pharmacokinetics in fasted and fed pigs*; **1990**; J. Vet. Pharmacol. Therap.; 13 (1); 49-58
- [315] R.G. Kelly, L.A. Kanegis; *Tissue Distribution of Tetracycline*; **1967**; Toxicol. Appl. Pharmacol.; 11 (1); 114-120
- [316] R.G. Kelly, L.A. Kanegis; *Metabolism and tissue distribution of radioisotopically labeled minocyclin*; **1967**; Toxicol. Appl. Pharmacol.; 11 (1); 171-183
- [317] R. Kroker; *Aspects of the elimination of antibiotics after treatment of domestic animals*; **1983**; Wissenschaft und Umwelt; 4; 305-308
- [318] C. Winckler, A. Grafe; *Use of veterinary drugs in intensive animal production; evidence for persistence of tetracycline in pig slurry*; **2001**; J. soils sed.; 1 (2); 66-70

- [319] J. Brüggemann, M. Merkenschlager, K.-H. Niesar; *Bilanzstudien mit C14-Chlortetracyclin an der Legehennen unter den Bedingungen der Antibiotikafütterung*; **1963**; Zbl. Vet. Med.; Reihe B; Band 10 (7); 631-648
- [320] J.D.G. McEvoy, S.R.H. Crooks, C.T. Christopher, W.J. McCaughey, D.G. Kennedy; *Origin of chlortetracycline in pig tissue*; **1994**; Analyst; 119 (12); 2603-2606
- [321] B. Halling-Sørensen, G. Sengelov, J. Tjørnelund; *Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria*; **2002**; Arch. Environ. Contam. Toxicol.; 42; 263-271
- [322] M. Kühne, S. Wenzel; *4-epi chlortetracycline residues in muscle*; **2001**; Arch. Lebensmittelhyg.; 52; 25-48
- [323] M. Petz; *Bestimmung von Rückständen an Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in Muskulatur und Niere vom Schwein*; **1996**; Lebensmittelchemie; 50; 33-38
- [324] Bundesanzeiger Jg. 54 Nr. 44: *Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung nach dem Fleischhygienegesetz und dem Geflügelfleischhygienegesetz* (AVV Fleischhygiene - AVVFIH) (**05.03.2002**)
- [325] DIN 58940 Teil 1-6: *Medizinische Mikrobiologie: Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika*
- [326] 45. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin, **15.-16.06.1992**
- [327] 47. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin, **21.-23.06.1994**
- [328] B. Halling-Sørensen, G. Sengelov, J. Tjørnelund; *Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria*; **2002**; Arch. Environ. Contam. Toxicol.; 42; 263-271
- [329] T. Sasaki, N.S. Ramamurthy, L.M. Golub; *Bone Cells and Matrix Bind Chemically Modified Non-Antimicrobial Tetracycline*; **1994**; Bone; 15 (3); 373-375
- [330] D.A. Buyske, H.J. Eisner, R.G. Eisner; *Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone*; **1960**; J. Pharmacol. Exp. Therap.; 130; 150-156
- [331] Ellenberger, Baum; in: *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*; Springer Verlag, Berlin; 18. Aufl.; **1977**
- [332] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel; in: *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; 2. Aufl.; **1982**; 27-53
- [333] R. Ramounet; P. Fritsch; *The distribution of plutonium between the mineral and organic components of rat bones: a biochemical study after in vivo and in vitro contamination*; **1998**; Int. J. Radiat. Biol.; 73; 83-88
- [334] R. Nickel, A. Schummer, E. Seiferle; in: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*; Paul Parey Verlag für Landwirtschaft, Veterinärmedizin, Gartenbau und Forstwesen, Berlin; Band 1; 3. Aufl.; **1968**
- [335] G. Kullmer; in: *Fortschritt-Berichte VDI: Biomechanische Analysen des menschlichen Bewegungsapparats mit Hilfe der Finite-Elemente-Methode*; VDI-Verlag, Düsseldorf; **2000**; 10-15
- [336] H. Plonait; in: *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*; Parey Buchverlag, Berlin; 2. Aufl.; **1997**
- [337] H. Helwig; *Antibiotika-Chemotherapeutika-Grundlagen-Anwendung-Gefahren-Ein Leitfaden für die Praxis*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 3. Aufl.; **1976**; 235-244
- [338] M. Kühne, U. Körner; *Bound chlortetracycline residues in bones: release under acidic conditions*; **2001**; Fd. Chem.; 72; 41-44
- [339] J. Brüggemann, U. Lösch, M. Merkenschlager, I. Offterdinger; *Ablagerung von Tetracyclin im Knochengewebe von Tieren bei dem Zusatz von Tetracyclin zum Futter*; **1966**; Zentralbl. Veterinarmed. A.; 13; 59-74
- [340] M. Kühne, G. Hamscher, D. Schedl, S. Wenzel; *Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal-derived feed contaminated with tetracycline*; **2001**; Food Chemistry; 75; 423-429
- [341] H. Spörri, H. Stünzi; in: *Pathophysiologie der Haustiere*; Paul Parey Verlag für Landwirtschaft, Veterinärmedizin, Gartenbau, Forst- und Jagdwesen, Berlin; 1. Aufl.; **1969**; 554-580
- [342] M. Kühne, A.T. Mitscherling; *Zum Eintrag von gebundenen Tetracyclin-Rückständen in die Nahrungskette- Ein Beitrag zur Gefahrenidentifikation*; **2004**; Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.; 117; 201-206
- [343] M. Kühne; *Untersuchungen zum Vorkommen von Tetracyclin-Rückständen bei Puten*; **1998**; Fleischwirtschaft; 78 (4); 369-370
- [344] M. Kühne, S. Wegmann, A. Kobe, R. Fries; *Tetracycline residues in bones of slaughtered animals*; **2000**; Food Control; 11; 175-180
- [345] A. Klein; *Untersuchung zur fluoreszenzspektroskopischen Erfassung von Tetracyclin*; **2004**; Dissertation; Tierärztliche Hochschule Hannover
- [346] C.H. Bachmann, E.H. Ellis; *Fluorescence of bone*; **1965**; Nature; 206; 1328-1331
- [347] J. Brüggemann, U. Lösch, M. Merkenschlager, I. Offterdinger; *Deposition of tetracycline in the bones of animals given it in their food*; **1966**; Zbl. Vet. Med.; 13 (1); 59-74
- [348] persönliche Mitteilung; Herr Dr. A. Berk; Bundesforschungsanstalt Braunschweig-Völkenrode (FAL)
- [349] R.G. Kelly, D.A. Buyske, Lederle Labs.; *Metabolism of tetracycline in rat and dog*; **1960**; J. Pharmacol. Experim. Therapeutics; 130; 144-149
- [350] H. Bader; in: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*; VCH Verlag, Weinheim; 2. Aufl.; **1985**; 4-32

## A Anhang

### INHALTSVERZEICHNIS

<b>A.1 Medikationsstudien .....</b>	<b>3</b>
<b>A. 1.1 Haus Düsse-Studie.....</b>	<b>3</b>
<b>A. 1.2 FAL-Studie.....</b>	<b>4</b>
<b>A.2 Wiederholpräzision .....</b>	<b>9</b>
<b>A.3 Langzeitstabilität von CTC und e-CTC .....</b>	<b>9</b>
<b>A.4 Ausreißertest nach GRUBBS .....</b>	<b>10</b>
<b>A.5 Linearität des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC .....</b>	<b>11</b>
<b>A. 5.1 Kalibrierdaten .....</b>	<b>11</b>
<b>A. 5.2 Kalibriergeraden .....</b>	<b>12</b>
<b>A. 5.3 Anpassungstest nach MANDEL .....</b>	<b>14</b>
<b>A. 5.4 Residualanalyse .....</b>	<b>18</b>
<b>A. 5.5 Varianzhomogenität.....</b>	<b>19</b>
<b>A. 5.6 Absicherung der unteren Arbeitsgrenze .....</b>	<b>21</b>
<b>A. 5.7 Verfahrenskennndaten.....</b>	<b>22</b>
<b>A.6 Wiederfindungsfunktion.....</b>	<b>24</b>
<b>A. 6.1 Berechnung der Wiederfindungsfunktion .....</b>	<b>24</b>
<b>A. 6.2 Wiederfindungsfunktionen von CTC dotierter Extraktionsmittel.....</b>	<b>25</b>
<b>A. 6.3 Wiederfindungsfunktionen von CTC dotierter Muskulaturproben .....</b>	<b>25</b>
<b>A. 6.4 Interpretation der Wiederfindungsfunktion und Kontrolle der Analysenpräzision .....</b>	<b>26</b>
<b>A. 6.5 Ermittlung der Vertrauensbereiche für <math>a_f</math> und <math>b_f</math>.....</b>	<b>26</b>
<b>A. 6.6 Prüfung auf systematische Abweichungen.....</b>	<b>26</b>
<b>A. 6.7 Wiederfindung.....</b>	<b>27</b>
<b>A.7 Kalibrierung des HPLC-UV-Verfahrens zur Bestimmung von iso-CTC und e-iso-CTC .....</b>	<b>28</b>
<b>A.8 Kalibrierung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC.....</b>	<b>30</b>
<b>A.9 Analysenvorschrift zur Bestimmung von CTC und Metabolite in Muskulatur, Leber, Niere, Urin, Plasma, Knochen und Faeces .....</b>	<b>32</b>
<b>A. 9.1 Zweck und Anwendungsbereich .....</b>	<b>32</b>

---

<b>A. 9.2 Liste der erfaßbaren Stoffe.....</b>	<b>32</b>
<b>A. 9.3 Prinzip .....</b>	<b>32</b>
<b>A. 9.4 Reagenzien.....</b>	<b>32</b>
<b>A. 9.5 Geräte .....</b>	<b>33</b>
<b>A. 9.6 Probenvorbereitung .....</b>	<b>33</b>
<b>A. 9.7 HPLC-UV-MS/MS-Messung .....</b>	<b>35</b>

## A.1 Medikationsstudien

### A. 1.1 Haus Düsse-Studie

Tab. A. 1: CTC-Gehalt ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Urin der Versuchstiere (LC-MS/MS) ( $n = 2$ )

Tier	CTC-Gehalt ( $\Sigma$ CTC + e-CTC) [ $\mu\text{g/L}$ ]						
	Einst.allung	Wochen nach Medikation					
		0	2	4	6	8	10
V 1	0	13530	493	166	122	95	39
V 2	0	18080	401	125	143	51	47
V 3	0	441	63	46	20	10	6
V 4	0	3241	374	125	89	68	39
V 5	0	6551	355	165	313	126	96
V 6	0	11676	743	290	203	116	46
V 7	0	21990	889	503	384	199	100
V 8	0	11618	646	199	442	118	105
V 9	0	8487	397	254	115	112	76
V 10	0	3298	563	-	-	-	75
V 11	0	3944	430	426	315	283	97
V 12	0	8576	734	146	256	87	65

Tab. A. 2: CTC-Gehalte ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Knochen der Kontrolltiere (LC-MS/MS) ( $n = 2$ )

Tier	Konzentration [ $\mu\text{g/kg}$ ]
K 1	185
K 2	163
K 3	219
K 4	170
K 5	184
K 6	185
K 7	199
K 8	193
K 9	188
K 10	194
K 11	195
K 12	201

## A. 1.2 FAL-Studie

Tab. A. 3: Dosierung des eingesetzten Arzneimittels in der 1. Medikationsphase

Tiernummer		93	94	95	96	97
Körpergewicht am 16.7. [kg]		68,0	68,0	74,6	73,8	72,6
Fütterungszeitpunkt		Arzneimittelmenge pro Mahlzeit [g]				
16.07.01	Nachmittag	3,40	3,40	3,73	3,69	3,63
17.07.01	Vormittag	3,40	3,40	3,73	3,69	3,63
	Nachmittag	3,40	3,40	3,73	3,69	3,63
18.07.01	Vormittag	3,40	3,40	3,73	3,69	3,63
	Nachmittag	3,50	3,50	3,83	3,79	3,73
19.07.01	Vormittag	3,50	3,50	3,83	3,79	3,73
	Nachmittag	3,50	3,50	3,83	3,79	3,73
20.07.01	Vormittag	3,50	3,50	3,83	3,79	3,73
	Nachmittag	3,60	3,60	3,93	3,89	3,83
21.07.01	Vormittag	3,60	3,60	3,93	3,89	3,83
	Nachmittag	3,60	3,60	3,93	3,89	3,83
22.07.01	Vormittag	3,60	3,60	3,93	3,89	3,83
	Nachmittag	3,70	3,70	4,03	3,99	3,93
23.07.01	Vormittag	3,70	3,70	4,03	3,99	3,93
	Nachmittag	3,70	3,70	4,03	3,99	3,93
24.07.01	Vormittag	3,70	3,70	4,03	3,99	3,93
	Nachmittag	3,80	3,80	4,13	4,09	4,03
25.07.01	Vormittag	3,80	3,80	4,13	4,09	4,03
	Nachmittag	3,80	3,80	4,13	4,09	4,03
26.07.01	Vormittag	3,80	3,80	4,13	4,09	4,03

Arzneimittel: Chlortetracyclin 100 (1000 g des Präparates enthält 100 g des Wirkstoffes CTC)

Tab. A. 4: Dosierung des eingesetzten Arzneimittels in der 2. Medikationsphase

Tiernummer		93	94	95	96	97
Körpergewicht am 06.08. [kg]		88,2	87,0	93,0	91,4	91,2
Fütterungszeitpunkt		Arzneimittelmenge pro Mahlzeit [g]				
06.08.01	Nachmittag	4,41	4,35	4,65	4,57	4,56
07.08.01	Vormittag	4,41	4,35	4,65	4,57	4,56
	Nachmittag	4,41	4,35	4,65	4,57	4,56
08.08.01	Vormittag	4,41	4,35	4,65	4,57	4,56
	Nachmittag	4,51	4,45	4,75	4,67	4,66
09.08.01	Vormittag	4,51	4,45	4,75	4,67	4,66
	Nachmittag	4,51	4,45	4,75	4,67	4,66
10.08.01	Vormittag	4,51	4,45	4,75	4,67	4,66
	Nachmittag	4,61	4,55	4,85	4,77	4,76
11.08.01	Vormittag	4,61	4,55	4,85	4,77	4,76
	Nachmittag	4,61	4,55	4,85	4,77	4,76
12.08.01	Vormittag	4,61	4,55	4,85	4,77	4,76
	Nachmittag	4,71	4,65	4,95	4,87	4,86
13.08.01	Vormittag	4,71	4,65	4,95	4,87	4,86
	Nachmittag	4,71	4,65	4,95	4,87	4,86
14.08.01	Vormittag	4,81	4,75	5,05	4,97	4,96
	Nachmittag	4,81	4,75	5,05	4,97	4,96
15.08.01	Vormittag	4,81	4,75	5,05	4,97	4,96
	Nachmittag	4,81	4,75	5,05	4,97	4,96
16.08.01	Vormittag	4,81	4,75	5,05	4,97	4,96

Arzneimittel: Chlortetracyclin 100 (1000 g des Präparates enthält 100 g des Wirkstoffes CTC)

Tab. A. 5: Zugeführte Futtermengen und ausgeschiedene Mengen an Urin und Faeces der einzelnen Tiere in der 1. Medikationsphase

	17.07.	18.07.	19.07.	20.07.	21.07.	22.07.	23.07.	24.07.	25.07.	26.07.	Mittel Pro Tag
<b>Tier 93</b>											
Futter [g]	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
Faeces [g]	868	1165	712	1355	1516	1517	1654	949	1444	1405	1259
Urin [g]	913	2268	1096	1673	963	2089	1993	1993	1763	2466	1722
<b>Tier 94</b>											
Futter [g]	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
Faeces [g]	323	1786	2145	1512	1470	1553	1683	1501	1523	1628	1512
Urin [g]	2416	2972	2042	2323	2097	2520	1834	2709	2574	2289	2378
<b>Tier 95</b>											
Futter [g]	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
Faeces [g]	843	1893	1990	1628	1270	1683	1408	1597	1590	1589	1549
Urin [g]	1277	1524	2200	1946	2149	1479	1950	1378	2297	1702	1790
<b>Tier 96</b>											
Futter [g]	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
Faeces [g]	1200	1215	924	1586	1414	945	1682	1680	1529	1320	1350
Urin [g]	1848	3953	2667	4308	2900	2804	4150	3875	3192	2749	3245
<b>Tier 97</b>											
Futter [g]	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400	2400
Faeces [g]	1741	1194	1483	1822	1303	1746	1392	1693	1672	1306	1535
Urin [g]	3577	3672	3138	3681	3734	4299	4009	3257	3468	4008	3684

Tab. A. 6: Zugeführte Futtermengen und ausgeschiedene Mengen an Urin und Faeces der einzelnen Tiere in der 2. Medikationsphase

	07.08.	08.08.	09.08.	10.08.	11.08.	12.08.	13.08.	14.08.	15.08.	16.08.	Mittel Pro Tag
<b>Tier 93</b>											
Futter [g]	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Faeces [g]	623	880	1652	1852	1124	1410	2019	1161	1375	1893	1399
Urin [g]	1154	2395	2174	2770	1391	2663	2373	2313	928	1388	1955
<b>Tier 94</b>											
Futter [g]	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Faeces [g]	127	2120	1816	1296	1634	1083	1718	1011	1597	2117	1452
Urin [g]	1719	2527	2078	2952	1944	3353	2697	2812	2917	1676	2468
<b>Tier 95</b>											
Futter [g]	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Faeces [g]	1254	2013	1421	1504	993	1686	1649	1295	1737	1784	1534
Urin [g]	1531	2804	2116	2665	1663	2091	1435	2966	2031	1656	2096
<b>Tier 96</b>											
Futter [g]	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Faeces [g]	381	1899	1418	1724	934	1212	1536	1135	1582	1610	1343
Urin [g]	374	4099	4127	4657	4307	4586	3395	4324	4367	2637	3687
<b>Tier 97</b>											
Futter [g]	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Faeces [g]	1134	1328	1720	1579	1193	1727	2097	966	1607	1330	1468
Urin [g]	3656	4673	3927	4103	3959	3829	2927	3965	3790	2745	3757



Tab. A. 7: CTC-Gehalt ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Urin der in der FAL eingestellten Schweine während der Medikationsphasen (LC-MS/MS) (n = 2)

Versuchstag	CTC-Gehalt ( $\Sigma$ CTC + e-CTC) [mg]				
	Tier 93	Tier 94	Tier 95	Tier 96	Tier 97
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,86	5,60	7,79	8,65	21,56
2	15,04	14,57	11,90	11,30	28,74
3	13,78	19,05	20,73	13,09	34,30
4	22,84	21,82	17,55	28,24	49,97
5	11,99	15,65	23,52	16,50	32,49
6	21,54	28,81	21,53	18,33	47,69
7	18,63	23,24	15,81	21,62	47,97
8	14,26	27,09	6,87	18,99	34,43
9	14,59	17,35	4,38	19,94	39,73
10	20,99	19,93	9,49	16,01	35,17
22	3,32	10,38	4,48	0,51	14,89
23	6,00	13,24	6,13	5,21	23,74
24	13,76	12,82	5,43	14,15	29,12
25	26,96	13,72	12,33	16,97	28,24
26	14,27	13,23	13,53	18,24	22,15
27	21,61	15,63	20,45	28,33	38,50
28	23,39	8,35	8,11	10,05	29,45
29	17,97	11,29	8,10	12,03	31,05
30	5,68	1,55	6,31	3,76	12,94
31	8,40	0,33	3,05	5,36	7,60

Tab. A. 8: CTC-Gehalt ( $\Sigma$  CTC + e-CTC) in Faeces der in der FAL eingestellten Schweine während der Medikationsphasen (LC-MS/MS) (n = 2)

Versuchstag	CTC-Gehalt ( $\Sigma$ CTC + e-CTC) [mg]				
	Tier 93	Tier 94	Tier 95	Tier 96	Tier 97
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,3	0,0	2,0	0,6	55,5
2	228,9	169,5	221,4	438,0	355,1
3	237,2	670,3	768,1	604,7	569,5
4	367,4	562,2	580,9	644,7	639,3
5	483,8	688,5	542,7	841,4	491,3
6	521,0	544,5	750,5	490,8	678,2
7	561,7	694,5	600,5	1027,5	498,9
8	309,1	547,5	651,8	1082,9	684,3
9	577,4	598,0	878,0	851,0	801,2
10	584,2	675,0	698,2	907,9	322,9
22	0,4	1,5	1,2	1,0	0,6
23	2,6	258,0	589,9	237,0	322,9
24	765,4	979,6	583,0	717,0	509,8
25	873,0	681,6	724,4	732,8	738,5
26	509,7	762,3	500,8	560,8	657,9
27	508,1	694,1	1051,6	932,8	897,5
28	1001,8	1081,3	727,4	1175,9	929,1
29	451,3	743,8	598,8	757,1	543,0
30	664,8	728,3	817,4	1194,1	749,7
31	1011,9	1027,5	989,4	1196,7	535,3

Tab. A. 9: Gehalt von CTC und seinen Umwandlungs- und Abbauprodukten in Urin des Tieres 95 während der Medikationsphasen (LC-MS/MS) (n = 2)

Versuchstag	Gehalt [mg]				Summe aller Verbindungen
	CTC	e-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	4,80	2,98	4,90	8,08	20,76
2	7,19	4,71	8,42	11,36	31,67
3	12,00	8,73	13,81	19,61	54,15
4	11,06	6,49	13,35	22,49	53,38
5	13,89	9,63	15,11	28,38	67,01
6	14,05	7,48	11,71	15,66	48,90
7	9,50	6,31	13,23	13,91	42,94
8	3,64	3,23	10,48	11,86	29,21
9	3,14	1,24	23,51	32,21	60,10
10	5,23	4,26	16,58	20,64	46,70
22	2,28	2,20	5,81	7,15	17,43
23	3,29	2,83	17,93	18,79	42,85
24	3,05	2,38	15,44	13,45	34,32
25	6,61	5,72	18,68	19,21	50,22
26	8,63	4,91	9,03	8,08	30,64
27	8,51	6,94	13,79	8,22	37,46
28	5,43	2,69	10,15	8,81	27,07
29	5,09	3,01	23,87	18,92	50,90
30	4,08	2,23	16,89	17,65	40,85
31	1,82	1,24	14,14	14,67	31,86

Tab. A. 10: Gehalt von CTC und seinen Umwandlungs- und Abbauprodukten in Faeces des Tieres 95 während der Medikationsphasen (LC-MS/MS) (n = 2)

Versuchstag	Gehalt [mg]						Summe aller Verbindungen
	CTC	e-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	a-CTC	e-a-CTC	
0	0	0	0	0	0	0	0,00
1	1,20	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	1,56
2	153,31	68,08	19,06	9,91	3,84	6,02	260,21
3	547,19	220,94	83,58	52,90	4,39	6,52	915,52
4	411,90	169,01	76,42	51,49	3,93	5,49	718,24
5	385,82	156,85	73,81	57,67	3,20	4,34	681,69
6	519,18	231,30	104,90	74,70	4,00	5,74	939,82
7	404,30	196,20	92,62	70,32	3,35	4,73	771,52
8	441,86	209,94	85,20	57,77	3,76	5,39	803,92
9	589,59	288,43	130,79	109,45	3,84	5,36	1127,46
10	447,55	250,67	107,18	80,87	3,76	5,34	895,36
22	0,78	0,68	0,29	0,00	0,00	0,00	1,75
23	376,86	213,06	51,98	33,42	4,20	6,52	686,04
24	380,57	202,44	60,59	36,81	3,29	4,72	688,42
25	488,56	235,82	92,73	72,40	3,61	5,11	898,22
26	332,10	168,72	74,69	55,62	2,44	3,41	636,98
27	712,43	339,17	121,11	136,30	4,35	6,07	1319,42
28	469,52	257,91	119,46	151,80	4,20	5,80	1008,69
29	383,51	215,31	99,17	120,58	3,12	4,44	826,15
30	534,25	283,17	99,85	116,47	3,54	5,61	1042,89
31	674,41	315,01	118,22	156,25	3,94	5,91	1273,75

## A.2 Wiederholpräzision

Zur Beurteilung der Stabilität wird die Wiederholpräzision [288, 289] herangezogen. Durch die Berechnung der Wiederholpräzision  $r$  erfolgt die Ermittlung der Wiederholgrenze, die zur Beurteilung benötigt wird, ob es sich bei der Differenz zwischen zwei Einzelmeßwerten um eine signifikante Änderung handelt. Für die Wiederholpräzision gilt:

Gleichung A. 1: 
$$r = f \cdot \sqrt{2} \cdot s$$

mit:  $r$  = Wiederholpräzision  
 $s$  = Standardabweichung  
 $f$  = empirisch ermittelter Zahlenwert

Die Variable  $f$  hängt von dem gewählten Signifikanzniveau  $P$  und der Verteilung der Meßwerte ab. Für  $P = 90 \%$  gilt  $f = 2,3$ , für  $P = 99 \%$  gilt  $f = 3,65$  und für ein Signifikanzniveau von  $P = 95 \%$  ein Faktor von 1,96. Gemäß KROMIDAS [244, 288] wird ein Signifikanzniveau von  $P = 95 \%$  angenommen, so daß sich für die Wiederholpräzision  $r_{95}$  folgende Formel ergibt:

Gleichung A. 2: 
$$r_{95} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot s = 2,77 \cdot s \approx 2,8 \cdot s$$

## A.3 Langzeitstabilität von CTC und e-CTC

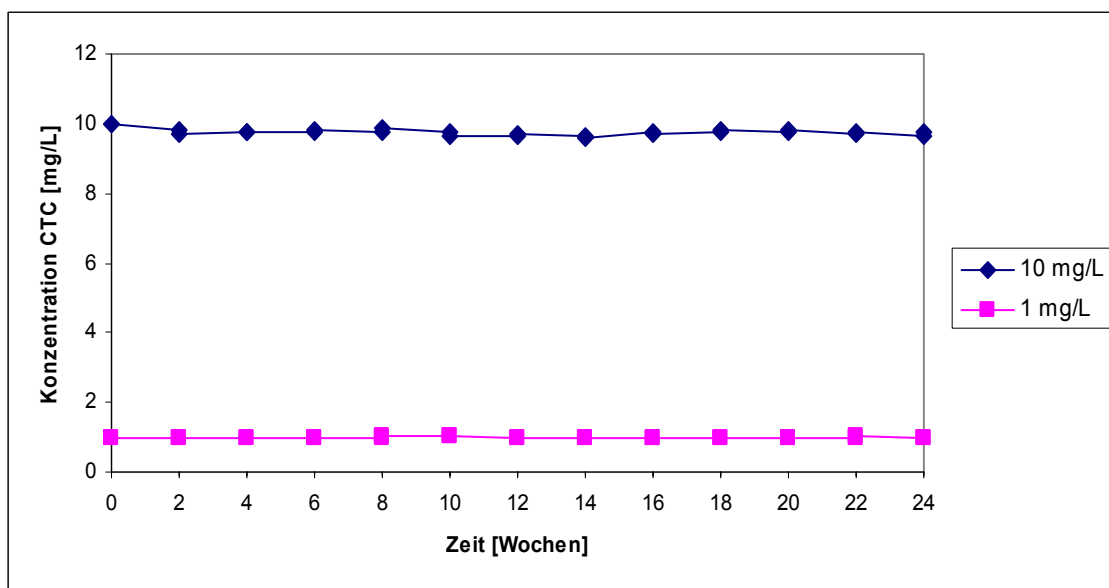


Abb. A. 1: Konzentrationsverlauf von CTC ( $\beta = 1$  und 10 mg/L) in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) bei einer Lagerung von  $-80^\circ\text{C}$  (Mischstandard: CTC: e-CTC = 1:1 (w/w)) (HPLC-UV,  $n = 3$ )

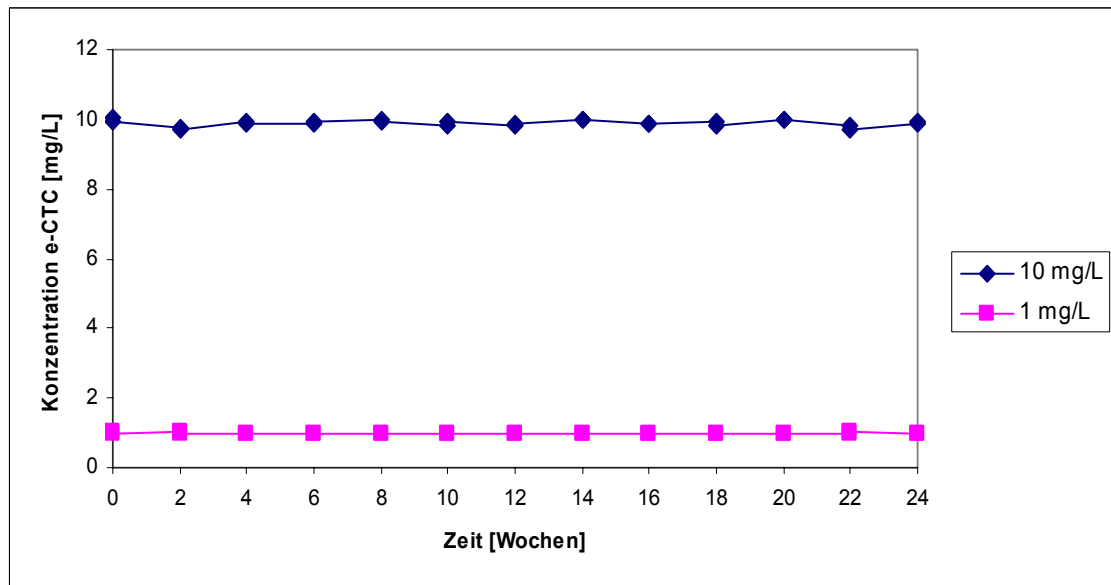


Abb. A. 2: Konzentrationsverlauf von e-CTC ( $\beta = 1$  und 10 mg/L) in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) bei einer Lagerung von  $-80^\circ\text{C}$  (Mischstandard: CTC: e-CTC = 1:1 (w/w)) (HPLC-UV,  $n = 3$ )

## A.4 Ausreißertest nach GRUBBS

Der Ausreißertest nach GRUBBS wird zur Aufdeckung einzelner Ausreißerwerte in einer Analysenserie genutzt [288, 290, 296]. Hierzu wird der Mittelwert  $\bar{x}$  der Meßwerte einer Analysenserie gebildet und die Standardabweichung  $s$  der Analysendaten berechnet.

Gleichung 1:

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

Durch Einsetzen des Mittelwertes  $\bar{x}$  wird für den Analysenwert  $x^*$  mit der größten Differenz zum Mittelwert überprüft, ob es sich um einen Ausreißer handelt.

Gleichung 2:

$$PW = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s}$$

Der ermittelte Prüfwert  $PW$  wird mit den statistischen Tabellenwerten  $rM$  für den GRUBBS-Test verglichen [288, 290]. Das Testergebnis ist wie folgt zu bewerten:

$PW \leq rM$ (f, P = 90 %):	kein Ausreißer
$rM$ (f, P = 90 %) < $PW \leq rM$ (f, P = 95 %):	wahrscheinlich Ausreißer
$PW > rM$ (f, P = 95 %):	Ausreißer

## A.5 Linearität des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC

### A. 5.1 Kalibrierdaten

Tab. A. 11: Mittelwerte und relative Standardabweichungen der Peakflächen von CTC und e-CTC in Kalibrierlösungen bei der Bestimmung mittels LC-MS/MS ( $n = 10$ )

Konzentration [mg/L]	Peakfläche CTC $\bar{y}$ ( $n = 10$ ) [mAU min]	$s_{\text{rel, CTC}}$ ( $n = 10$ ) [%]	Peakfläche e-CTC $\bar{y}$ ( $n = 10$ ) [mAU min]	$s_{\text{rel, e-CTC}}$ ( $n = 10$ ) [%]
0,001	7641	11	13836	16
0,0025	8424	9	14992	11
0,005	10503	7	18098	5
0,01	17966	6	25314	7
0,02	25687	6	29659	5
0,04	51817	5	45730	3
0,05	62980	5	54088	4
0,06	72739	5	61578	4
0,08	100852	4	84296	4
0,1	128725	2	101489	2
0,12	147414	3	113079	4
0,14	164361	4	134837	3
0,16	196902	2	146809	3
0,18	212616	4	157086	3
0,25	286257	2	219958	3
0,5	575129	3	419124	4
1	1024770	2	772677	4
2,5	2408886	3	1861274	2
5	4771595	4	3634713	4
10	9134133	4	6708979	5
25	21171256	3	15097022	2
50	41001890	4	29934106	3
100	69155647	3	45987774	2

Tab. A. 12: Mittelwerte und relative Standardabweichungen der Peakflächen von CTC und e-CTC in Kalibrierlösungen bei der Bestimmung mittels HPLC-UV (370 nm,  $n = 10$ )

Konzentration [mg/L]	Peakfläche CTC $\bar{y}$ ( $n = 10$ ) [mAU min]	$s_{\text{rel, CTC}}$ ( $n = 10$ ) [%]	Peakfläche e-CTC $\bar{y}$ ( $n = 10$ ) [mAU min]	$s_{\text{rel, e-CTC}}$ ( $n = 10$ ) [%]
0,10	109	12	104	11
0,18	162	6	163	7
0,25	231	4	225	3
0,50	468	3	464	3
1,00	868	3	864	2
2,50	2234	3	2208	2
5,00	4482	1	4496	3
10,00	8674	3	8714	3
25,00	22751	3	22852	3
50,00	46225	1	46036	2
100,00	90794	2	90774	2

## A. 5.2 Kalibriergeraden

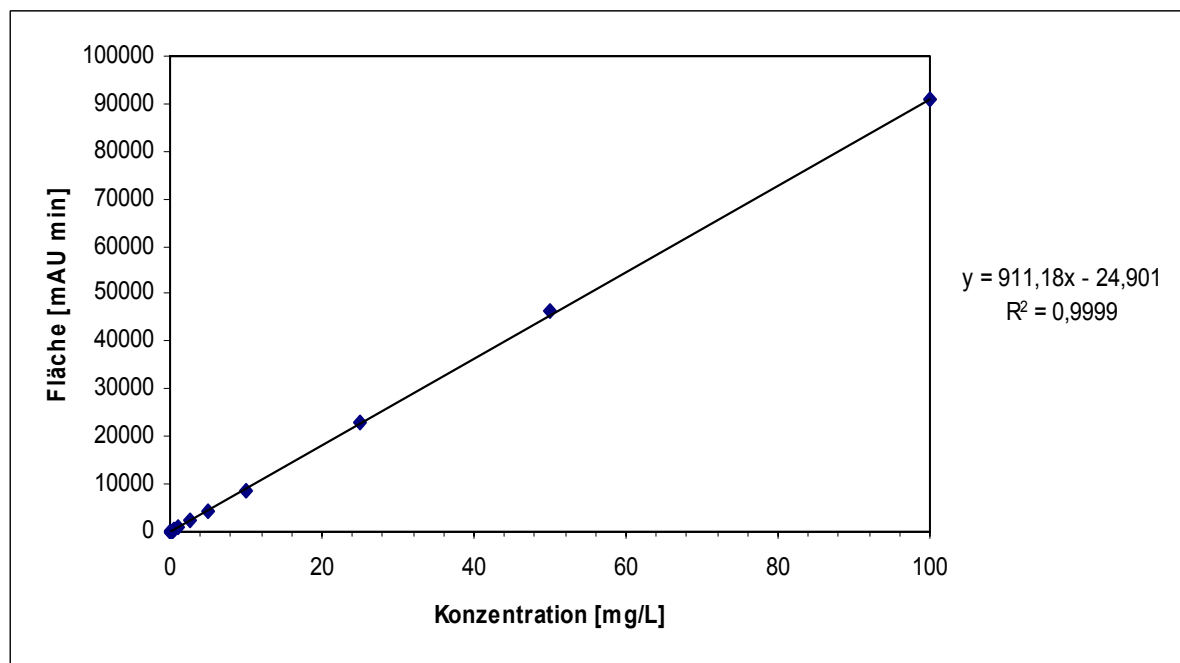


Abb. A. 3: Visueller Linearitätstest der Kalibrierfunktion für die Bestimmung von CTC mittels HPLC-UV ( $n = 10$ )

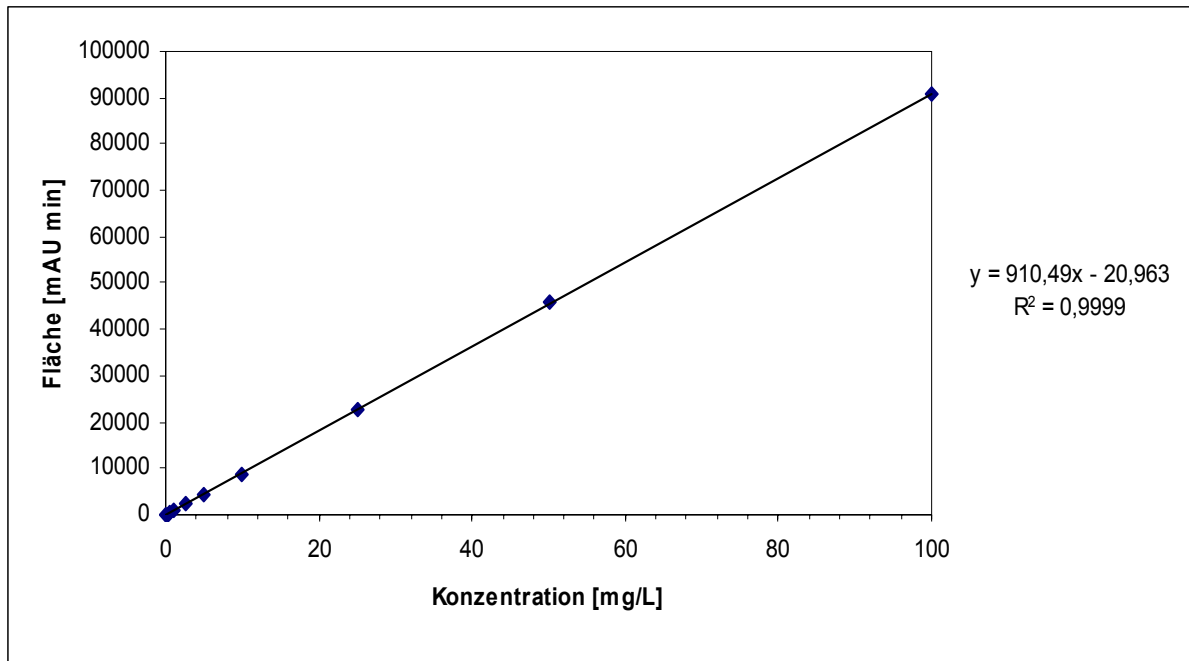


Abb. A. 4: Visueller Linearitätstest der Kalibrierfunktion für die Bestimmung von e-CTC mittels HPLC-UV ( $n = 10$ )

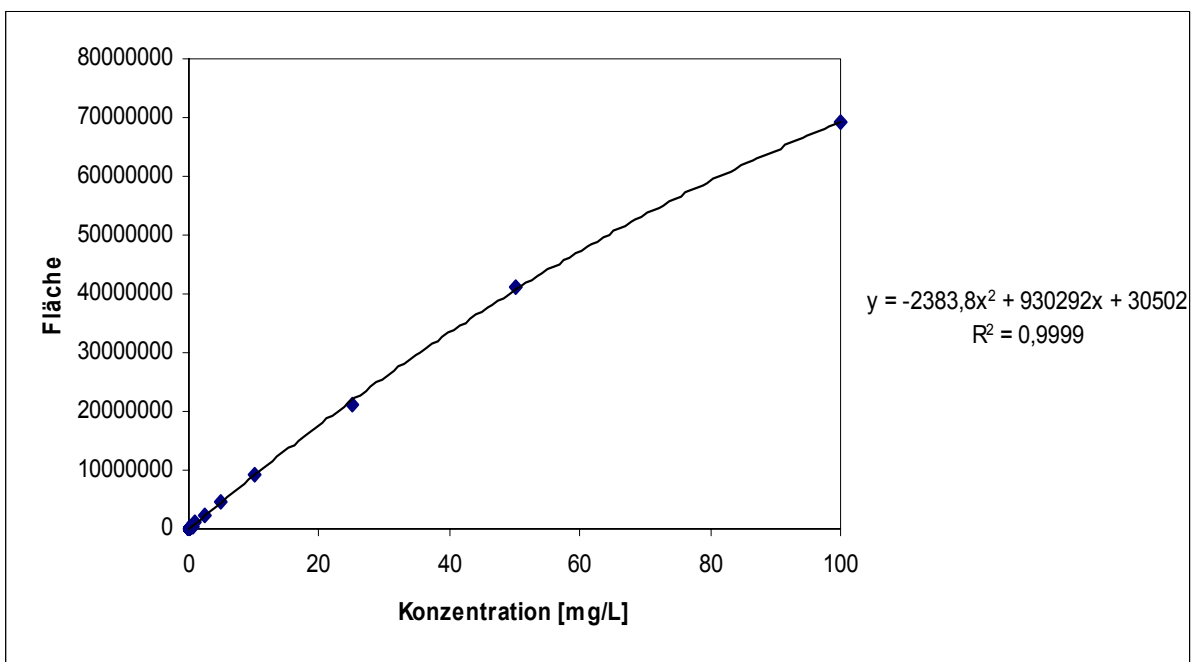


Abb. A. 5: Visueller Linearitätstest der Kalibrierfunktion für die Bestimmung von CTC mittels LC-MS/MS ( $n = 10$ )

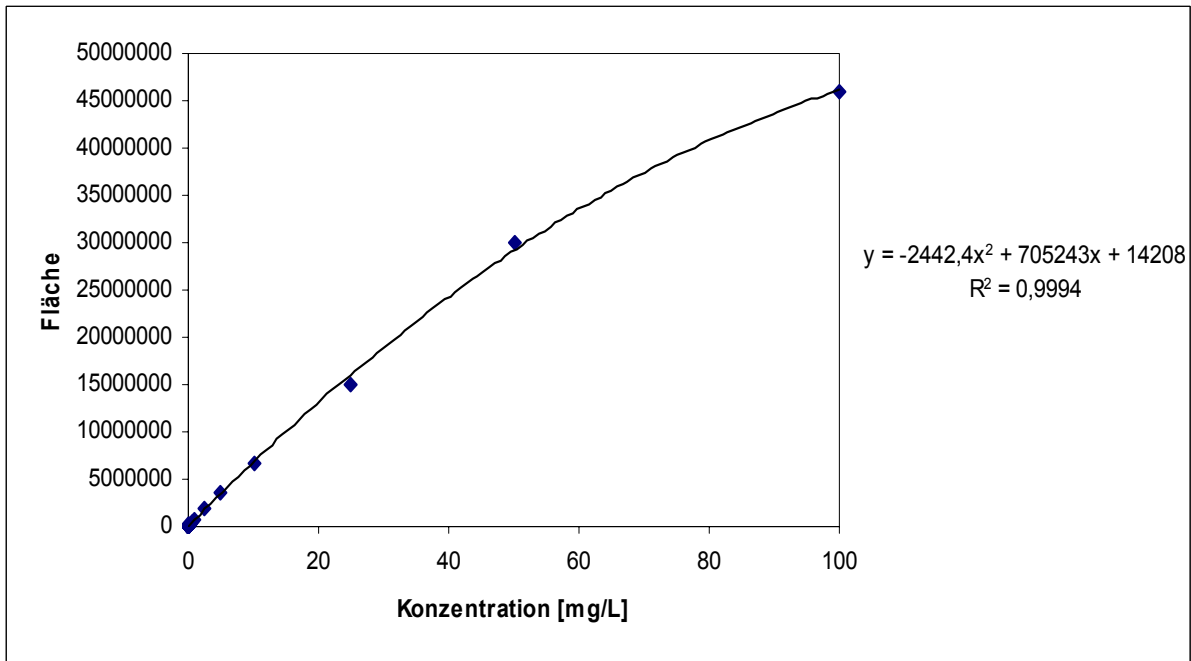


Abb. A. 6: Visueller Linearitätstest der Kalibrierfunktion für die Bestimmung von e-CTC mittels LC-MS/MS ( $n = 10$ )

### A. 5.3 Anpassungstest nach MANDEL

Zur rechnerischen Überprüfung der Linearität kann der Anpassungstest nach MANDEL herangezogen werden. Zunächst werden aus den erhaltenen Messwerten die Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades (mit  $x_i$  = Konzentration und  $y_i$  = Detektorsignal) sowie die jeweiligen Reststandardabweichungen  $s_{y1}$  und  $s_{y2}$  berechnet. Durch Vergleich der Kalibrierfunktion 1. und 2. Grades wird die Verringerung der Reststandardabweichung, die sich durch die Wahl des Regressionsmodells 2. Ordnung gegenüber der 1. Ordnung ergibt, mittels F-Tests auf Signifikanz geprüft [244, 288, 290].

Für eine Funktion 1. Grades gilt:

Gleichung A. 3: 
$$y = a + bx$$

Der Ordinatenabschnitt **a** stellt dabei den errechneten Blindwert dar, die Steigung **b** ist ein Maß für die Empfindlichkeit. Die Steigung **b** wird nach folgender Formel berechnet:

Gleichung A. 4: 
$$b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Die hierzu benötigten Mittelwerte des Detektorsignals ( $\bar{y}$ ) werden mit **Gleichung 1** und die Mittelwerte der Konzentration ( $\bar{x}$ ) mit nachfolgender Formel berechnet:

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



Der Schnittpunkt mit der Ordinate **a** (errechneter Blindwert) ergibt sich dann wie folgt:

Gleichung A. 6: 
$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Weiterhin wird für die statistische Beurteilung der Linearität die Reststandardabweichung benötigt. Diese gibt die Streuung der Meßwerte um die Regressionsgerade an und ist somit ein Maß für die Präzision der Kalibrierung. Für die Reststandardabweichung einer Funktion 1. Grades gilt:

Gleichung A. 7: 
$$s_{y_1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$$

mit:  $\hat{y}_i = a + bx_i$  (berechnete Peakfläche)  
 $y_i$  = Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche

Für eine Funktion 2. Grades gilt:

Gleichung A. 8: 
$$y = a + bx + cx^2$$

Die Regressionsanalyse liefert die Kalibrierfunktion 2. Grades mit ihren Funktionskoeffizienten **a**, **b** und **c**. Diese können mit **Gleichung A. 9** bis **Gleichung A. 11** berechnet werden:

Gleichung A. 9: 
$$a = \frac{\left( \sum_{i=1}^N y_i - b \sum_{i=1}^N x_i - c \sum_{i=1}^N x_i^2 \right)}{N}$$

Gleichung A. 10: 
$$b = \frac{Q_{xy} - c \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}}$$

Gleichung A. 11: 
$$c = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{Q_{x^3}^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}}$$

mit:

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^N x_i^2 - \left( \frac{\left( \sum_{i=1}^N x_i \right)^2}{N} \right)$$

$$Q_{xy} = \sum_{i=1}^N (x_i \cdot y_i) - \left( \frac{\left( \sum_{i=1}^N x_i \right) \cdot \left( \sum_{i=1}^N y_i \right)}{N} \right)$$

$$Q_{x^3} = \sum_{i=1}^N x_i^3 - \left( \frac{\left( \sum_{i=1}^N x_i \right) \cdot \left( \sum_{i=1}^N x_i^2 \right)}{N} \right)$$

$$Q_{x^4} = \sum_{i=1}^N x_i^4 - \left( \frac{\left( \sum_{i=1}^N x_i^2 \right)^2}{N} \right)$$

$$Q_{x^2y} = \sum_{i=1}^N (x_i^2 \cdot y_i) - \left( \frac{\left( \sum_{i=1}^N y_i \right) \cdot \left( \sum_{i=1}^N x_i^2 \right)}{N} \right)$$

Für die Reststandardabweichung einer Funktion 2. Grades gilt:

Gleichung A. 12:

$$s_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-3}}$$

mit:

$$\hat{y}_i = a + bx_i + cx_i^2 \text{ (berechnete Peakfläche)}$$

$y_i$  = Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche

Aus den Reststandardabweichungen  $s_{y_1}$  und  $s_{y_2}$  wird die Differenz der Varianzen  $DS^2$  ermittelt:

Gleichung A. 13:

$$DS^2 = (N-2)s_{y_1}^2 - (N-3)s_{y_2}^2 \text{ mit dem Freiheitsgrad } f = 1$$

Anschließend wird die Prüfgröße PG berechnet:

Gleichung A. 14:

$$PG = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2}$$

Diese Prüfgröße wird dann mit dem Tabellenwert  $F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%)$  verglichen. Dabei können folgende Fälle eintreten:

$PG \leq F$ : Durch die Kalibrierfunktion 2. Grades wird keine signifikant bessere Anpassung erreicht, also ist die Kalibrierfunktion linear.

$PG > F$ : Die Kalibrierfunktion ist im untersuchten Arbeitsbereich nicht linear, entweder kann durch Einengung des Arbeitsbereiches eine Linearität erreicht werden oder die Kalibrierfunktion muß nach einem Regressionsmodell höherer Ordnung berechnet werden.

Zur Durchführung des **Anpassungstests nach MANDEL** werden die Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades und die dazugehörigen Reststandardabweichungen  $s_{y_1}$  und  $s_{y_2}$  benötigt. Anschließend wird

mittels F-Test überprüft, ob sich bei der Wahl des Regressionsmodells 2. Ordnung gegenüber dem 1. Ordnung eine signifikante Verringerung der Reststandardabweichung ergibt. Aus den erhaltenen Reststandardabweichungen wird die Differenz der Varianzen  $DS^2$  und daraus die Prüfgröße PG berechnet und mit dem Tabellenwert verglichen.

### HPLC-UV

Der Vergleich der ermittelten Prüfgrößen 3,953 für CTC und 5,145 für e-CTC mit dem Tabellenwert  $F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%)$  von 12,223 zeigt, daß durch die Kalibrierfunktion 2. Grades gegenüber der 1. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht wird, da die berechneten Prüfgrößen kleiner sind als der Tabellenwert. Die angenommene lineare Kalibrierfunktion wird somit für CTC und e-CTC rechnerisch bestätigt. Die ermittelten Kenndaten der Anpassungstests für CTC und e-CTC für die UV-Detektion sind in **Tab. A. 13** zusammengefaßt.

*Tab. A. 13: Anpassungstest nach MANDEL: Ermittelte Konstanten der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades und Prüfgröße PG für CTC und e-CTC (HPLC-UV)*

funktionaler Zusammenhang	1. Grades $y = a + bx$		2. Grades $y = a + bx + cx^2$	
	CTC	e-CTC	CTC	e-CTC
Konstante a [mAU min]	-28,356	-23,872	-126,536	-111,379
Konstante b [mAU min/(mg/L) ]	911,241	910,532	930,015	927,265
Konstante c [mAU min/(mg/L) <sup>2</sup> ]	---	---	-0,2013	-0,179
Korrelationskoeffizient (r)	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Reststandardabweichung $s_y$ [mAU min]	304,758	250,716	260,456	203,486
PG	CTC		e-CTC	
	3,953		5,145	
F-Wert ( $f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%$ )	12,223		12,223	

### LC-MS/MS

Die Durchführung des Linearitätstests nach MANDEL für die Kalibrierfunktionen der MS/MS-Detektion bezogen auf einen Arbeitsbereich von 0,005 mg/L bis 50 mg/L bestätigte rechnerisch, daß durch eine Kalibrierfunktion 2. Grades eine signifikant bessere Anpassung erreicht werden kann als mit der 1. Grades. Die Aufteilung des Arbeitsbereiches in drei Teilbereiche erbrachte einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche für CTC und e-CTC, was rechnerisch mittels des MANDEL-Testes bestätigt werden konnte, siehe **Tab. A. 14**.

Tab. A. 14: Anpassungstest nach MANDEL: Ermittelte Prüfgrößen PG für CTC und e-CTC (LC-MS/MS)

Linearer Bereich [mg/L]	PG		F-Wert ( $f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%$ )
	CTC	e-CTC	
0,005-0,08	2,211	7,648	21,198
0,1-0,5	2,649	0,320	21,198
1-50	7,805	0,255	34,132

## A. 5.4 Residualanalyse

Die Residualanalyse ist eine weitere Möglichkeit, zu prüfen, ob der gewählte funktionale Ansatz des Kalibriermodells die Meßergebnisse hinreichend genau beschreibt. Die Residuen  $d_i$  ergeben sich dabei als vertikale Abstände der Meßwerte von der Regressionskurve. Für die Residuen gilt:

Gleichung A. 15:  $d_i = y_i - \hat{y}_i$  mit:  $i = 1$  bis  $N$

mit:  $y_i$  = Meßwert der Peakfläche

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

Ist der gewählte Modellansatz richtig, weisen die Residuen eine Normalverteilung auf. Läßt sich jedoch ein Trend feststellen, so ist der zugrunde gelegte Regressionsansatz zu überprüfen und gegebenenfalls gewichtete Regressionsmodelle heranzuziehen [244, 288, 289, 290].

Die in **Abb. A. 7** dargestellten Residuen zeigen, daß der gewählte lineare Regressionsansatz für die UV-Detektion zwar richtig ist, jedoch ansteigende Varianzen zu erkennen sind und damit eine Inhomogenität der Varianzen vorliegen könnte.

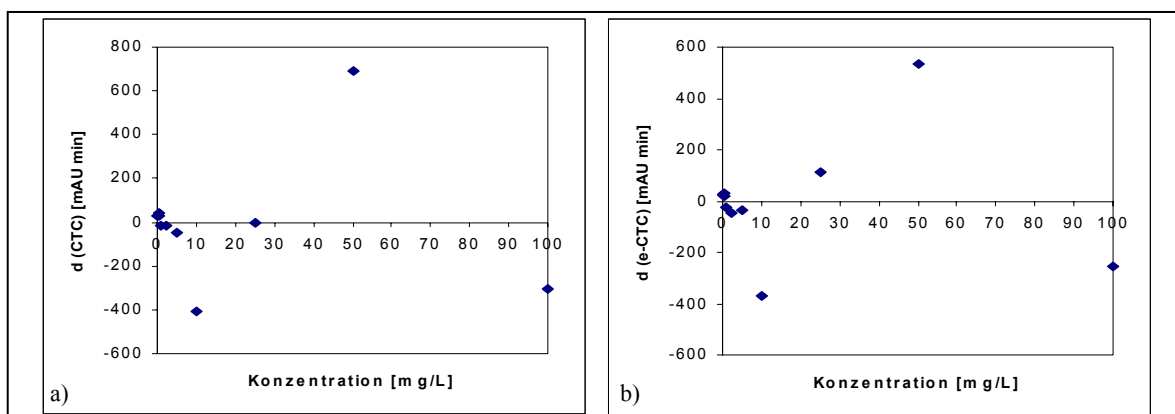


Abb. A. 7: Graphische Darstellung der Residuen in Abhängigkeit von der Konzentration für die CTC-Bestimmung (a) und e-CTC-Bestimmung (b) mit HPLC-UV (370 nm)

Die Residualanalysen für die MS/MS-Detektion ergaben für CTC und e-CTC für die drei aufgeteilten Arbeitsbereiche eine Normalverteilung, dessen graphische Darstellung in **Abb. A. 8** erfolgte.

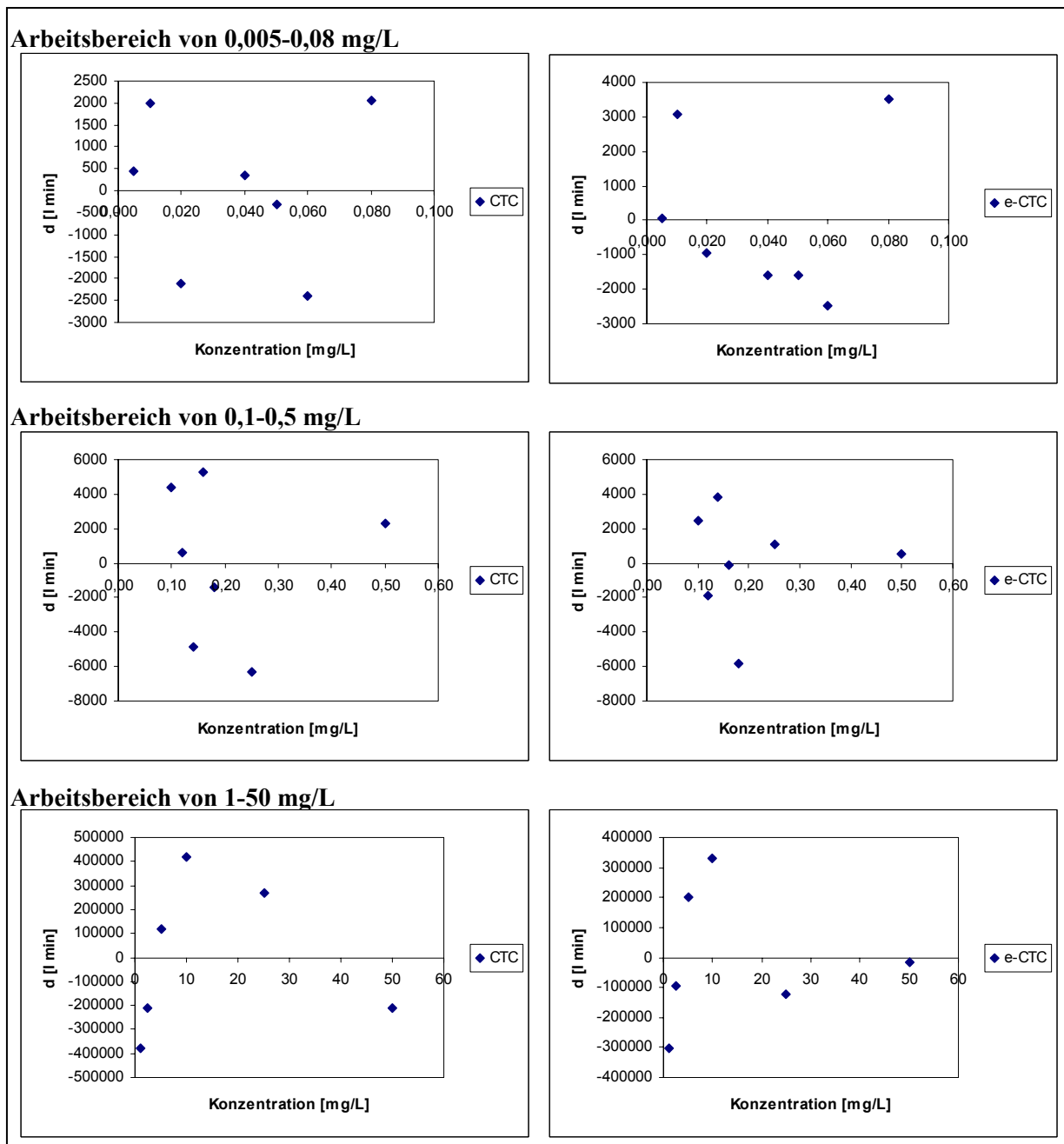


Abb. A. 8: Graphische Darstellung der Residuen in Abhängigkeit von der Konzentration für die CTC-Bestimmung und e-CTC-Bestimmung mit LC-MS/MS

### A. 5.5 Varianzhomogenität

Die lineare Regressionsrechnung geht von einer konstanten (homogenen) Varianz der Meßwerte (Unpräzision) über den Arbeitsbereich aus. Eine Inhomogenität der Varianzen führt über eine höhere Unpräzision hinaus zu einer möglichen Veränderung der Geradensteigung und damit zu einer höheren Ungenauigkeit. Zur Überprüfung der Varianzhomogenität werden aus den zehn Meßwerten für die

niedrigste und die höchste Konzentration des Arbeitsbereiches die Varianzen  $s_1^2$  und  $s_{10}^2$  gebildet und einem F-Test unterworfen. Es werden  $2 \cdot n$  ( $n = 10$ ) Meßwerte erhalten. Für die Varianz gilt:

Gleichung A. 16:

$$s_i^2 = \frac{\sum_{n=1}^{10} (y_{i,n} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

mit:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{n=1}^{10} y_{i,n}}{n_i} \quad \text{für } n = 1 \text{ bzw. } n = 10$$

Anschließend wird die Prüfgröße PG wie folgt berechnet:

Gleichung A. 17:

$$PG = \frac{s_{10}^2}{s_1^2} \quad \text{für } s_{10}^2 > s_1^2$$

oder

Gleichung A. 18:

$$PG = \frac{s_1^2}{s_{10}^2} \quad \text{für } s_1^2 > s_{10}^2$$

Die berechnete Prüfgröße wird mit dem tabellierten F-Wert ( $f_1 = f_2 = N - 1 = 9$ ) für einen Vertrauensbereich von 99 % verglichen. Ist  $PG < F$ , so ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianzen  $s_1^2$  und  $s_{10}^2$  feststellbar und es ist damit eine Homogenität der Varianzen gegeben. Wenn  $PG > F$  ist, besteht ein signifikanter Unterschied der Varianzen und somit eine Inhomogenität der Varianzen, so daß durch Einschränken des Arbeitsbereiches versucht werden sollte, eine Varianzhomogenität zu erreichen. Ist dies nicht möglich, müssen gegebenenfalls gewichtete Regressionsmodelle angewendet werden.

Die Prüfwerte für die *UV-Detektion* wurden zu 45,55 für CTC und 13,19 für e-CTC ermittelt und lagen damit weit oberhalb des Tabellenwertes von 5,35. Damit ist rechnerisch die bereits durch die Residualanalyse festgestellte Inhomogenität bestätigt worden.

Zur Überprüfung der Varianzhomogenität bei der *MS/MS-Detektion* wurden entsprechend die Varianzen der niedrigsten und höchsten Konzentration für CTC und e-CTC der drei Arbeitsbereiche ermittelt und die drei Wertepaare einem F-Test unterworfen, siehe **Tab. A. 15**.

Tab. A. 15: Prüfung auf Varianzhomogenität: Ermittelte Prüfgrößen PG für CTC und e-CTC (LC-MS/MS)

Linearer Bereich [mg/L]	PG		F-Wert ( $f_1 = f_2 = N - 1 = 9$ )
	CTC	e-CTC	
0,005-0,08	29,45	14,83	5,35
0,1-0,5	62,96	50,51	5,35
1-50	507,49	943,14	5,35

Sowohl für CTC als auch für e-CTC wurde bei allen drei Teilbereichen trotz starker Einschränkung des Arbeitsbereiches eine Varianzhomogenität festgestellt, obwohl mittels Residualanalyse eine Normalverteilung ermittelt wurde. Eine Varianzhomogenität kann möglicherweise durch weitere Einschränkung der gewählten Arbeitsbereiche sowie Anwendung gewichteter Regressionsmodelle vermieden werden ist aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden, zumal auch in der Routineanalytik oft eine Inhomogenität der Varianzen bei linearem Regressionsansatz in Kauf genommen wird. Der Test auf Varianzhomogenität ist zudem als kritisch zu betrachten, da nicht die relativen, sondern die absoluten Standardabweichungen in die Berechnung der Varianzen eingehen, so daß die absolute Standardabweichung bei hohen Konzentrationen wesentlich höher ist als bei niedrigen, obwohl die prozentuale Abweichung vom Sollwert mit zunehmender Konzentration meistens kleiner wird. Aus diesen Gründen wurden weder der Regressionsansatz geändert noch die Arbeitsbereiche weiter eingeschränkt.

### A. 5.6 Absicherung der unteren Arbeitsgrenze

Eine Kalibrierfunktion ist nur dann für quantitative Analysen anwendbar, wenn sich alle später mit ihr berechneten Analysenergebnisse signifikant von Null unterscheiden. Die untere Arbeitsgrenze muß, um sich mit einer vorgegebenen Präzision signifikant von Null zu unterscheiden, über der Bestimmungsgrenze liegen. Zur Absicherung der unteren Arbeitsgrenze wird zunächst nach FUNK der Prüfwert  $x_p$  mit  $t$  ( $f = N-2$ ,  $P = 95 \%$ ) berechnet [289, 290]. Für diesen gilt:

Gleichung A. 19:

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

mit:

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

Ist  $x_p \leq x_1$ , so ist der gesamte gewählte Arbeitsbereich abgesichert, und die untere Arbeitsgrenze unterscheidet sich signifikant von Null. Liegt  $x_p$  oberhalb von  $x_1$ , so ist der Arbeitsbereich erst für Konzentrationen größer statistisch abgesichert und der Arbeitsbereich muß eingeschränkt werden.

Die Prüfwerte  $x_p$  ergaben sich für die *UV-Detektion* zu 2,07 für CTC und 1,70 für e-CTC und liegen oberhalb der gewählten unteren Arbeitsbereichsgrenze von 0,18 mg/L. Die ermittelten Prüfwerte  $x_p$  sind aber als kritisch zu betrachten, weil diese Berechnung eine Varianzhomogenität voraussetzt. Dies ist notwendig, da bei der Berechnung des Prüfwertes  $x_p$  die nicht normierten Größen der Verfahrensstandardabweichung  $s_{x_0}$  sowie der Reststandardabweichung  $s_{y_1}$  einen großen Einfluß haben. Mit einem Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden für CTC und e-CTC von  $R^2 = 0,9999$  kann trotzdem von einer hohen Präzision auch im unteren Konzentrationsbereich ausgegangen werden. Die Arbeitsgrenze von 0,18 mg/L kann außerdem als abgesichert gelten, da dieser Grenzwert zum einen oberhalb der Bestimmungsgrenze, ermittelt über das Signal-Rausch-Verhältnis, liegt und zusätzlich eine minimale Meßpräzision von 10 % ab der gewählten unteren Arbeitsbereichsgrenze von 0,18 mg/L erfüllt ist. Deshalb erfolgt keine Einschränkung des Arbeitsbereiches.

Zur Absicherung der unteren Arbeitsgrenze der *MS/MS-Detektion* wurde für CTC und e-CTC der Prüfwert  $x_p$  für die jeweiligen Arbeitsteilbereiche berechnet und mit den entsprechenden untersten Konzentrationen  $x_1$  verglichen. Nur für den mittleren Arbeitsteilbereich von 0,1-0,5 mg/L konnten  $x_p$ -Werte unterhalb von  $x_1$  ermittelt werden, so daß nur dieser Arbeitsteilbereich ab  $x_1$ , die anderen erst ab den deutlich höher ermittelten  $x_p$ -Werten, siehe **Tab. A. 16**.

Tab. A. 16: Absicherung der unteren Arbeitsgrenze:  $x_p$ -Werte für das LC-MS/MS-Verfahren

Konzentrationsbereich [mg/L]	$x_p$ [mg/L]	
	CTC	e-CTC
0,005-0,08	0,013	0,024
0,1-0,5	0,035	0,035
1-50	3,660	3,697

Trotz der fehlenden Absicherung der unteren Arbeitsgrenzen wurden diese Bereiche aus den bereits oben für die UV-Detektion genannten Gründen beibehalten.

## A. 5.7 Verfahrenskenndaten

Aus der Empfindlichkeit läßt sich die Verfahrensstandardabweichung und die relative Verfahrensstandardabweichung ableiten. Unter der Empfindlichkeit wird die Änderung des Meßwertes bei einer Änderung der Konzentration verstanden. Bei linearen Kalibrierfunktionen sind die Empfindlichkeiten konstant und entsprechen der Steigung der Regressionsgeraden.

Gleichung A. 20:      Verfahrensstandardabweichung:       $s_{x0} = \frac{s_{y1}}{b}$

Gleichung A. 21:      relative Verfahrensstandardabweichung:       $V_{x0} = \frac{s_{x0} \cdot 100\%}{\bar{x}}$

Die ermittelten Verfahrenskenndaten der Kalibrierfunktionen für CTC und e-CTC sind in **Tab. A. 17** zusammengefaßt. Die relativen Verfahrensstandardabweichungen für das *HPLC-UV-Verfahren* lagen mit 1,7 % für CTC und 1,4 % für e-CTC unterhalb des Grenzwertes von 1,8 %.

Für die drei Kalibrierfunktionen der *MS/MS-Detektion* wurden analog die Verfahrenskenndaten ermittelt, die in **Tab. A. 18** bis **Tab. A. 20** zusammengefaßt sind. Die relativen Verfahrensstandardabweichungen belegen mit Werten zwischen 2,1 % und 6,2 % die gute Leistungsfähigkeit des Analysenverfahrens, weil aufgrund der Einschränkung des Arbeitsbereiches in drei Teilbereiche nach KROMIDAS eine maximal zulässige Verfahrensstandardabweichung von 6,4 % angenommen werden kann [288]. Da ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche bei der MS/MS-Detektion nur in einem begrenztem Konzentrationsbereich der oben aufgeführten Bereiche gegeben ist, ist bei der Ermittlung der CTC-Gehalte in Realproben darauf zu achten, daß die Konzentrationen der Kalibrierstandardlösungen im Bereich der Realprobe liegen.



Tab. A. 17: Verfahrenskennndaten der Kalibrierfunktionen für CTC und e-CTC (HPLC-UV, 370 nm)

Parameter	CTC	e-CTC
Empfindlichkeit [mAU min/(mg/L) ]	911,200	910,504
Verfahrensstandardabweichung $s_{x0}$ [mg/L]	0,335	0,276
rel. Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$ [%]	1,72	1,42

Tab. A. 18: Verfahrenskennndaten der Kalibrierfunktionen für CTC und e-CTC im Konzentrationsbereich 0,005-0,08 mg/L (LC-MS/MS)

Parameter	CTC	e-CTC
Reststandardabweichung $s_y$ [I min]	1940,850	2606,243
Empfindlichkeit [I min/(mg/L) ]	1182783,981	836366,874
Verfahrensstandardabweichung $s_{x0}$ [mg/L]	0,002	0,003
rel. Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$ [%]	4,12	6,23

Tab. A. 19: Verfahrenskennndaten der Kalibrierfunktionen für CTC und e-CTC im Konzentrationsbereich 0,1-0,5 mg/L (LC-MS/MS)

Parameter	CTC	e-CTC
Reststandardabweichung $s_y$ [I min]	4847,790	3475,410
Empfindlichkeit [I min/(mg/L) ]	1121152,553	799036,245
Verfahrensstandardabweichung $s_{x0}$ [mg/L]	0,004	0,004
rel. Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$ [%]	2,09	2,10

Tab. A. 20: Verfahrenskennndaten der Kalibrierfunktionen für CTC und e-CTC im Konzentrationsbereich 1-50 mg/L (LC-MS/MS)

Parameter	CTC	e-CTC
Reststandardabweichung $s_y$ [I min]	351877,160	257871,467
Empfindlichkeit [I min/(mg/L) ]	812434,819	589292,935
Verfahrensstandardabweichung $s_{x0}$ [mg/L]	0,433	0,438
rel. Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$ [%]	2,78	2,81

## A.6 Wiederfindungsfunktion

### A. 6.1 Berechnung der Wiederfindungsfunktion

Ziel der Wiederfindungsexperimente und der Aufstellung der Wiederfindungsfunktion ist die Ermittlung des Einflusses einzelner Verfahrensschritte sowie einer Verfahrens- oder Probenmodifikation auf das Analysenverfahren. Die Untersuchungen erfolgen über den gesamten Arbeitsbereich [290]. Zunächst wird die Kalibrierfunktion des analytischen Grundverfahrens ermittelt, für die gilt:

Gleichung A. 22: 
$$y = a_c + b_c x_c$$

Zur Aufdeckung von Fehlern in der Probenvorbereitung wird jeder einzelne Kalibrierstandard der gesamten Probenvorbereitung unterzogen. Die Analysenergebnisse  $x_f$  werden mit Hilfe der Analysenfunktion, nach  $x$  aufgelöste Kalibrierfunktion, berechnet:

Gleichung A. 23: 
$$x_f = \frac{y_f - a_c}{b_c}$$

Die Wiederfindungsgerade stellt die Auftragung der „gefundenen“ Konzentrationen ( $x_f$ ) auf der Ordinate gegen die zudotierte Konzentration ( $x_c$ ) auf der Abszisse dar. Die Wiederfindungsfunktion lässt sich mathematisch folgendermaßen beschreiben:

Gleichung A. 24: 
$$x_f = a_f + b_f \cdot x_c$$

Im Idealfall ergibt die Wiederfindungsfunktion eine Gerade mit dem Achsenabschnitt  $a_f = 0$  und der Steigung  $b_f = 1$  sowie einer Reststandardabweichung  $s_{yf}$ , die der Verfahrensstandardabweichung des analytischen Grundverfahrens  $s_{x_{0c}}$  entspricht. Für die Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion gilt:

Gleichung A. 25: 
$$s_{yf} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [x_{fi} - (a_f + b_f \cdot x_{ci})]^2}{N_f - 2}}$$

mit:  $N_f$  = Anzahl der Konzentrationsniveaus

## A. 6.2 Wiederfindungsfunktionen von CTC dotierter Extraktionsmittel

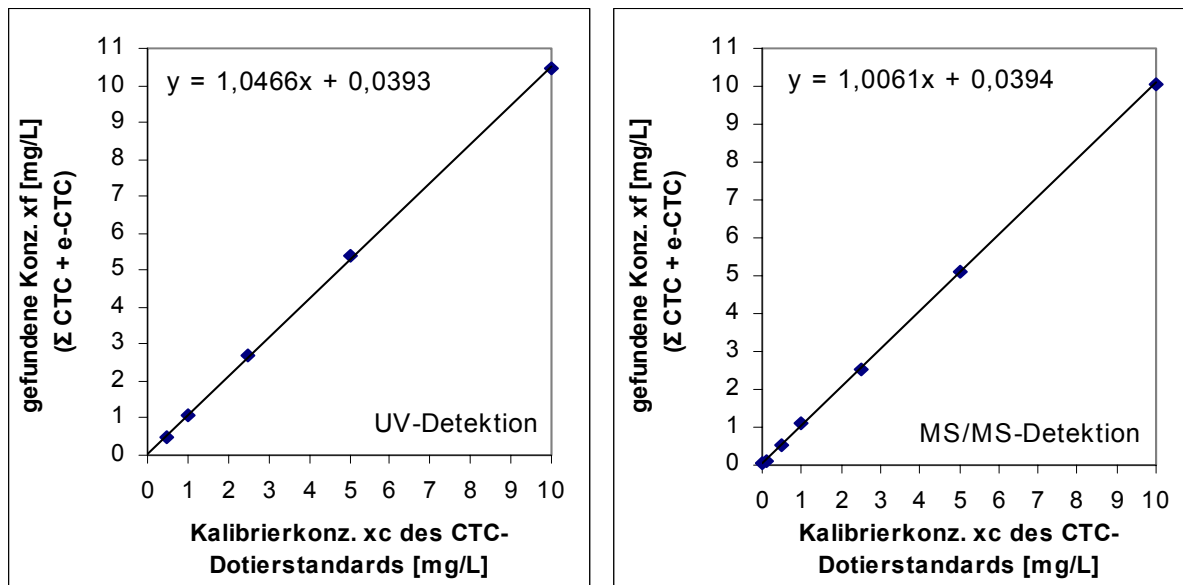


Abb. A. 9: Wiederfindungsfunktion von CTC nach Aufarbeitung mit SPE von CTC-dotierter Lösungsmittel (MeOH/EDTA-McIlvain-Puffer pH 4 (0,01 mol/L) (20/80) (v/v))

## A. 6.3 Wiederfindungsfunktionen von CTC dotierter Muskulaturproben

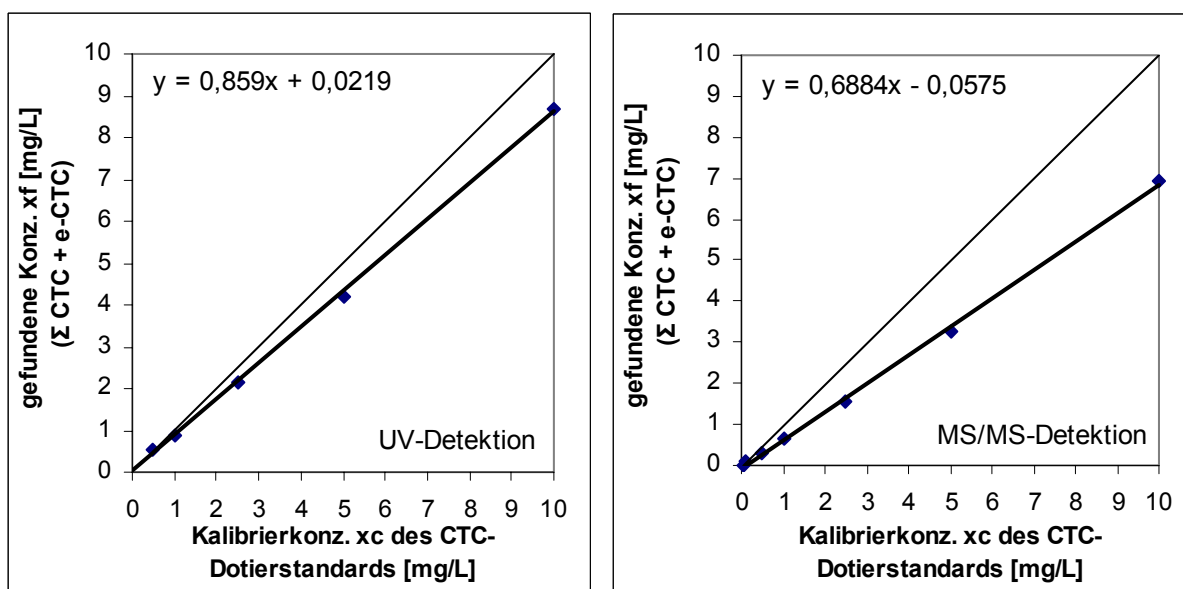


Abb. A. 10: Wiederfindungsfunktion von CTC nach Aufarbeitung von CTC-dotierter Muskulaturproben

## A. 6.4 Interpretation der Wiederfindungsfunktion und Kontrolle der Analysenpräzision

Eine wichtige Voraussetzung für die Aussagefähigkeit der Wiederfindungsfunktion ist die Gleichwertigkeit der Verfahrensstandardabweichungen  $s_{x0}$  der Kalibrierfunktion des analytischen Grundverfahrens und der Kalibrierfunktion für die aufgestockte Matrix bzw. der Kalibrierfunktion. Einzelne Probenvorbereitungsschritte wie z.B. Extraktion, Matrixeffekte und Probenvorbereitungsschritte können zu deutlich höherer Unpräzision der Kalibrierung führen, so daß eventuell vorliegende systematische Fehler verdeckt werden. Daher werden die Verfahrensstandardabweichung der Kalibrierfunktion des Grundverfahrens  $s_{x0}$  und die Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion  $s_{yf}$  mittels F-Test auf signifikanten Unterschied geprüft.

Für die Prüfgröße PG gilt:

Gleichung A. 26:

$$PG = \left( \frac{s_{yf}}{s_{x0}} \right)^2$$

Ist  $PG > F$  ( $f_1 = f_2 = N_c - 2$ ,  $P = 99\%$ ), so liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Standardabweichungen vor und es kann keine Aussage über das Nicht-Vorhandensein systematischer Abweichungen gemacht werden.

## A. 6.5 Ermittlung der Vertrauensbereiche für $a_f$ und $b_f$

Aufgrund von zufälligen Fehlern, also einer Streuung der Meßwerte ergeben sich als Achsenabschnitt und Steigung der Wiederfindungsfunktion niemals die Idealwerte  $a_f = 0$  und  $b_f = 1$ . Zur Beurteilung des Vorliegens systematischer Abweichungen müssen daher zunächst die Vertrauensbereiche von  $a_f$  und  $b_f$  ermittelt werden.

Für den Vertrauensbereich von  $a_f$  gilt:

Gleichung A. 27:

$$VB(a_f) = a_f \pm t_{(P,f)} \cdot s_{yf} \cdot \sqrt{\frac{1}{N_f} + \frac{\bar{x}_c^2}{\sum (x_{i,c} - \bar{x}_c)^2}}$$

mit:

$t$  = Student-t-Faktor:  $P = 95\%$ ,  $f = N_f - 2$

Für den Vertrauensbereich von  $b_f$  gilt:

Gleichung A. 28:

$$VB(b_f) = b_f \pm \frac{t_{(P,f)} \cdot s_{yf}}{\sqrt{\sum (x_{i,c} - \bar{x}_c)^2}}$$

## A. 6.6 Prüfung auf systematische Abweichungen

Mit Hilfe der berechneten Vertrauensbereiche für  $a_f$  und  $b_f$  kann das Vorliegen systematischer Abweichungen statistisch überprüft werden. Eine **konstant-systematische Abweichung** liegt mit 95%iger statistischer Sicherheit vor, wenn der Vertrauensbereich  $VB(a_f)$  nicht den Wert  $a_f = 0$  einschließt.

Entsprechend gilt, daß eine **proportional-systematische Abweichung** mit 95%iger Sicherheit vorliegt, wenn der Vertrauensbereich VB ( $b_f$ ) den Wert  $b_f = 1$  nicht einschließt. Beim Nachweis systematischer Abweichungen hinsichtlich einzelner Verfahrensschritte ist das Analysenverfahren zu optimieren und eine wiederholte Bestimmung der Wiederfindungsfunktion durchzuführen. Lassen sich die systematischen Abweichungen nicht eliminieren, so ist in der Beschreibung des Verfahrens deutlich darauf hinzuweisen. Bei proportional-systematischen Abweichungen muß eine Kalibrierung entweder über das Gesamtverfahren, einschließlich Probenvorbereitung, erfolgen oder es ist das Verfahren der Standardaddition anzuwenden. Beim Vorliegen konstant-systematischer Abweichungen genügt gegebenenfalls auch ein Warnvermerk in der Analysenvorschrift.

## A. 6.7 Wiederfindung

Die Wiederfindung ist ebenfalls ein Beurteilungskriterium für die Richtigkeit eines Analysenverfahrens. Die Wiederfindung läßt sich anhand der Wiederfindungsfunktion nach folgender Formel ermitteln:

$$\begin{aligned} \text{Gleichung A. 29:} \quad WF &= \frac{x_f}{x_c} \cdot 100 \% \quad \text{mit } x_f = a_f + b_f \cdot x_c \text{ ergibt sich} \\ \Leftrightarrow &= \left( \frac{a_f}{x_c} + b_f \right) \cdot 100 \% \end{aligned}$$

Ist das Analysenverfahren frei von konstant- und/oder proportional-systematischen Abweichungen, so beträgt  $a_f = 0$  und  $b_f = 1$  und die Wiederfindung ist 100 %. Bei Vorliegen von ausschließlich proportional-systematischen Abweichungen ist  $a_f \approx 0$ , also die Wiederfindung unabhängig von  $x_c$  und damit allein durch  $b_f$  bestimmt. In diesem Fall gilt:

$$\text{Gleichung A. 30:} \quad WF = b_f \cdot 100 \%$$

Bei einer ausschließlich proportional-systematischen Abweichung kann daher ebenfalls eine Wiederfindung angegeben werden. Wurden jedoch zusätzlich zu proportional-systematischen Abweichungen oder ausschließlich konstant-proportionale Abweichungen festgestellt, so führt die Beschreibung der Richtigkeit des Analysenverfahrens allein mit Hilfe der Wiederfindung zu Falschaussagen.

## A.7 Kalibrierung des HPLC-UV-Verfahrens zur Bestimmung von iso-CTC und e-iso-CTC

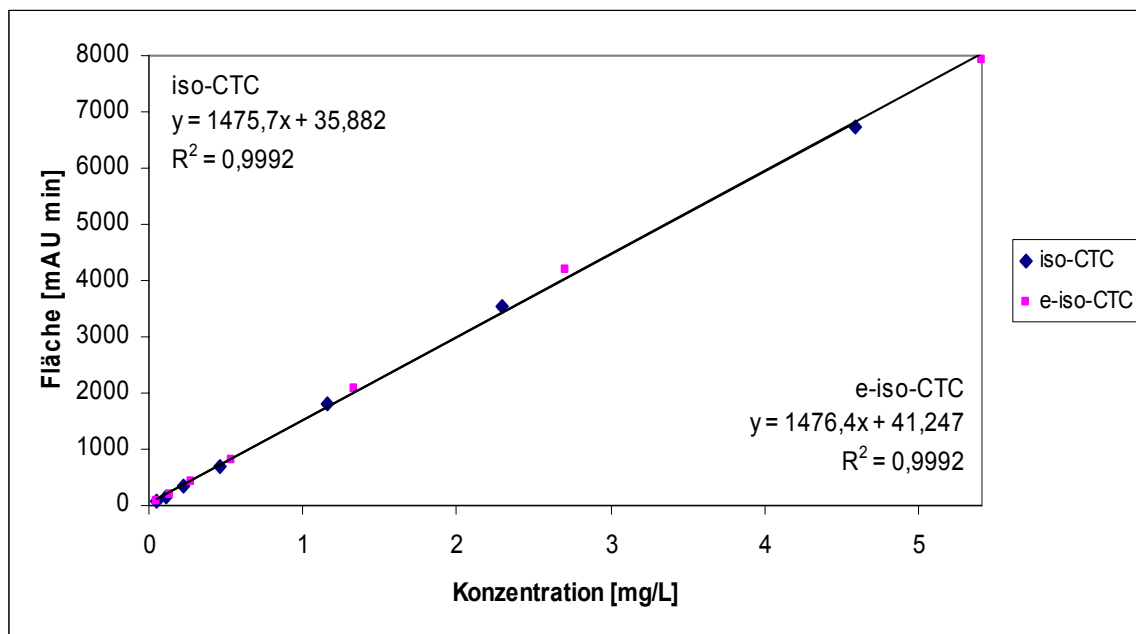


Abb. A. 11: Funktionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche für die Bestimmung von iso-CTC und e-iso-CTC mit HPLC-UV (270 nm) ( $n = 8$ )

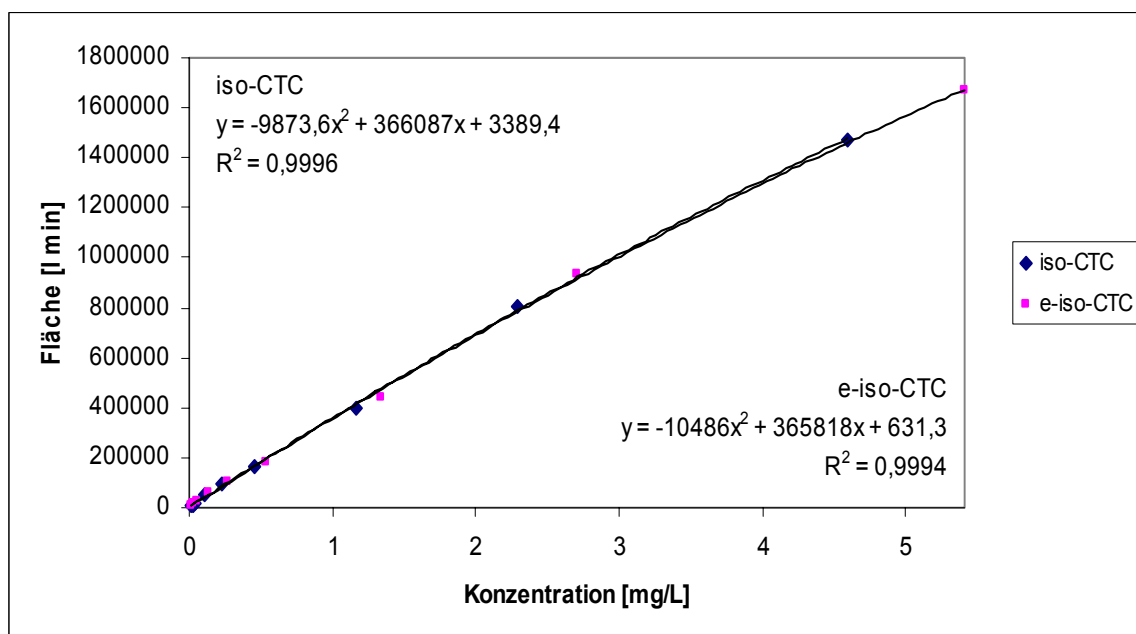


Abb. A. 12: Funktionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche für die Bestimmung von iso-CTC und e-iso-CTC mit LC-MS/MS ( $n = 8$ )

Tab. A. 21: Konzentrationen, Mittelwerte und relative Standardabweichungen der Peakflächen für die Bestimmung von iso-CTC und e-iso-CTC mittels HPLC-UV (275 nm) (n = 8)

Konz. iso-CTC [mg/L]	Peakfläche iso-CTC $\bar{y}$ (n = 8) [mAU min]	S <sub>rel, iso-CTC</sub> (n = 8) [%]	Konz. e-iso-CTC [mg/L]	Peakfläche e-iso-CTC $\bar{y}$ (n = 8) [mAU min]	S <sub>rel, e-iso-CTC</sub> (n = 8) [%]
0,046	76,75	8	0,054	89,75	4
0,11	170,63	3	0,14	211,25	3
0,23	350,38	3	0,27	412,75	2
0,46	686,63	2	0,54	806,25	1
1,16	1794	1	1,34	2076,25	2
2,29	3551	2	2,71	4200,13	1
4,59	6735	1	5,41	7941,13	1

Tab. A. 22: Konzentrationen, Mittelwerte und relative Standardabweichungen der Peakflächen für die Bestimmung von iso-CTC und e-iso-CTC mittels LC-MS/MS (n = 8)

Konz. iso-CTC [mg/L]	Peakfläche iso-CTC $\bar{y}$ (n = 8) [I min]	S <sub>rel, iso-CTC</sub> (n = 8) [%]	Konz. e-iso-CTC [mg/L]	Peakfläche e-iso-CTC $\bar{y}$ (n = 8) [I min]	S <sub>rel, e-iso-CTC</sub> (n = 8) [%]
0,011	7052,38	9	0,014	7811,38	7
0,022	12098,38	7	0,028	13306,75	6
0,046	21481,38	9	0,054	23853,25	9
0,11	49179,25	7	0,14	57276,25	9
0,23	93024,38	6	0,27	106031,38	6
0,46	162757,75	5	0,54	182434,25	9
1,16	396051,50	7	1,34	444983,63	6
2,29	804916,38	6	2,71	937561,88	5
4,59	1473231,13	7	5,41	1668910,63	5

## A.8 Kalibrierung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC

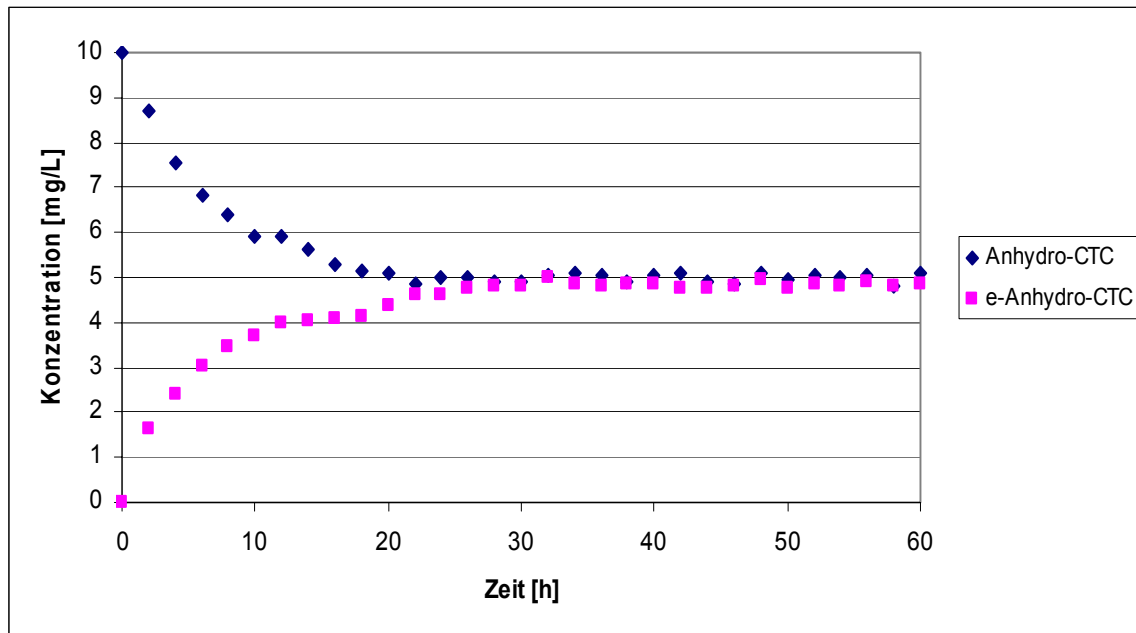


Abb. A. 13: Epimerisierung von Anhydro-CTC in MeOH/Fließmittel A (50/50) (v/v) ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) bei einer Temperatur von  $40^\circ\text{C}$ : Verlauf der Anhydro-CTC- und e-Anhydro-CTC-Konzentration als Funktion von der Zeit (HPLC-UV, 275 nm)

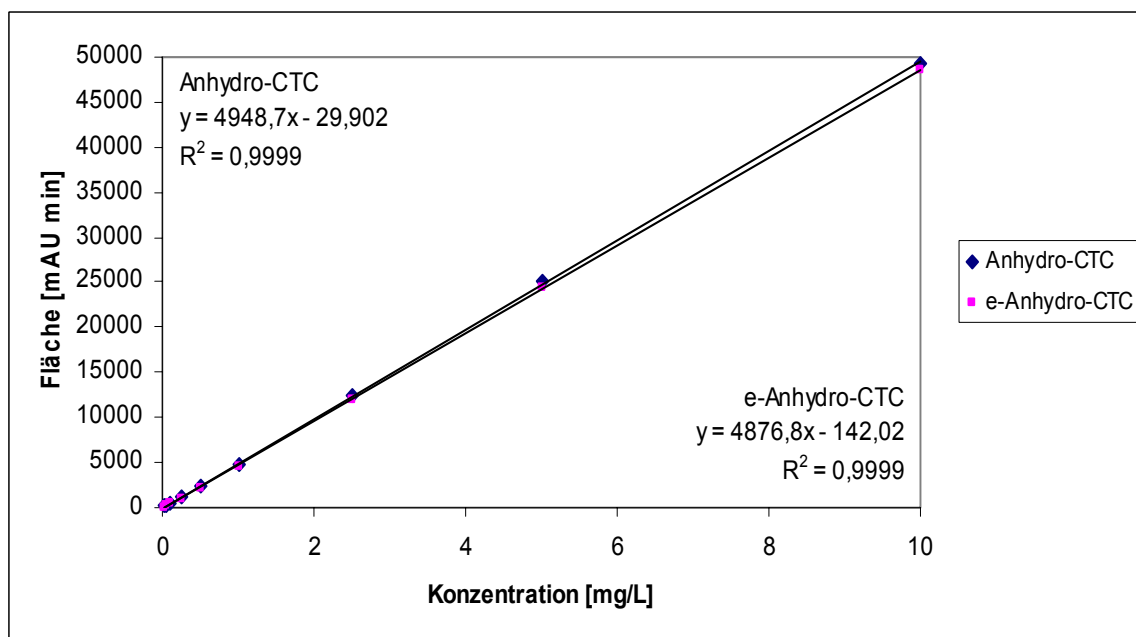


Abb. A. 14: Funktionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche für die Bestimmung von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit HPLC-UV (275 nm) ( $n = 8$ )



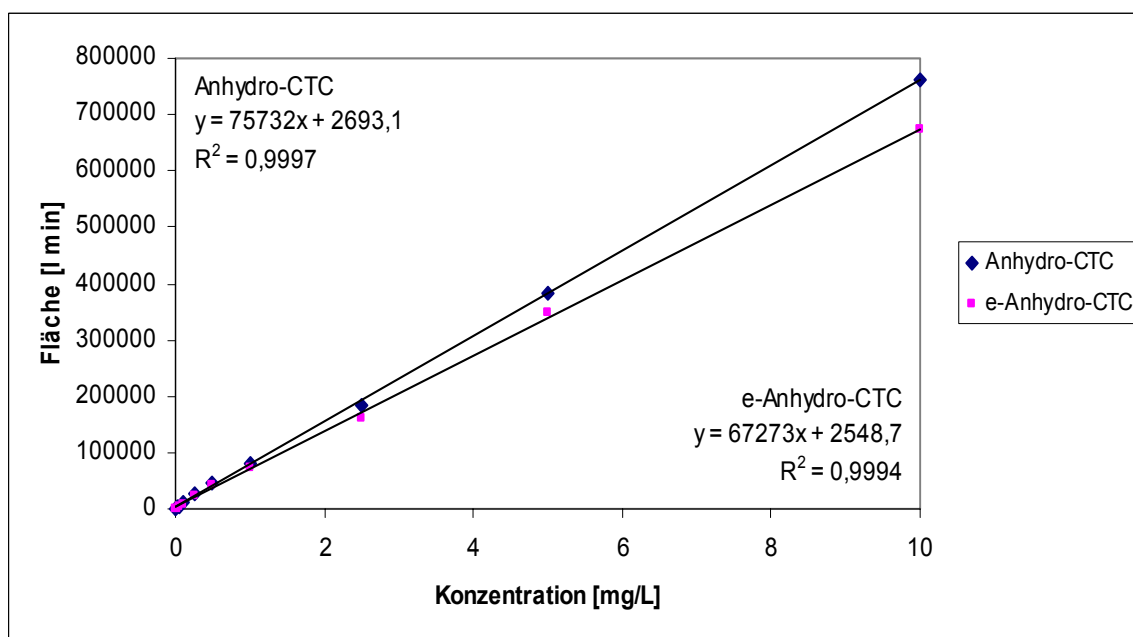


Abb. A. 15: Funktionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche für die Bestimmung von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mit LC-MS/MS ( $n = 8$ )

Tab. A. 23: Konzentrationen, Mittelwerte und relative Standardabweichungen der Peakflächen für die Bestimmung von Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC mittels HPLC-UV-MS/MS ( $n = 8$ )

Konz. [mg/L]	Peakfläche Anhydro-CTC $\bar{y}$ ( $n = 8$ )		S <sub>rel</sub> , Anhydro-CTC ( $n = 8$ ) [%]		Peakfläche e-Anhydro-CTC $\bar{y}$ ( $n = 8$ )		S <sub>rel</sub> , e-Anhydro-CTC ( $n = 8$ ) [%]	
	UV [mAU min]	MS/MS [I min]	UV	MS/MS	UV [mAU min]	MS/MS [I min]	UV	MS/MS
0,01	--	623	--	9	--	551	--	11
0,025	132	2234	7	12	112	1474	5	8
0,05	249	4814	6	10	210	4289	7	7
0,1	466	10189	5	8	424	6701	4	8
0,25	1105	27078	7	6	1025	24136	6	7
0,5	2283	46486	4	7	2177	41142	6	6
1	4775	81486	1	5	4582	72911	1	8
2,5	12486	182849	2	4	11999	161682	2	5
5	25137	381526	1	6	24293	347369	1	6
10	49235	761503	2	5	48634	672679	2	4

## A.9 Analysenvorschrift zur Bestimmung von CTC und Metabolite in Muskulatur, Leber, Niere, Urin, Plasma, Knochen und Faeces

### A. 9.1 Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient der Identifizierung und Quantifizierung von CTC und seiner Umwandlungs- und Abbauprodukte („Metabolite“) aus Muskulatur, Leber, Niere, Urin, Plasma, Knochen und Faeces. Aus dem Endextrakt erfolgt die Identifizierung und Quantifizierung mit HPLC-UV und/oder LC-MS/MS.

### A. 9.2 Liste der erfaßbaren Stoffe

Chlortetracyclin (CTC), epi-Chlortetracyclin (e-CTC), iso-Chlortetracyclin (iso-CTC), e-iso-Chlortetracyclin (e-iso-CTC), Anhydrochlortetracyclin (Anhydro-CTC) und e-Anhydrochlortetracyclin (e-Anhydro-CTC)

### A. 9.3 Prinzip

Nach der Extraktion der Analyten aus der Matrix bzw. Einstellung des pH-Wertes der Probe mit McIlvain-Puffer wird der so erhaltene Extrakt über eine Polymerphasen-Kartusche gereinigt und angereichert. Die Konzentrationsbestimmung der Analyten erfolgt mit HPLC-UV-MS/MS.

### A. 9.4 Reagenzien

- a) Methanol, p. A.
- b) Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz-2-hydrat, (EDTA) reinst
- c) Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, p. A. oder reinst
- d) Natriumhydroxid, granuliert, p. A.
- e) Perchlorsäure, 60%ige (p.a)
- f) Salzsäure, 1 mol/L
- g) Wasser, bidestilliert über Quarzglas
- h) Zitronensäure Monohydrat, p. A.
- i) McIlvain-Puffer, pH 4 mit 0,01 mol/L EDTA  
McIlvain-Stammlösung (Gefäßbeschriftung: *McIlvaine-Stammlösung*): Zunächst wird eine McIlvain-Stammlösung hergestellt, die bei einer Temperatur von 4 °C bis 8 °C im Kühlschrank aufzubewahren ist. Dazu wurden 284 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\hat{=}$  2 Mol) und 210 g Zitronensäure Monohydrat ( $\hat{=}$  1 Mol) mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 L aufgefüllt.  
100 ml McIlvain-Stammlösung wird mit 800 mL bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und 3,72 g EDTA ( $\hat{=}$  0,01 mol/L) darin aufgelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit HCl (6 mol/L) auf 4 eingestellt. Die resultierende Lösung wird mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 L aufgefüllt. Gefäßbeschriftung: **McIlvain-Puffer, pH 4 mit 0,01 mol/L EDTA**
- j) McIlvain-Puffer, pH 4 mit 0,1 mol/L EDTA  
McIlvain-Stammlösung (Gefäßbeschriftung: *McIlvain-Stammlösung*): Zunächst wird eine McIlvain-Stammlösung hergestellt, die bei einer Temperatur von 4 °C bis 8 °C im Kühlschrank aufzubewahren ist. Dazu werden 284 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\hat{=}$  2 Mol) und 210 g Zitronensäure Monohydrat ( $\hat{=}$  1 Mol) mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 L aufgefüllt.

100 ml McIlvain-Stammlösung werden mit 800 mL bidest. H<sub>2</sub>O versetzt und 37,2 g EDTA ( $\approx$  0,1 mol/L) darin aufgelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit HCl (6 mol/L) auf 4 eingestellt. Die resultierende Lösung wird mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt. Gefäßbeschriftung: **McIlvain-Puffer, pH 4 mit 0,1 mol/L EDTA**

k) Extraktionsmittel M

Methanol/McIlvain-Puffer pH 4 mit 0,01 mol/L EDTA (20/80) (v/v)

l) Perchlorsäure 6% (w/w)

Zu 50 g bidest Wasser werden 10 g 60%ige Perchlorsäure gegeben und mit bidestiliertem Wasser auf 100 g aufgefüllt.

m) Fließmittel A

In einen 1000 mL-Meßkolben werden etwa 700 mL bidest. H<sub>2</sub>O vorgelegt und 100 mL Acetonitril (HPLC Gradient Grade) sowie 5 mL konzentrierte Ameisensäure (reinst) zugegeben. Anschließend wird mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt und gut gemischt.

n) Fließmittel B

In einen 1000 mL-Meßkolben werden etwa 200 mL bidest. H<sub>2</sub>O vorgelegt und 600 mL Acetonitril (HPLC Gradient Grade) sowie 5 mL konzentrierte Ameisensäure (reinst) zugegeben. Anschließend wird mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt und gut gemischt.

## A. 9.5 Geräte

- a) Handelsübliche Labor- und Glasgeräte
- b) Ultra-Turrax, T 25 (Janke & Kunkel)
- c) Zentrifuge, Megafuge 2.0R (Heraeus Sepatech/Osterode)
- d) Polymerphasen-Kartuschen: Oasis HLB (Waters, Art.Nr.: WAT106202)
- e) Vakuumfiltrationsgerät J.T. Baker spe-12 G (Baker/Gross-Gerau)
- f) TurboVap® LV Evaporator, Typ ZW 7001 (Zymark/Idstein)
- g) Vortex-Rüttler, Minishaker MS 2 (Ika Labortechnik/Staufen)
- h) Moulinette SE (Moulinex)
- i) Horizontalschüttler HS 501 digital (Ika Labortechnik/Staufen)
- j) Knochenmühle, Typ SM 2000 (Retsch/Haan)

## A. 9.6 Probenvorbereitung

### A 9.6.1 Herstellung der Probenextrakte

**Herstellung des Probenextraktes aus Muskulatur:** Muskulatur wird in einer Moulinette zerkleinert. 5 g dieser zerkleinerten Matrix werden in ein 80 mL Zentrifugenglas eingewogen. Zu den Proben werden 15 mL Extraktionsmittel M gegeben. Anschließend wird 1 min (nach Stoppuhr) mit dem Ultraturrax bei 8000 U/min homogenisiert. Die so homogenisierte Probe wird 25 min bei 3300 g zentrifugiert. Der Turraxstab wird mit 15 mL Extraktionsmittel M gespült. Das Pellet wird mit den 15 mL Extraktionsmittel M erneut 1 min mit dem Ultraturrax bei 8000 rpm homogenisiert und 25 min bei 3300 g zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt, nochmals 15 min bei 3300 g zentrifugiert und der Überstand zur Festphasenextraktion verwendet.

**Herstellung des Probenextraktes aus Leber und Niere:** Leber oder Niere wird in einer Moulinette zerkleinert. 5 g dieser zerkleinerten Matrix werden in ein 80 mL Zentrifugenglas eingewogen. Zu den

Proben werden 15 mL McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA gegeben. Anschließend wird 1 min (nach Stoppuhr) mit dem Ultraturrax bei 8000 U/min homogenisiert. Die so homogenisierte Probe wird 25 min bei 3300 g zentrifugiert. Der Turraxstab wird mit 15 mL McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA gespült. Das Pellet wird mit den 15 mL McIlvain-Puffer erneut 1 Min mit dem Ultraturrax bei 8000 rpm homogenisiert und 25 min bei 3300 g zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt, nochmals 15 min bei 3300 g zentrifugiert und der Überstand zur Festphasenextraktion verwendet.

**Herstellung des Probenextraktes aus Urin:** 5 mL Urin werden in ein 10 mL Zentrifugenglas gegeben. Nach Zugabe von 4 mL McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA wird 15 Minuten bei 3300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand zur Festphasenextraktion verwendet.

**Herstellung des Probenextraktes aus Plasma:** 5 mL Plasma werden in ein 10 mL verschließbares Reagenzglas aus Kunststoff gefüllt. Es werden zur Proteinfällung 5 mL 6%ige Perchlorsäure zugegeben und 30 min auf einer Rüttelmaschine bei 250 Schübe/min geschüttelt. Danach werden die gefällten Proteine 15 min in einer Zentrifuge bei 3300 g abzentrifugiert (gekühlte Zentrifuge: 10 °C). Der Überstand wird in ein Zentrifugenglas überführt, anschließend das Reagenzglas mit 5 mL McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA gespült, ebenfalls in das Zentrifugenglas überführt und schließlich weitere 20 mL McIlvain-Puffer zugegeben. Danach wird 15 Minuten bei 3300 g zentrifugiert (gekühlte Zentrifuge: 10 °C). und der Überstand zur Festphasenextraktion verwendet.

**Herstellung des Probenextraktes aus Knochen:** 1 g mit einer Knochenmühle gemahlene Knochen werden in ein 10 mL verschließbares Reagenzglas aus Kunststoff gegeben. Nach Zugabe von 15 mL 1 mol/L HCl wird die Probenlösung über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wird 45 min bei 260 Schübe/min auf dem Schüttler geschüttelt und der Extrakt über einen Faltenfilter in ein 10 mL-Zentrifugenglas filtriert. Das Reagenzglas aus Kunststoff wird mit 6 mL bidestilliertem Wasser ausgespült und zum Probenextrakt gegeben. Anschließend wird der pH-Wert mit 2 mol/L NaOH auf etwa 4 eingestellt. Die Probenextrakte werden mit bidestilliertem Wasser für die Austarierung der Zentrifuge auf ein bestimmtes Gewicht aufgefüllt. Danach wird 15 Minuten bei 3300 g zentrifugiert (gekühlte Zentrifuge: 10 °C). und der Überstand zur Festphasenextraktion verwendet.

**Herstellung des Probenextraktes aus Kot:** 0,5 g Faeces werden in ein 10 mL verschließbares Reagenzglas aus Kunststoff gegeben. Nach Zugabe von 10 mL McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA wird 15 Minuten bei 260 Schübe/min auf dem Schüttler geschüttelt. Anschließend wird 15 min bei 3300 g und 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein 30 mL Sammelzentrifugenglas gegeben. Das Pellet wird noch zweimal mit 10 mL McIlvain-Puffer mit 0,1 mol/L EDTA extrahiert. Die Extrakte werden jeweils 15 Minuten bei 260 Schübe/min auf dem Schüttler geschüttelt und anschließend 15 min bei 3300 g und 10 °C zentrifugiert. Die vereinigten Überstände im Sammelgefäß werden nochmals 10 min bei 3300 g zentrifugiert und der Überstand zur Festphasenextraktion verwendet.

## A 9.6.2 Aufreinigung durch Festphasenextraktion

Der Probenextrakt wird manuell mittels Festphasenextraktion gereinigt und aufkonzentriert, wozu *Oasis HLB*- Festphasenkartuschen verwendet werden.

### Konditionierung der Kartuschen:

Die Kartusche wird mit 3 mL Methanol und anschließend mit 3 mL bidest. Wasser konditioniert. (Nach der Konditionierung darf die Kartusche nicht trockengesaugt werden!)

### Probenaufgabe:

Der Probenextrakt wird sofort nach der Konditionierung *langsam* durch die Festphasenkartusche gesaugt. Nach der Probenaufgabe wird die Kartusche für Muskulaturextrakt zweimal mit 3 mL MeOH/bidest. H<sub>2</sub>O (30/70) und für die anderen Probenextrakte zweimal mit 3 mL MeOH/bidest. H<sub>2</sub>O (5/95) gespült und anschließend kurz trockengezogen.

### Elution:

Die *langsame, tropfenweise* Elution der Analyten erfolgt mit 3 ml Methanol in ein 10 mL Turbovap-glas. (Bemerkung: Für die Bestimmung von Anhydrochlortetracyclin und e-Anhydrochlortetracyclin mit 6 mL Methanol eluieren!)

## **A 9.6.3 Herstellung des Endextraktes**

Das Eluat wird im TurboVap bei 30°C Badtemperatur bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 200 µL Methanol/ Fließmittel A (50/50) (v/v) aufgenommen. Kann der Extrakt nicht sofort vermessen werden, wird der Extrakt im Tiefkühlschrank bei -26°C bis zur Messung gelagert.

## **A. 9.7 HPLC-UV-MS/MS-Messung**

### **A 9.7.1 Standardlösungen**

**Stammlösungen:** Die Stammlösungen aller eingesetzten Substanzen werden als Einzellösungen hergestellt und aliquotiert bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt. Zur Herstellung der Stammlösung werden 10 mg der Festsubstanz in einen 10 mL-Meßkolben eingewogen und mit Methanol (p. a.) auf 10 mL aufgefüllt. Diese Lösung ( $\beta = 1\text{g/L}$ ) werden in Aliquoten von 1 mL aufgeteilt und sofort tiefgefroren.

**Kalibrierlösungen:** Die Kalibrierlösungen der jeweiligen Epimerenpaaren (CTC/e-CTC, Anhydro-CTC/e-Anhydro-CTC, epimerisiertes iso-CTC) wurden aufgrund der Stabilität, bedingt durch die leichte Epimerisierung in schwach saurer Lösung, im Verhältnis 1:1 durch Verdünnung der Stammlösungen mit Methanol/Fließmittel A (50/50) (v/v) hergestellt, anschließend entsprechend der Stammlösungen aliquotiert und bei einer Temperatur von -80 °C eingefroren.

### **A 9.7.2 Analysengeräte**

HPLC-UV-MSMS-Anlage (Alliance 2690, Waters/Quattro Ultima, Micromass) mit Ion-Spray Interface, MassLynx-Auswertesoftware.

### **A 9.7.3 HPLC-UV-Einstellungen**

Flußrate:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	20 bzw. 40 µL
Fließmittel:	A, B
Vorsäule:	YMC-ODS-AM, (19 x 3 mm, 5 µm)
Trennsäule	YMC ODS-AM (150 x 3 mm, 3 µm)

Detektionswellenlänge: 370 nm (CTC, e-CTC)

275 nm (iso-CTC, e-iso-CTC, Anhydro-CTC, e-Anhydro-CTC)

Gradient:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	90	10
1,5	80	20
12	60	40
15	40	60
18	0	100
22	0	100
25	90	10
29	90	10

## A 9.7.4 LC-MS/MS-Einstellungen

Die Detektion der Analyten mittels Tandemmassenspektrometer erfolgt mit der Electrospray-Ionisation im positiven Meßmodus (ESI<sup>+</sup>). Die MS/MS-Detektion erfolgt dabei im MRM-Modus.

### Instrument-Parameter

Polarity	ESI <sup>+</sup>
Calibration	Static 2
Capillary (kV)	3.50
Cone (V)	50
Hex 1 (V)	0.0
Aperture (V)	0.0
Hex 2 (V)	0.5
Source Temperature (°C)	125
Desolvation Temperature (°C)	270
Cone Gas Flow (L/h)	100
Desolvation Gas Flow (L/h)	500
LM 1 Resolution	10.0
HM 1 Resolution	10.0
Ion Energy 1	1.0
Entrance	15
Collision	25
Exit	15
LM 2 Resolution	10.0
HM 2 Resolution	10.0
Ion Energy 2	1.0
Multiplier (V)	650

## MS/MS-Methode

### CTC und e-CTC

Precursor-Ion m/z	Cone [V]	Produkt-Ion m/z	Dwell Time [sec]	Collision [eV]
478,9	20	154,0	0,4	30
		370,5	0,5	30
		443,7	0,2	20
		462,0	0,3	20
480,5		464,1	0,3	20
		446,1	0,3	20

### iso-CTC und e-iso-CTC

Precursor-Ion m/z	Cone [V]	Produkt-Ion m/z	Dwell Time [sec]	Collision [eV]
478,9	20	154,0	0,4	30
		197,0	0,5	40
		462,3	0,3	20
480,6		464,2	0,3	20

### Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC

Precursor-Ion m/z	Cone [V]	Produkt-Ion m/z	Dwell Time [sec]	Collision [eV]
461,5	20	98,0	0,4	30
		154,0	0,5	25
		443,9	0,2	25
462,7		445,8	0,3	25

## A 9.7.5 Identitätsnachweis

Die Identifizierung erfolgt über die UV-Spektren, sowie über die Massenspektren der Fragmentationen, ihre relativen Intensitäten und Retentionszeiten.

## A 9.7.6 Quantifizierung

Die Quantifizierung kann mit HPLC-UV oder mit LC-MS/MS in Plasma, Faeces, Muskulatur und Knochen erfolgen. Für Urin, Leber und Niere ist eine Auswertung über die UV-Chromatogramme nicht möglich. Zur Quantifizierung wird mit Hilfe von Standardlösungen eine Kalibriergerade erstellt (externe Standardmethode) und der Stoffgehalt der Proben in ng pro Probeninjektionsvolumen ermittelt. Anschließend erfolgt die Berechnung der Analytmenge in der Probe in µg/L bzw. µg/kg Matrix.