

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

Tetracycline zählen zu den in der landwirtschaftlichen Tierhaltung verordnungstärksten Antibiotika. Von besonderer Bedeutung ist Chlortetracyclin (CTC), das vor allem bei Schweinen als Fütterungsarzneimittel eingesetzt wird. Die intensive Anwendung dieses Antibiotikums ist durch mögliche Einträge in die Nahrungskette über Lebensmittel tierischer Herkunft mit dem steigenden Risiko der Resistenzentstehung verbunden. Da Tetracycline Epimere bilden, ist für Kontrolluntersuchungen gesetzlich vorgeschrieben, die Rückstände in Muskulatur, Leber, Niere, Milch und Eier als Summe von Muttersubstanz und Epimeren zu ermitteln. Bestimmte Grenzwerte (MRL = Maximum Residue Limit) dürfen nicht überschritten werden. Neben dem Epimeren (e-CTC) bildet CTC aber weitere mikrobiell und toxikologisch relevante Umwandlungs- und Abbauprodukte (auch „Metabolite“ genannt), die bisher mit validierten Analyseverfahren nicht bestimmbar waren.

Zur Aufklärung dieser besonderen, noch ungeklärten Rückstandsproblematik wurden zwei Medikationsstudien unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt (Haus Düsse, Bad Sasendorf, und FAL Braunschweig). Dazu wurden arzneimittelfrei aufgezogene Ferkel nach der Aufstallung unter praxisnahen therapeutischen Bedingungen definiert medikamentiert. Es sollte sowohl das Ausscheidungsverhalten von CTC anhand von Kot- und Urinproben untersucht als auch die verbleibenden Rückstände in Schlachtproben analysiert werden.

Deshalb wurden in einem ersten Schritt Analyseverfahren zur Bestimmung von CTC und e-CTC in Urin, Faeces und Plasma sowie in Knochen, Muskulatur, Leber und Niere entwickelt und nach international gültigen Richtlinien umfassend validiert. Diese Verfahren umfassen die Extraktion der Proben mit McIlvain-Puffer, eine Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Extrakte mit Festphasenextraktion (Oasis HLB) und die chromatographische Identifizierung und Quantifizierung mit HPLC-UV-MS/MS.

Die Analysendaten aus den Medikationsstudien ergaben, daß neben dem Epimeren des CTC auch in hohem Maße die isomeren Verbindungen iso-CTC und e-iso-CTC sowie in geringen Mengen Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC nachweisbar sind. Das Analyseverfahren wurde daher für die quantitative Bestimmung dieser zusätzlichen Metabolite erweitert. Insbesondere wurde eine Methode entwickelt, um das kommerziell nicht erhältliche e-iso-CTC durch Epimerisierung des iso-CTC in Standardlösung herzustellen. Darüber hinaus konnte ein weiterer Metabolit, und zwar das Keto-Tautomer des e-CTC, in den Proben massenspektroskopisch (LC-MS/MS-Technik) identifiziert werden. Die Untersuchungen machten deutlich, daß diese zusätzlichen CTC-Komponenten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* während der Probenaufbereitung in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und pH-Wert entstehen.

Eine detaillierte Bilanzierungsstudie ergab, daß ein Großteil der den Tieren applizierten, definierten Wirkstoffmenge hauptsächlich über Faeces (88 %) und geringfügig über Urin (5 %) ausgeschieden wird. Von der im Tier verbleibenden Menge lagert sich der größte Teil (2,75 %) im Knochen ein. Vergleichsweise geringe Gehalte wurden in Muskulatur (0,09 %), Leber (0,005 %) und Niere (0,001 %) gefunden. Von besonderer Relevanz ist dabei die Tatsache, daß in allen Schlachtproben neben CTC und e-CTC zusätzlich die Isomeren und in geringfügigerem Maße die Anhydro-Verbindungen nachgewiesen wurden. Diese Chlortetracyclin-Metabolite sollten daher bei Rückstandskontrollen, die bisher auf die Summengehalte von CTC und e-CTC beschränkt sind, mit einbezogen werden. Dadurch sind Überschreitungen der MRL-Werte nach den vorliegenden Daten durchaus möglich.

Die in dieser Arbeit entwickelten routinefähigen, validierten Methoden führten somit zu neuen, Verbraucherschutzrelevanten Erkenntnissen und erweiterten Möglichkeiten bei der Kontrolle vom Tier stammender Lebensmittel.