

Aus der Zentrumsabteilung  
für Lebensmittelkunde, Fleischhygiene und -technologie  
des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

---

**Verbleib in Knochen gebundener Rückstände von Tetracyclinen  
während der Herstellung von Gelatine  
mit dem sauren Aufschlussverfahren**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
(Dr. med. vet.)  
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
Frauke Schulze  
aus Celle

Hannover 2003

Wissenschaftliche Betreuung: Priv.-Doz. Dr. M. Kühne

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. M. Kühne
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. W. Löscher

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2003

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Tetracycline</b> .....	<b>12</b>
2.1.1	Herkunft, Struktur und physikochemische Eigenschaften .....	12
2.1.2	Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum .....	14
2.1.3	Pharmakokinetik .....	15
2.1.4	Anwendung in Veterinär- und Humanmedizin .....	16
2.1.5	Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte.....	16
2.1.6	Resistenzmechanismus und Resistenzsituation .....	19
2.1.7	Rückstände von Tetracyclinen in Lebensmitteln.....	21
2.1.8	Nachweisverfahren für Tetracycline .....	29
<b>2.2</b>	<b>Gelatine</b> .....	<b>30</b>
2.2.1	Begriffsbestimmung .....	30
2.2.2	Rohstoffe .....	30
2.2.3	Herstellung.....	32
2.2.4	Eigenschaften.....	39
2.2.5	Verwendungsmöglichkeiten .....	40
2.2.6	Lebensmittelrechtliche Anforderungen .....	42
2.2.7	Futtermittelrechtliche Anforderungen .....	44
<b>2.3</b>	<b>Folgerungen aus dem Schrifttum und daraus resultierende Zielsetzung für die eigenen Untersuchungen</b> .....	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung von Gelatine aus Knochen</b> .....	<b>46</b>
3.1.1	Gewinnung des Probenmaterials .....	46
3.1.2	Herstellungsverfahren.....	46
3.1.3	Sensorische Untersuchung der Gelatine .....	50

<b>3.2</b>	<b>Aufarbeitung der Proben für die High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).....</b>	<b>50</b>
3.2.1	Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen.....	50
3.2.2	Knochen.....	53
3.2.3	Entfettungswasser und Enzymlösung.....	54
3.2.4	Ossein .....	54
3.2.5	Gelatine.....	55
3.2.6	Salzsäure aus der Mazeration .....	55
3.2.7	Dicalciumphosphat .....	56
<b>3.3</b>	<b>HPLC-Untersuchung.....</b>	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>Chemische Untersuchungen.....</b>	<b>59</b>
3.4.1	Asche-Bestimmung .....	59
3.4.2	Trockensubstanz-Bestimmung .....	59
3.4.3	Fettgehaltsbestimmung.....	59
3.4.4	Rohprotein-Bestimmung .....	60
3.4.5	Bindegewebsweiß-Bestimmung .....	60
<b>3.5</b>	<b>Ionenaustausch.....</b>	<b>61</b>
3.5.1	Vorbereitung.....	61
3.5.2	Durchführung.....	62
<b>3.6</b>	<b>Statistische Auswertung der Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der UV-Untersuchung.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>Mittlere Wiederfindungsraten der angewendeten Methoden .....</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse der Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen.....</b>	<b>67</b>
4.3.1	Ergebnisse der Aufarbeitung von Knochen mit der Korngröße 2-6 mm.....	67
4.3.2	Ergebnisse der Aufarbeitung von Knochen mit der Korngröße 1-2 mm .....	69
<b>4.4</b>	<b>Ergebnisse der HPLC-Untersuchung der Knochen vor und nach der Trocknung auf gebundene Rückstände von Tetracyclinen .....</b>	<b>70</b>

<b>4.5</b>	<b>Ergebnisse der HPLC-Untersuchung der Enzymlösung aus der enzymatischen Behandlung der Knochen.....</b>	<b>71</b>
<b>4.6</b>	<b>Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Abwassers aus der Entfettung der Knochen .....</b>	<b>71</b>
<b>4.7</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchungen der Salzsäure und der Schwefelsäure aus der Mazeration.....</b>	<b>72</b>
4.7.1	Bestimmung von Volumen, pH-Wert und Dichte .....	72
4.7.2	Ergebnisse der HPLC-Untersuchung auf Rückstände von Tetracyclinen.....	75
<b>4.8</b>	<b>Vergleich der Tetracyclin-Gehalte von Knochen und Säure.....</b>	<b>88</b>
<b>4.9</b>	<b>Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Osseins.....</b>	<b>89</b>
<b>4.10</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchungen des Endproduktes Gelatine .....</b>	<b>90</b>
4.10.1	Ergebnisse der sensorischen Untersuchung.....	90
4.10.2	Ergebnisse der HPLC-Untersuchung.....	91
<b>4.11</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchung von Dicalciumphosphat .....</b>	<b>91</b>
<b>4.12</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchungen zum Ionenaustausch.....</b>	<b>92</b>
4.12.1	Kationenaustausch .....	92
4.12.2	Anionenaustausch.....	92
4.12.3	Kombinierter Kationen- und Anionenaustausch .....	92
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion der Methodik.....</b>	<b>96</b>
5.1.1	Herstellung der Gelatine aus Knochen .....	96
5.1.2	Ionenaustauschverfahren .....	99
5.1.3	Aufarbeitung der Proben für die HPLC-Untersuchung.....	100
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>101</b>
5.2.1	Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen.....	101
5.2.2	Einfluß der Trocknung auf Tetracyclin-Rückstände in Knochen.....	102
5.2.3	Tetracyclin-Gehalte in den Proben aus dem Herstellungsprozess von Gelatine.....	104

5.2.4	Einfluß des Ionenaustauschverfahrens auf den Gehalt von Tetracyclin- Rückständen in Gelatine .....	108
<b>5.3</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Schrifttumsverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>130</b>



## Abkürzungsverzeichnis:

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Ø	Durchschnitt
®	eingetragenes Warenzeichen
Abb.	Abbildung
ADI	acceptable daily intake
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATC	Anhydrotetracyclin
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
CTC	Chlortetracyclin
CVMP	Committee for veterinary medicinal products
d.h.	das heißt
E-ATC	Epi-Anhydrotetracyclin
E. coli	Escherichia coli
E-CTC	Epi-Chlortetracyclin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
et al.	et alii
E-TC	Epi-Tetracyclin
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramm
GME	Gelatine Manufacturers of Europe
h	Stunde
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
Hrsg.	Herausgeber
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
i.e.	id est
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter

LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LD	Letale Dosis
M	molar
Max.	Maximum
mg	Milligramm
min	Minuten
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MHK	minimale Hemmkonzentration
mol/l	Mol pro Liter
MRL	maximum residue limit
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Probenanzahl
nm	Nanometer
N	normal
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NOEL	no observed effect level
O	Sauerstoff
OTC	Oxytetracyclin
p	Signifikanzniveau
pH	potentia hydrogenii
ppm	parts per million
Pztl.	Perzentil
R	Rest
s.	siehe
S.	Seite
SAS	Statistical Analysis System
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
t	Tonnen
Tab.	Tabelle
TC	Tetracyclin
to	Tonnen
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TS	Trockensubstanz
U	Umdrehungen
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
VO	Verordnung
vol.	Volumen
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

In Europa werden jährlich ca. 115.000 t Gelatine produziert. Von der Lebensmittelindustrie werden ca. 60 % der jährlich produzierten Gelatine verarbeitet, der restliche Anteil findet Verwendung in der pharmazeutischen und fotografischen Industrie (HEESCHEN 2002). Gelatine ist ein Peptidgemisch und wird durch chemisch-thermischen Abbau von Kollagen gewonnen; als Rohstoffe für die industrielle Herstellung dienen Knochen von Schweinen, Rindern und Kälbern, Schweineschwartensowie Kalbs- und Rinderhaut (SCHRIEBER 1988).

Die zu der Gruppe der Breitspektrumantibiotika gehörenden Tetracycline sind die in der Nutztierpraxis mit Abstand am häufigsten eingesetzten Antibiotika (FEDESA 1998). Seit langem bekannt ist die Affinität der Tetracycline zu calciumhaltigen Geweben und das daraus resultierende Phänomen der Einlagerung in Knochen (BUYSKE et al. 1960; BRÜGGEMANN et al. 1966). In Untersuchungen an tauglich beurteilten, geschlachteten Tieren konnten KÜHNE et al. (2000) eine hohe Prävalenz von gebundenen Rückständen von Tetracyclinen in Knochen nachweisen.

Im Hinblick auf die bekannte Rückstandsproblematik von Tetracyclinen insbesondere in Schweineknöcheln stellt sich die Frage, inwiefern die einzelnen Prozessschritte bei der Herstellung von Gelatine geeignet sind, die im Knochen gebundenen Tetracycline zu eliminieren, und ob sich Rückstände eventuell im Lebensmittel Gelatine wiederfinden.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine experimentelle Gelatineherstellung aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln nach dem in der Industrie üblichen sauren Aufschlussverfahren für Knochen durchgeführt werden. In Kooperation mit der deutschen Gelatineindustrie wurde angestrebt, bei der Gelatineherstellung im Labormaßstab die tatsächlichen industriellen Bedingungen so weit wie möglich zu simulieren. Ziel dieser Arbeit war es, den Verbleib von in Schweineknöcheln gebundenen Rückständen von Tetracyclinen während der Gelatineherstellung aufzuzeigen. Außer den Ausgangsmaterialien und dem Endprodukt Gelatine wurden sämtliche während des Herstellungsprozesses entstehenden Abfälle und Abwässer auf Rückstände untersucht.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Tetracycline

#### 2.1.1 Herkunft, Struktur und physikochemische Eigenschaften

Als erster Vertreter der Familie der Tetracycline wurde 1947 das Chlortetracyclin (CTC) aus Kulturfiltraten von *Streptomyces aureofaciens*, einer Actinomycetenspezies, isoliert. Es folgte 1949 die Darstellung von Oxytetracyclin (OTC) aus Nährlösungen von *S. rimosus*. Der eigentliche Grundkörper und Namensgeber der Antibiotikafamilie, das Tetracyclin (TC), wurde 1953 unabhängig voneinander einerseits aus Nährlösungen verschiedener Streptomycesarten isoliert, andererseits konnte es als partialsynthetisches Produkt aus der katalytischen Hydrogenolyse von Chlortetracyclin gewonnen werden (MITSCHER 1978; GOODMAN 1985).

Der Name der Tetracycline leitet sich von ihrem isocyclischen Grundkörper, einem aus vier linear kondensierten Cyclohexanringen bestehendem Naphtacen-Gerüst, ab. Seit der Entdeckung der ersten Tetracycline ist eine große Anzahl von Derivaten isoliert oder gezielt synthetisiert worden, die sich vom Grundgerüst des Tetracyclins in Anzahl und Stellung der Substituenten unterscheiden. Zur Anwendung in der Veterinärmedizin sind Tetra-, Chlortetra- und Oxytetracyclin sowie das halbsynthetisch hergestellte Doxycyclin zugelassen (KROKER et al. 2002); ihre Strukturformeln sind in Abbildung 1 dargestellt.

Tetracycline sind als kristalline, gelbliche Pulver in trockener Form lagerungsstabil. In wässriger Lösung variiert ihre Stabilität substanzspezifisch in Abhängigkeit von pH und Temperatur (STAHLMANN u. LODE 2001).

Durch ihre sauren und basischen funktionellen Gruppen am Grundgerüst sind Tetracycline amphotere Substanzen und bilden mit Säuren und Basen wasserlösliche Salze. Aufgrund ihrer Struktur neigen sie zur Ausbildung von stabilisierenden Wechselwirkungen mit anderen Molekülen und Ionen, wobei eine ausgeprägte Affinität zur Komplexierung von bi- und trivalenten Metallkationen besteht (OTTEN et al. 1975; STAHLMANN u. LODE 2001).

Die MHK-Werte (Minimale Hemmkonzentration), die für die antimikrobielle Wirksamkeit erforderlich sind, variieren speziesspezifisch stark. Allgemein liegen die Grenzen der Empfindlichkeit beim Menschen im Bereich 0,5 – 2 µg/ml (KROKER et al. 2002).

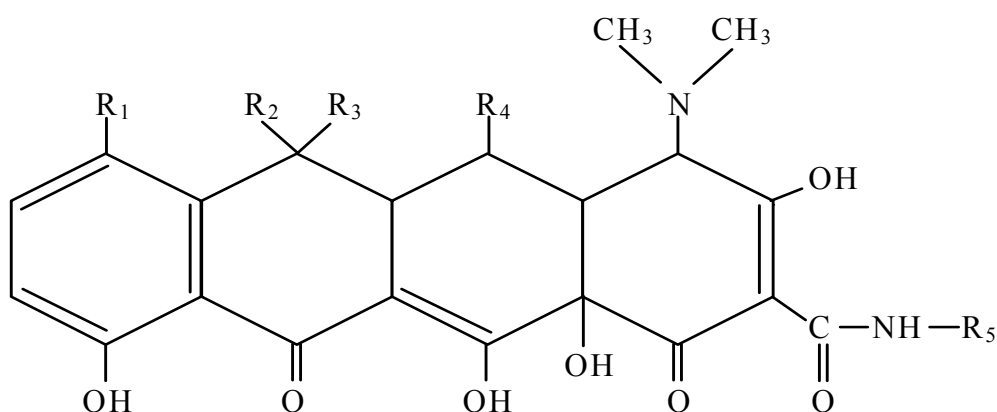


Abb. 1: Allgemeine Grundstruktur der Tetracycline (Formeln nach HLAVKA u. BOOTHE 1985)

**Tetracyclin:**

R<sub>1</sub> = -  
 R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
 R<sub>3</sub> = OH  
 R<sub>4</sub> = -  
 R<sub>5</sub> = H

**Oxytetracyclin:**

R<sub>1</sub> = -  
 R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
 R<sub>3</sub> = OH  
 R<sub>4</sub> = OH  
 R<sub>5</sub> = H

**Chlortetracyclin:**

R<sub>1</sub> = Cl  
 R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
 R<sub>3</sub> = OH  
 R<sub>4</sub> = -  
 R<sub>5</sub> = H

**Doxycyclin:**

R<sub>1</sub> = -  
 R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
 R<sub>3</sub> = -  
 R<sub>4</sub> = OH  
 R<sub>5</sub> = H

### 2.1.2 Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum

Tetracycline hemmen die ribosomale Proteinsynthese in Bakterien, indem sie mit der Bindung von Aminoacyl-t-RNA an der Akzeptorseite der 70-S-Ribosomen interferieren. Die Bindung erfolgt an beiden Untereinheiten der 70-S-Ribosomen, wobei der primäre Angriffsort der Tetracycline auf der kleineren 30-S-Untereinheit liegt, mit der auch ein stärkerer Komplex gebildet wird (CHOPRA 1985; KROKER et al. 2002).

Von Bedeutung für die intrazelluläre Tetracyclin-Konzentration ist der Aufnahmemechanismus von Antibiotikamolekülen in die Bakterienzelle. Um die Ribosomen in gramnegativen Bakterien zu erreichen, müssen Tetracycline zwei Membranen passieren: Die äußere und die innere, cytoplasmatische Membran. In Studien an *E. coli* beobachteten CHOPRA (1992) und THANASSI et al. (1995) spezielle Porin-Proteine in der äußeren Bakterienmembran, durch die eine passive Diffusion der Moleküle in den periplasmatischen Raum ermöglicht wird. Die Tetracyclin-Moleküle liegen während dieses Prozesses als positiv geladene Magnesium-Komplexe vor (CHOPRA 1992). Im periplasmatischen Raum dissoziiert der Komplex und setzt Tetracyclin frei, das in seiner ungeladenen, hydrophoben Form passiv durch die Phospholipidschichten der Cytoplasmamembran diffundieren kann (ARGAST u. BECK 1984). Auch in grampositiven Bakterien wird die Diffusion der Tetracycline durch die Membran in elektroneutraler, lipophiler Molekülform beschrieben (CHOPRA u. ROBERTS 2001). Die Anhäufung von Tetracyclin im Cytoplasma ist jedoch an einen pH-Gradienten gebunden und stellt somit einen energieabhängigen Prozeß dar (SCHNAPPINGER u. HILLEN 1996). Im Cytoplasma, das hohe Konzentrationen von Magnesiumionen aufweist, entstehen vermutlich wieder geladene Chelatverbindungen. Nach CHOPRA (1992) findet die Bindung der Tetracycline an die Ribosomen in Form von Magnesiumkomplexen statt.

Tetracycline wirken bakteriostatisch auf zahlreiche grampositive, gramnegative und nach Gram nicht färbbare Bakterien sowie auf die zellwandlosen Mykoplasmen, Chlamydien und Rickettsien; ebenfalls werden einige Protozoenarten inhibitorisch beeinflusst. Die therapeutische Breite der Tetracycline ist hoch, da sie zu den 80-S-Ribosomen von Eukaryonten eine deutlich geringere Affinität als zu den bakteriellen 70-S-Ribosomen aufweisen. Bei Überdosierungen werden jedoch auch eukaryontische Zellen in der Proteinbiosynthese beeinträchtigt (STAHLMANN u. LODE 2001).

### 2.1.3 Pharmakokinetik

Während die Resorption der älteren Tetracycline nach oraler Gabe nur mäßig erfolgt, werden die neueren Präparate wie z.B. Doxycyclin aufgrund ihrer hohen Lipidlöslichkeit mit ca. 90 % sehr gut resorbiert (STAHLMANN u. LODE 2001). Die pharmakokinetischen Daten der für die Veterinärmedizin zugelassenen Tetracycline sind in Tabelle 1 zusammengestellt (nach KROKER et al. 2002). Bei allen Tetracyclinen kann die Resorptionsquote in Abhängigkeit von der gleichzeitigen Nahrungsaufnahme und Verabreichung von Medikamenten individuell erheblich reduziert werden, da Tetracycline die Eigenschaft besitzen, mit bi- und trivalenten Metallionen schwerlösliche Chelate zu bilden. Insbesondere die gleichzeitige Einnahme von Milchprodukten, Antazida oder Eisenpräparaten führt zur Komplexbildung und behindert somit die Resorption der Tetracycline aus dem Magen-Darm-Trakt.

Aufgrund ihrer Lipophilie verteilen sich Tetracycline leicht im Körpergewebe und erreichen auch intrazellulär befindliche Krankheitserreger. Sie sind placentagängig und gehen in die Muttermilch über, während die Liquorgängigkeit nur unzureichend ist (KROKER et al. 2002). Die Exkretion der Tetracycline erfolgt in aktiver Form renal durch glomeruläre Filtration oder via Faeces (KROKER et al. 2002).

**Tab. 1: Pharmakokinetische Daten von Tetracyclinen (nach KROKER et al. 2002)**

<b>Tetracyclin</b>	<b>Enterale Resorption %</b>	<b>Halbwertszeit h</b>	<b>Proteinbindung %</b>	<b>Urinausscheidung %</b>
Tetracyclin	50 (Hund) bis 80 (Mensch)	5 (Hund) 10 (Kalb) 10 (Mensch)	36 (Rind) 70-80 (Hund) 25-55 (Mensch)	56-85 (Hund) 40 (Mensch)
Chlortetracyclin	24 (Hund) 47 (Kalb) 25-30 (Mensch)	5 (Hund) 9 (Kalb) 5-6 (Mensch)	38 (Rind) 61 (Hund) ca. 50 (Mensch)	ca. 20 (Mensch)
Oxytetracyclin	60 (Mensch)	3 (Huhn) bis 11 (Pferd) 8-10 (Mensch)	< 30	30 (Mensch)
Doxycyclin	70 (Hund) 45 (Katze) > 90 (Mensch)	10 (Hund) 8 (Katze) 12-18	80-90 (Mensch)	25 (Mensch)

## 2.1.4 Anwendung in Veterinär- und Humanmedizin

Zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren sind in der Veterinärmedizin Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Doxycyclin auf dem Markt. In der Humanmedizin wird neben Minocyclin und Tetracyclin vor allem Doxycyclin eingesetzt, während Chlortetracyclin nur zur topischen Anwendung angeboten wird.

Nach Angaben der FEDESA (European Federation of Animal Health) zum Antibiotika-Gesamtverbrauch in Europa wurden 1997 ca. 10.500 t Antibiotika eingesetzt, davon 48 % in der Veterinärmedizin. Von den in der Veterinärmedizin angewendeten Antibiotika waren die Tetracycline mit 66 % die dominierende Stoffklasse (FEDESA 1998). Der Gesamtverbrauch der Antibiotika stieg im Jahre 1999 auf 13.216 t, es liegen jedoch keine Angaben zum Anteil der Tetracycline an diesen Einsatzmengen vor (FEDESA 2001).

## 2.1.5 Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte

### 2.1.5.1 4-Epi-Tetracycline

Als Epimerisierung wird eine reversible Konfigurationsänderung an einer organischen Verbindung bezeichnet, wenn sie sich nur an einem von mehreren asymmetrischen C-Atomen vollzieht. Bei allen Tetracyclinen kommt es in schwach sauren Lösungen (pH 2,0 – 6,0) zu einer Drehung der Dimethylammoniumgruppe am Kohlenstoffatom C<sub>4</sub>; die entstandenen Strukturen werden als 4-Epimere der Muttersubstanzen bezeichnet (MITSCHER 1978; ROGALSKI 1985). Die Strukturformeln sind in Abbildung 2 dargestellt:

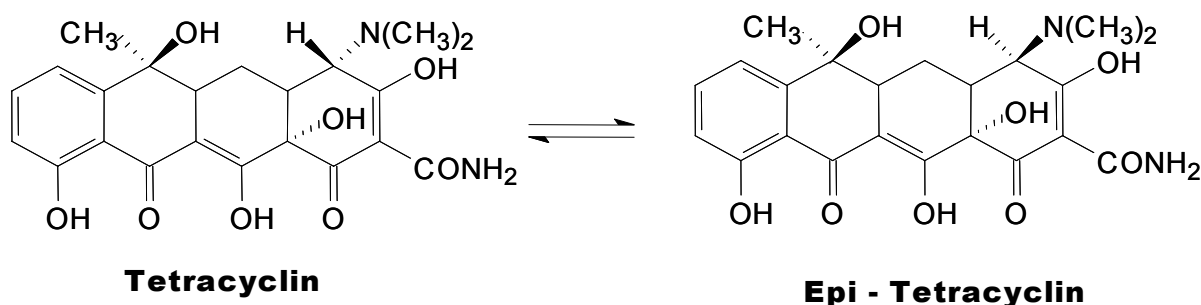


Abb. 2: Strukturformeln von Tetracyclin und 4-Epimer



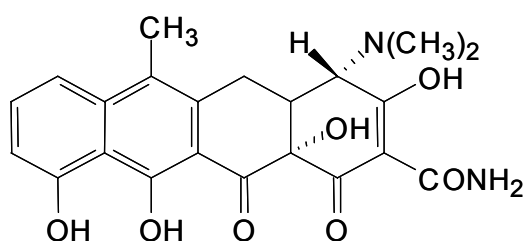
Tetracycline und ihre Epimere liegen in Abhängigkeit vom jeweiligen Umgebungsmilieu in einem Gleichgewicht vor, wobei Milieuveränderungen wie eine Verschiebung des pH-Wertes das Gleichgewicht in die eine oder andere Richtung drängen können (SCHEDL 2000).

KÜHNE (1995) konnte im Rahmen seiner Untersuchungen in fast allen Gewebeproben von Schlachttieren, die Rückstände von TC und CTC aufwiesen, gleichzeitig auch das entsprechende Epimer nachweisen. Die Vermutung, dass es bereits in vivo zu einer Epimerisierung der Tetracycline kommen kann, wurde durch die Ergebnisse einer Fütterungsstudie von ZURHELLE et al. (1999) bekräftigt: In Eiern von Legehennen, denen oral TC, CTC und OTC verabreicht worden war, befanden sich außer den verabreichten Muttersubstanzen auch die Epimere von TC und CTC. KÜHNE und WENZEL (2001c) wiesen 4-Epi-Chlortetracyclin (E-CTC) in Kalbfleischproben als ein bereits in vivo und nicht erst während der Probenaufbereitung gebildetes Umbauprodukt von CTC nach.

Die Epimerisierung zieht einen weitgehenden Verlust der antimikrobiellen Wirkung nach sich (ROGALSKI 1985). Aktuelle Studien bezüglich der Toxizität der Epimere liegen im wissenschaftlichen Schrifttum nicht vor. KLIMOVA und ERMOLOVA (1976) stellten in ihren Untersuchungen der toxischen Effekte von Epimeren auf Hühnerembryonen fest, dass die LD<sub>50</sub> von 4-Epi-TC 4,8-fach niedriger liegt als die LD<sub>50</sub> von TC (eine letale Dosis<sub>50</sub> liegt vor, wenn 50 % der Versuchseinheiten gestorben sind).

#### **2.1.5.2 Anhydrotetracycline**

In stark sauren Lösungen (pH < 2,0) sowie unter dem Einfluß von hohen Temperaturen kommt es bei Tetracyclinen durch Dehydratation der C<sub>6</sub>-OH-Gruppe und nachfolgende Reorganisation der Doppelbindung C<sub>11a</sub>–C<sub>12</sub> zu der irreversiblen Überführung in Anhydrotetracycline und deren Epimere (WALTON et al. 1970; LOSEVA u. SHUKAILO 1972; YUEN u. SOKOLOSKI 1977; ROGALSKI 1985). Die Strukturformel von Anhydrotetracyclin ist in Abbildung 3 dargestellt:



### Anhydrotetracyclin

Abb. 3: Strukturformel von Anhydrotetracyclin

In einem Hoherhitzungsversuch mit tetracyclinhaltigen Fleischknochenmehlen stellten KÜHNE et al. (2001a) fest, dass die Hitzebehandlung bei 133 °C eine partielle Umwandlung von TC in Anhydrotetracyclin (ATC) und Epi-Anhydrotetracyclin (E-ATC) zur Folge hatte; die Gesamt-ATC-Konzentrationen nahmen um durchschnittlich 533 % zu. Außerdem wurde auch in Kontrollproben eine geringfügige Bildung von ATC und E-ATC aus TC festgestellt, die auf die vorausgegangene Aufarbeitung der Proben mit Salzsäure zurückgeführt wurde. WEIDENBERG (2002) konnte nach einer experimentellen Gelatineherstellung aus tetracyclinhaltigen Schweineknochen, die im Rahmen des Herstellungsprozesses einer Salzsäurebehandlung unterzogen wurden, Rückstände von ATC und E-ATC in dem Enderzeugnis Gelatine nachweisen.

Die Anhydrotetracycline werden als atypische Tetracycline bezeichnet, weil sie im Gegensatz zu den klassischen Tetracyclinen eine bakterizide Wirkung aufweisen: OLIVA et al. (1992) untersuchten die Wirkung von ATC und E-ATC auf *Escherichia coli* und stellten Veränderungen des elektrochemischen Gradienten in der Cytoplasmamembran der Bakterien fest, die zu einer Freisetzung des cytoplasmatischen Enzyms  $\beta$ -Galactosidase und somit zur Lyse der Zelle führten. Eine bakteriostatische Wirkung durch Inhibition der Proteinbiosynthese in Bakterien, die für die klassischen Tetracycline typisch ist, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Fähigkeit der Anhydrotetracycline, mit der Cytoplasmamembran zu interferieren, lässt sich vermutlich auf ihre Struktur zurückführen, da es sich um stark lipophile, elektroneutrale Moleküle handelt (OLIVA et al. 1992). Die atypischen Tetracycline finden keine therapeutische Anwendung, da sie in klinischen Studien schwere Nebenwirkungen hervorriefen (RO-

GALSKI 1985), die vermutlich auf ihren Wechselwirkungen auch mit eukaryontischen Zellmembranen beruhen (CHOPRA 1994).

Die Toxizität der Anhydrotetracycline wurde von KLIMOVA u. ERMOLOVA (1976) wesentlich höher eingestuft als das toxische Potential der klassischen Tetracycline: Der No-observed-effect-level (NOEL, siehe Erklärung unter 2.1.7.1) lag in verschiedenen Untersuchungen zu Embryotoxizität, Immundepression sowie Teratogenität 4,8- bis 100-fach niedriger als der von Tetracyclin.

Obwohl die Anhydrotetracycline einen anderen Wirkungsmechanismus aufweisen als die klassischen Tetracycline, funktionieren sie als stärkere Induktoren der Tetracyclin-Resistenzgenexpression in Bakterien als diese (BERTRAND et al. 1984). In Untersuchungen von DEGENKOLB et al. (1991) wird dieses Phänomen durch die 33-fach stärkere Bindung von ATC im Vergleich zu TC an den Tet-Repressor erklärt.

### **2.1.6 Resistenzmechanismus und Resistenzsituation**

Der häufige therapeutische Einsatz der Tetracycline in der Human- und Veterinärmedizin hat zur Entwicklung zahlreicher resistenter Bakterienstämme geführt, die zugleich gegen mehrere Vertreter der Tetracyclinfamilie resistent sind (Kreuzresistenz). So weisen vor allem Streptokokken, Salmonellen, *E. coli* und Pasteurellen einen hohen Prozentsatz resistenter Individuen auf (KROKER et al. 2002). Die Resistenzen werden durch die bei Bakterien und Hefen vorkommenden Plasmide vermittelt. Diese extrachromosomalen, nur wenige Gene enthaltenden doppelsträngigen DNA-Moleküle können vorhandene Resistenzinformationen durch Konjugation oder Transduktion von Bakterium zu Bakterium übertragen und sind so für das Entstehen von Kreuz- und Mehrfachresistenzen verantwortlich. In den Plasmiden enthaltene, für die Resistenz gegen Antibiotika verantwortliche Strukturgene können herausgetrennt und in andere Plasmide oder die bakterielle DNA eingebaut werden. Derartig transponierbare Gene werden daher als Transposonen (Tn) bezeichnet (GRÄFE 1992).

Den am häufigsten untersuchten und gleichzeitig effektivsten bakteriellen Resistenzmechanismus gegen Tetracycline stellt die aktive Ausschlussung der Tetracyclinmoleküle aus der Zelle dar (CHOPRA u. ROBERTS 2001). Das an die Cytoplasmamembran gebundene Transportprotein TetA (Tetracyclin-Antiporter) funktioniert als Pumpe, die Tetracyclin-Magnesium-Komplexe im Austausch gegen Protonen aus dem Cytoplasma herausbefördert.

Kodiert wird das für die Exozytose verantwortliche TetA-Protein durch das Gen *tetA*, dessen genetische Informationen im Transposon Tn10 enthalten sind (YAMAGUCHI et al. 1990). Zusätzlich wird durch Veränderungen der Porinproteine in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien sowie in der cytoplasmatischen Membran eine Reduzierung der Penetrationsgeschwindigkeit der Tetracyclinmoleküle erreicht (SCHNAPPINGER u. HILLEN 1996).

Weitere Resistenzproteine der Bakterien befinden sich im Cytoplasma; nach BURDETT (1996) gewährleisten diese nicht-kovalent mit dem Ribosom assoziierten Schutzproteine, dass sich auch in Anwesenheit von Tetracyclin die Aminoacyl-t-RNA an das Ribosom binden kann und es damit zu einer ungehinderten Fortführung der Proteinbiosynthese kommt.

Die Expression der Resistenzproteine wird über das Repressorprotein TetR kontrolliert (BECK et al. 1982), wobei das Antibiotikum selbst als Induktor für die Resistenzgenexpression fungieren kann: In der Bakterienzelle blockiert TetR in Abwesenheit von Tetracyclin durch Anlagerung an bestimmte DNA-Operatoren die Expression der membranassoziierten Resistenzgene. Entscheidend für die Aufhebung der Blockade und damit für die Resistenz des Bakteriums ist die Bindung der Tetracyclin-Magnesiumchelate an die TetR-Repressorproteine. Diese Bindung führt zu Konformationsänderungen der TetR-Proteine, die sich daraufhin von der DNA ablösen und nun die Expression der Gene für die membrangebundenen Resistenzproteine nicht mehr verhindern können (DEGENKOLB et al. 1991; HILLEN u. BERENS 1994; ROBERTS 1996; ORTH 1998).

GUINEY et al. (1984) konnten Transposonen aus Bacteroidesspezies in *E. coli* übertragen. Die Transposonen enthielten die genetischen Informationen für ein cytoplasmatisches Resistenzprotein, dessen Expression in *E. coli* die chemische Modifikation von Tetracyclinen unter Umsetzung von Sauerstoff und NADP bewirkte (SPEER et al. 1991). Diese Resistenz durch enzymatische Inaktivierung der Tetracycline wurde bisher nur in Bacteroidesspezies gefunden und seitdem in der Literatur nicht mehr beschrieben (CHOPRA u. ROBERTS 2001).

In einer 1999 vom BgVV (seit 01/2002 BVL) veröffentlichten bundesweiten Studie zur quantitativen Resistenzermittlung häufiger pathogener Bakterien wiesen 92 % der *Escherichia coli*-Stämme des Schweines eine Resistenz gegenüber Tetracyclinen auf, während beim Rind 64 % und beim Geflügel 59 % der *E. coli*-Stämme resistent waren (TROLLDENIER 1999).

Von den Pasteurellen des Rindes wurden *Past. haemolytica* und *Past. multocida* mit Resistenzanteilen von 32 % bzw. 29 % erfasst; beim Schwein wiesen 24 % der *Past. multocida*-Stämme eine Resistenz gegen Tetracycline auf.

Auch im Jahre 2001 konnten im Rahmen eines bundesweiten Resistenzmonitoring ausgewählter tierpathogener Bakterien 23,8 % der untersuchten *Past. multocida*-Stämme des Schweines als resistent eingestuft werden; der MHK (Minimale Hemmkonzentration)-Grenzwert betrug  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ . Als häufige Mastitiserreger beim Milchrind wurden auch Streptokokken untersucht, die einen Resistenzanteil von 32,5 % aufwiesen (BVL 2003).

### **2.1.7 Rückstände von Tetracyclinen in Lebensmitteln**

Nach Anwendung pharmakologisch wirksamer Substanzen beim Tier kann es in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik der Substanzen und von den individuellen Wartezeiten zwischen letzter Anwendung und Fleischgewinnung zu Rückständen in geschlachteten Tieren kommen.

In der Richtlinie 81/852/EWG wurde eine Definition für Rückstände vorgenommen: „Rückstände sind alle wirksamen Bestandteile oder deren Metabolite, die im Fleisch oder anderen Lebensmitteln enthalten sind, die von Tieren gewonnen wurden, denen das betreffende Arzneimittel verabreicht wurde.“

#### **2.1.7.1 Risikoabschätzung**

Für die Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren wird ein Arzneimittel nur zugelassen, wenn

1. für den enthaltenen Wirkstoff ein MRL-Wert (maximum residue limit) festgelegt ist (gemäß Verordnung (EWG) Nr. 2377/90) und
2. das fertige Arzneimittel zusätzlich noch nach dem Arzneimittelrecht für die Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren zugelassen wird.

MRLs sind zugelassene Höchstmengen in verschiedenen Lebensmitteln tierischer Herkunft, die getrennt nach Tierarten und Geweben in vier Anhängen der Verordnung EWG 2377/90 (Verordnung des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs) aufgelistet werden. Die Europäische Gemeinschaft definiert in dieser Verordnung Höchstmengen als eine „Höchstkonzentration von Rückständen aus der Verwendung von Tierarzneimitteln, bei der die Gemeinschaft akzeptieren kann, dass sie legal zugelassen wird oder als eine in oder auf dem Nahrungsmittel annehmbare Konzentration anerkannt wird“.

Für die Festsetzung der MRLs müssen die pharmazeutischen Unternehmen bei der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA – European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) bzw. dem Ausschuss für Tierarzneimittel (CVMP – Committee for Veterinary Medicinal Products) die Untersuchungsergebnisse aus umfangreichen Unbedenklichkeitsversuchen zu dem betreffenden Arzneimittel vorlegen.

Im Rahmen dieser Unbedenklichkeitsversuche werden nach oraler Verabreichung des Arzneimittels an Versuchstiere verschiedene toxikologische Parameter geprüft, zu denen unter anderem Toxizität, Reproduktionstoxizität, Mutagenität, Kanzerogenität und Immunotoxizität zählen. Bei Antibiotika sind außerdem Versuche zu den Auswirkungen auf die menschliche Darmflora zu prüfen (BETTE 1996).

Ermittelt wird in den toxikologischen Studien die Konzentration des Wirkstoffes, die im jeweiligen Versuch keine substanzspezifische Wirkung mehr hervorruft; diese Dosis wird als NOEL („no observed effect level“) bezeichnet. Zur Berechnung der annehmbaren Tagesdosis („acceptable daily intake (ADI)“), i.e die Rückstandsmenge, die der Verbraucher ohne erkennbares gesundheitliches Risiko ein Leben lang täglich aufnehmen könnte, wird der NOEL des empfindlichsten Versuchs bei der empfindlichsten Tierart herangezogen. Statt des NOEL wird in mikrobiologischen Studien zu nachteiligen Effekten von antimikrobiellen Substanzen auf die humane Darmflora die  $MHK_{50}$  bestimmt; die  $MHK_{50}$  ( $MHK$  = minimale Hemmkonzentration) ist die minimale Konzentration eines Arzneimittels, die das Wachstum von 50 % der Kulturen eines bestimmten Keimes hemmt (WHO 1998).

Bei der Berechnung des ADI-Wertes wird in Abhängigkeit von der Spezies, an der die Versuche durchgeführt wurden, sowie von dem toxikologischen Profil der Substanz ein Sicherheitsfaktor berücksichtigt (BETTE 1996).

Für die Festlegung der MRL-Werte für ein Arzneimittel werden von der EU definierte tägliche Verzehrsmengen für Lebensmittel unterstellt, die in dem sogenannten statistischen Warenkorb zusammengestellt sind: 300 g Muskulatur, 100 g Leber, 50 g Niere, 50 g Fett, 1,5 l Milch, 100 g Ei und 20 g Honig.

Zur Bewertung von Tetracyclin-Rückständen in Lebensmitteln liegen wissenschaftliche Berichte vor, die unter anderem von verschiedenen Kommissionen der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) und von der gemeinsamen Expertenkommission der Welternährungsorganisation (FAO) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA) erarbeitet wurden. Dabei konzentrieren sich diese Berichte auf die Tetracyclin-Derivate, die zur Anwendung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, zugelassen sind (i.e. CTC, OTC, TC und DC). Die im Jahre 1990 durch das JECFA vorgelegte Risikoabschätzung für OTC bildete die Grundlage für die ersten europaweit gültigen MRLs für Tetracycline (WHO 1990). In Studien an freiwilligen Versuchspersonen sowie Versuchshunden wurde als wesentliche Wirkung von OTC die Induktion von Resistenzen bei Enterobacteriaceae beobachtet und dabei ein NOEL von 2 mg/Person/Tag festgestellt. Aufgrund dieses Wertes wurde von der JECFA unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 10 ein ADI von 0-3 µg OTC/kg KGW empfohlen.

Eine Risikoabschätzung für TC und CTC folgte 1996 im 45. JECFA-Report; die Bewertung erfolgte auf Grundlage von Studien der antimikrobiellen Wirkung von TC und CTC auf humanpathogene Mikroorganismen sowie auf eine begrenzte Zahl von Keimen der normalen humanen Darmflora (WHO 1996). Die JECFA stufte die antimikrobielle Potenz der verschiedenen Tetracycline als vergleichbar ein und legte den 1990 bestimmten ADI-Wert für OTC als Gruppen-ADI für alle Tetracycline fest; außerdem wurde die Übernahme der MRL-Werte auch für TC und CTC empfohlen. Im gleichen Jahr wurde auch Doxycyclin hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf die humane Darmflora überprüft und ebenfalls ein ADI-Wert von 0-3 µg/kg KGW bestimmt (CVMP 1996).

In einer weiteren Studie 1999 wurden einer kontinuierlichen *E. coli*-Kultur einem ADI-Wert von 25, 250 und 2500 µg/kg KGW äquivalente Konzentrationen von TC zugesetzt. Nur die höchste Konzentration führte zur Resistenzausbildung bei den untersuchten Keimen. Aufgrund dieser Studie wurde empfohlen, den Sicherheitsfaktor von 10 für die Berechnung des ADI-Wertes für Tetracycline zu streichen und statt dessen einen Gruppen-ADI-Wert von 0-30

$\mu\text{g}/\text{kg}$  KGW festzulegen, was eine Verdopplung der aktuell geltenden MRLs bedeuten würde (WHO 1999). Eine rechtliche Umsetzung dieser Empfehlung ist noch nicht erfolgt.

### 2.1.7.2 Rechtliche Normen

In Deutschland bilden das Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) sowie das Arzneimittelrecht die Grundlage der amtlichen Untersuchungen auf Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln. Die geltenden MRLs für Tetracycline, die in Anhang 1 der Verordnung EWG 2377/90 aufgelistet sind und auf dem aktuellen ADI-Wert von 0-3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KGW basieren, sind in Tabelle 2 aufgeführt:

**Tab. 2: MRL-Werte für Tetracycline in Lebensmitteln nach VO (EWG) 2377/90**

<b>Pharmakologisch wirksamer Stoff</b>	<b>Marker-Rückstand</b>	<b>Tierart</b>	<b>MRL in <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	<b>Zielgewebe</b>
Chlortetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	100	Muskel
Oxytetracyclin			300	Leber
Tetracyclin			600	Nieren
			100	Milch
			200	Eier
Doxycyclin	Doxycyclin	Rinder: Nicht anwenden bei Tieren, von denen Milch für den menschlichen Verzehr gewonnen wird	100	Muskel
			300	Leber
			600	Nieren
		Schweine	100	Muskel
		Geflügel: Nicht anwenden bei Tieren, von denen Eier für den menschlichen Verzehr gewonnen werden	300	Haut + Fett
			300	Leber
			600	Nieren



Die Überwachung von Lebensmitteln tierischer Herkunft auf Rückstände von gesundheitlich unerwünschten Stoffen erfolgt unter Berücksichtigung des Nationalen Rückstandskontrollplanes, dessen Programm in der gesamten EU nach einheitlich festgelegten Maßstäben durchgeführt wird. Der Nationale Rückstandskontrollplan wird vom BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) und den Behörden der Bundesländer jährlich neu erstellt und enthält für jedes Bundesland konkrete Vorgaben über die Anzahl der zu untersuchenden Tiere und tierischen Erzeugnisse, die zu untersuchenden Stoffe, die anzuwendende Methodik sowie die Probenahme. Während jährlich ein bestimmtes Spektrum an Stoffen vorgegeben wird, auf das die entnommenen Proben mindestens zu untersuchen sind (Pflichtstoffe), können die Bundesländer darüber hinaus bei einer definierten Anzahl von Tieren und Erzeugnissen die Stoffe nach aktuellen Erfordernissen und speziellen Gegebenheiten frei auswählen.

Zusätzliche Rückstandsuntersuchungen werden im Rahmen von betrieblichen Eigenkontrollen und Qualitätssicherungssystemen durchgeführt, die teilweise auch rechtlich vorgeschrieben sind.

### **2.1.7.3 Einlagerung in Knochen**

Eine Sonderrolle bei der Rückstandsanalytik nehmen die sogenannten gebundenen Rückstände ein, die von SMIT, HAAGSMA und RUITER (1999) als Verbindungen, die kovalent an Makromoleküle gebunden sind und nicht durch wässrige oder organische Lösungsmittel extrahiert werden können, definiert werden.

Erste Hinweise auf das Phänomen der Einlagerung von Tetracyclinen in Knochengewebe wurden bereits 1957 von MILCH et al. veröffentlicht. BUYSKE et al. (1960) beschrieben gebundene Rückstände von TC und CTC in Knochen von Tieren, die mit Tetracyclinen behandelt wurden. Die Tetracycline, die aufgrund ihrer Struktur eine hohe Affinität zu metallischen Kationen aufweisen, bilden mit Calcium stabile Chelatkomplexe aus und werden auf diese Weise bevorzugt in die Mineralisierungszonen von knochenbildenden Geweben eingelagert. Die Einlagerung erfolgt in Form von Tetracyclin-Calcium-Orthophosphat-Chelaten (BUYSKE et al. 1960; STAHLMANN u. LODE 2001), wobei die Affinität der Chelatbindung in der Reihenfolge OTC<TC<CTC zunimmt (OTTEN et al. 1975).

Die Menge der eingelagerten Chelate hängt nicht nur von der verabreichten Tetracyclindosis ab, sondern auch vom Zeitpunkt der Applikation im Hinblick auf das Knochenwachstum. Bei oraler Applikation einer identischen Dosis von Tetracyclinen erfolgt bei juvenilen Tieren, die sich im Stadium der intensiven Knochenmineralisierung befinden, die Einlagerung einer größeren Menge des Antibiotikums in die Knochen als bei adulten Tieren (BRÜGGEMANN et al. 1966). Wird die Applikation von Tetracyclinen beendet, sinkt der Gehalt der gebundenen Rückstände im Knochen zunächst deutlich, um dann über Wochen und Monate in noch nachweisbaren Konzentrationen relativ konstant zu bleiben (BUYSKE et al. 1967).

Knochen, die gebundene Tetracyclin-Rückstände enthalten, zeigen eine Fluoreszenz unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm (BLOMQUIST u. HANNGREN 1966), wobei diese Fluoreszenz durch das Naphtacen-Gerüst der Tetracycline verursacht wird (DÄMMRICH 1969). GEMMER et al. untersuchten 1973 mittels UV-Licht Knochen von geschlachteten Schweinen, Kälbern und Rindern auf Rückstände von Tetracyclinen und erhielten häufig positive Befunde. KÜHNE und EBRECHT kombinierten 1993 erstmals die rein qualitative Untersuchung mittels Fluoreszenz-Nachweis unter UV-Licht mit der sowohl qualitativ als auch quantitativ aussagekräftigen Untersuchungsmethode der HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Sie stellten bei ihren Untersuchungen an Knochen von Schlachttieren fest, dass in den meisten Fällen einer positiven Knochenfluoreszenz gleichzeitig Tetracyclinrückstände in den dazugehörigen essbaren Geweben nachgewiesen werden konnten. Damit wurde gezeigt, dass die Untersuchung der Knochen von geschlachteten Tieren mittels UV-Licht als ein schnelles und problemloses Screeningverfahren im Rahmen der Rückstandskontrolle angesehen werden kann (KÜHNE u. EBRECHT 1993).

Die hohe Prävalenz von Tetracyclin-Rückständen in den Knochen tauglich beurteilter, geschlachteter Schweine wurde durch die Untersuchungen von KÜHNE et al. (2000) belegt: In norddeutschen Schlachthöfen wurden insgesamt 17.150 tauglich beurteilte Schlachtkörper von Mastschweinen auf Fluoreszenz der Knochen untersucht. Nur 30 % der Mastschweine konnten als negativ beurteilt werden.

### **2.1.7.3 Risikoabschätzung gebundener Tetracyclin-Rückstände**

Eine Möglichkeit des Eintrags von tetracyclinhaltigen Knochenpartikeln in die menschliche Nahrungskette ist z. B. der Verzehr von maschinell entbeintem Fleisch, in dem sich je nach

Herstellungsverfahren bis zu 5 % Knochenpartikel befinden können (VARNAM u. SUTHERLAND 1995). Seit der ersten, im Jahr 1969 veröffentlichten Risikoabschätzung für Tetracyclin-Rückstände in Knochen geschlachteter Tiere wurde im wissenschaftlichen Schrifttum angenommen, dass gebundene Tetracycline antimikrobiell inaktiv sind und somit kein potentiell Risiko für den Verbraucher darstellen (WHO 1969; STAHLMANN u. LODE 2001). In einem in vitro-Verdauungsversuch untersuchten KÜHNE und KÖRNER (2001b) die Bioverfügbarkeit von gebundenen Chlortetracyclin-Rückständen in Knochensplitttern, indem sie ein mit den Knochensplitttern kontaminiertes Modellbrät mit 0,3 mol/l HCl und Pepsin bei 40 °C unter Rühren für 30 min inkubierten. Durch diese Simulation physiologischer Verdauungsvorgänge ließen sich die gebundenen Rückstände von CTC im Mittel zu 35,3 % in die lösliche Form überführen; von dieser Konzentration waren 51,6 % antimikrobiell aktiv. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass oral aufgenommene, gebundene Tetracyclin-Rückstände durch Verdauungsvorgänge zumindest teilweise ihre antimikrobielle Aktivität wiedererlangen könnten.

Im Rahmen einer experimentellen Gelatineherstellung aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln konnte WEIDENBERG (2002) sowohl in Gelatine, die unter sauren Aufschlussbedingungen hergestellt worden war, als auch in handwerklich hergestellter Gelatine Rückstände von Tetracyclinen nachweisen.

#### **2.1.7.4 Hitzestabilität gebundener Tetracyclin-Rückstände in Knochen**

Die Auswirkungen von Hitze auf gebundene Tetracyclin-Rückstände wurden von KÖRNER (2000) anhand von Handelsproben CTC- und TC-haltiger Fleischknochenmehle, die auf 100 °C und 133 °C erhitzt wurden, untersucht. Die Hoherhitzung auf 133 °C über einen Zeitraum von 45 min führte im Mittel zu einer Reduktion der in den Fleischknochenmehlen nachgewiesenen CTC-Konzentration auf 11 % des Ursprungsgehaltes, während TC um ca. 50 % reduziert wurde. Im Vergleich dazu hatte die Hitzeeinwirkung von 100 °C keine Abnahme der nachweisbaren Konzentrationen von CTC und TC zur Folge.

In späteren Untersuchungen von KÜHNE et al. (2001a) an tetracyclinhaltigen Fleischknochenmehlen, die auf 133 °C hoherhitzt wurden, konnten ATC und sein Epimer als Dehydrationsprodukte von TC nachgewiesen werden. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass

eine Hoherhitzung auf 133 °C nicht allein zu einer Reduktion von TC führt, sondern vielmehr zu einem quantitativen Umbau zu ATC.

Im Vergleich zu gebundenen Tetracyclin-Rückständen sind Rückstände von Tetracyclinen z.B. in Fleischerzeugnissen weitaus empfindlicher gegenüber Hitzebehandlungen: In HPLC-Studien an Brühwürsten aus mit OTC und CTC dotiertem Fleisch beobachtete KLEBINGER (1992) im Temperaturbereich von 68 °C - 72 °C einen OTC- und CTC-Abbau von 20 % innerhalb von 50 min. Eine stärkere Abnahme der Wirkstoffkonzentration durch den Brühprozess zeigte sich bei Temperaturen von über 75 °C nach 30 min; hier trat bei OTC ein Wirkstoffverlust von 40 % ein, während die Konzentration von CTC um 60 % reduziert wurde. ROSE et al. (1996) untersuchten mit der HPLC-Methode die Stabilität von OTC in Wasser und in Pflanzenöl und stellten in Wasser bei 100 °C, 80 °C und 62 °C Halbwertszeiten von 2, 15 und 120 min fest. In Öl wurde die OTC-Konzentration bei 110 °C nach 150 min um 25 % verringert; bei 180°C betrug die Halbwertszeit 8 min.

Unter Verwendung von mikrobiologischen Methoden untersuchten EGMOND et al. (2000) das Hitzeresistenzverhalten von OTC, indem sie ein Homogenisat aus Schweinefleisch, -niere und -leber mit OTC dotierten und verschiedenen Hitzebehandlungen unterzogen: Nach einer Erhitzung im Wasserbad bei 80 °C für 15 min wurde ein Aktivitätsverlust von 20 % festgestellt, und die anschließende Hoherhitzung auf 134 °C bei 3 bar über den Zeitraum von 20 min führte zu dem vollständigen Aktivitätsverlust von OTC.

### 2.1.8 Nachweisverfahren für Tetracycline

Für den Nachweis von Tetracyclin-Rückständen in biologischen Materialien können sowohl mikrobiologische als auch enzymimmunologische Methoden angewendet werden, die jedoch keine qualitative und quantitative Aussage erlauben. Die etablierten mikrobiologischen Verfahren, die innerhalb der EU die Grundlage der Rückstandsüberwachung darstellen (HEITZMAN 1994), sind für den Nachweis von Tetracyclinen nur bedingt geeignet, da auch rechtlich zugelassene Konzentrationen dieser Antibiotika in Lebensmitteln deutlich positive Hemmstofftest-Ergebnisse bewirken können (KÜHNE u. EBRECHT 1993).

Als Screeningmethode für die Untersuchung von Knochen ist der fluoreszenzoptische Nachweis von Tetracyclinen unter UV-Licht geeignet (KÜHNE u. EBRECHT 1993, KÜHNE et al. 2000). Die amtliche oder betriebliche Kontrolle der Einhaltung von MRLs setzt jedoch die Verwendung von validierten Methoden voraus.

Der sowohl qualitative als auch quantitative Nachweis von Tetracyclinen wird durch die Anwendung von chemisch-physikalischen Methoden erreicht. Hierzu zählen die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Absorptions-, UV-Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektion (OKA et al. 2000). Die Eigenschaft der Tetracycline, mit Kationen stabile Chelatkomplexe einzugehen, stellt das Hauptproblem bei der Extraktion, Aufarbeitung und HPLC-Elution dar (KAUFMANN et al. 1999, OKA et al. 2000). Die vorläufige amtliche Methode zum Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln sieht die Extraktion mit Succinatpuffer vor; für die Aufreinigung wird der Einsatz von Chelating-Sepharose-Säulen, die mit Kupfer beladen werden, in Kombination mit einer C-18-Festphasenextraktion vorgeschrieben (ANON. 2000).

Für den Nachweis von Tetracyclinen in Knochen ist eine Extraktion mit einer starken Säure erforderlich. KÜHNE et al. (2000) führten hierzu eine zehnstündige Extraktion mit 1 M HCl durch.

## **2.2 Gelatine**

### **2.2.1 Begriffsbestimmung**

Gelatine ist ein hochmolekulares Peptidgemisch (Molekülmasse zwischen ca. 15.000 und 250.000 g/mol), das durch thermischen und chemischen Abbau aus dem faserartig aufgebauten Protein Kollagen gewonnen wird. Die Kollagene gehören zur Familie der Skleroproteine (Gerüsteiweißstoffe) und stellen mit einem Anteil von ca. 30 % am Gesamtprotein die im tierischen und menschlichen Organismus am häufigsten vorkommende Proteinklasse dar. Die Kollagenfasern bestehen aus Fibrillen, deren monomere Bausteine die eigentlichen Kollagenmoleküle sind. Charakteristisch für den Aufbau eines Kollagenmoleküls ist die als Tropokollagen bezeichnete Tripelhelixstruktur, die aus drei gewundenen Polypeptidketten besteht. Jede dieser Polypeptidketten enthält ca. 1000 Aminosäuren. Durch eine gestaffelte Anordnung der Tripelhelices entsteht schließlich die Fibrille (BABEL 1996; FALBE und REGITZ 1999).

Quervernetzungen, die sich innerhalb der Tripelhelix zwischen den einzelnen Peptidketten ausbilden, werden als intramolekular bezeichnet. Unter intermolekularen Verbindungen werden dagegen die kovalenten Bindungen zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen in den Fibrillen verstanden.

In der Aminosäurezusammensetzung entspricht Gelatine weitgehend der des Kollagens. Sie besteht zu einem Drittel aus Glycin und zu weiteren 22 % aus den Iminoverbindungen Prolin und Hydroxyprolin; die restlichen 45 % entfallen auf 17 weitere Aminosäuren wie z.B. Alanin, Arginin, Glutaminsäure und Serin (ROSE 1987).

### **2.2.2 Rohstoffe**

Für die industrielle Herstellung von Gelatine werden als Ausgangsmaterialien die Häute und Knochen von geschlachteten und tauglich beurteilten Rindern, Kälbern und Schweinen verwendet (siehe Abbildung 4).

Schweineschwarten werden in den Zerlegebetrieben oder Fleischwarenfabriken von der anhaftenden Fettschicht befreit und in gekühltem oder gefrorenem Zustand zum Gelatine-Hersteller befördert.

Rinder- oder Kalbshäute werden in Gerbereien maschinell von dem fetthaltigen Unterhautbindegewebe befreit, und die Rohhäute werden horizontal gespalten. Die dabei anfallende Mittelschicht, der sogenannte „Spalt“, besteht weitgehend aus Kollagen und eignet sich deshalb für die Gelatineherstellung. Der Spalt, der je nach Alter der Tiere bis zu 2 m<sup>2</sup> groß sein kann, wird in Schneidanlagen in handflächengroße Stücke zerkleinert und anschließend dem Gelatineaufschluss zugeführt.

Die in Schlachthöfen oder in Zerlegebetrieben anfallenden Frischknochen von Rindern, Kälbern und Schweinen werden direkt zu den Knochenverarbeitungsbetrieben der Gelatinehersteller transportiert und unverzüglich weiterverarbeitet (SCHRIEBER 1988; GELITA 2001).

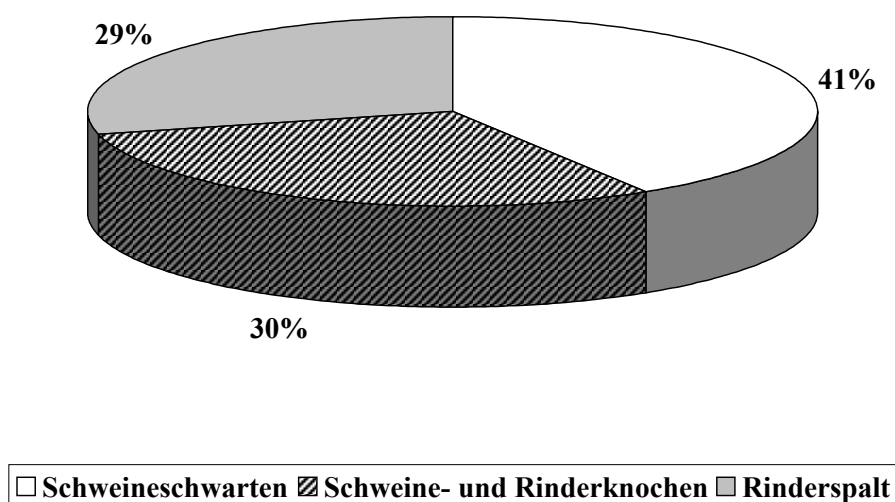


Abb. 4: Weltweite prozentuale Anteile der Rohstoffe in der Gelatineherstellung (nach HEESCHEN 2002)

### 2.2.3 Herstellung

Ziel der Gelatineherstellung ist die schonende und quantitative Umwandlung von hoch quervernetztem, wasserunlöslichem und kollagenreichem Rohmaterial in wasserlösliche Gelatine. Im einzelnen bedingen die verschiedenen Rohstoffe durch ihren Aufbau und den Gehalt an Begleitsubstanzen wie Mineralstoffen, Fett und nichtkollagenen Proteinen die spezifischen Prozessschritte bei der großtechnischen Gelatineherstellung. In der Industrie werden zwei unterschiedliche Prozesse zur Gelatineproduktion eingesetzt, das saure und das alkalische Aufschlussverfahren. Der saure Aufschluss liefert Gelatine vom Typ A (acid processed); diese Gelatine wird hauptsächlich aus Schweineschwarten und –knochen gewonnen. Gelatine vom Typ B (basic processed) wird aus alkalisch aufgeschlossener Rinderhaut (Spalt) sowie aus Knochen von Rind und Schwein hergestellt (OCKERMAN u. HANSEN 1988; SCHRIEBER 1988).

Einen Überblick über die Prozessabläufe liefert Abbildung 5 (nach SCHRIEBER 1988):



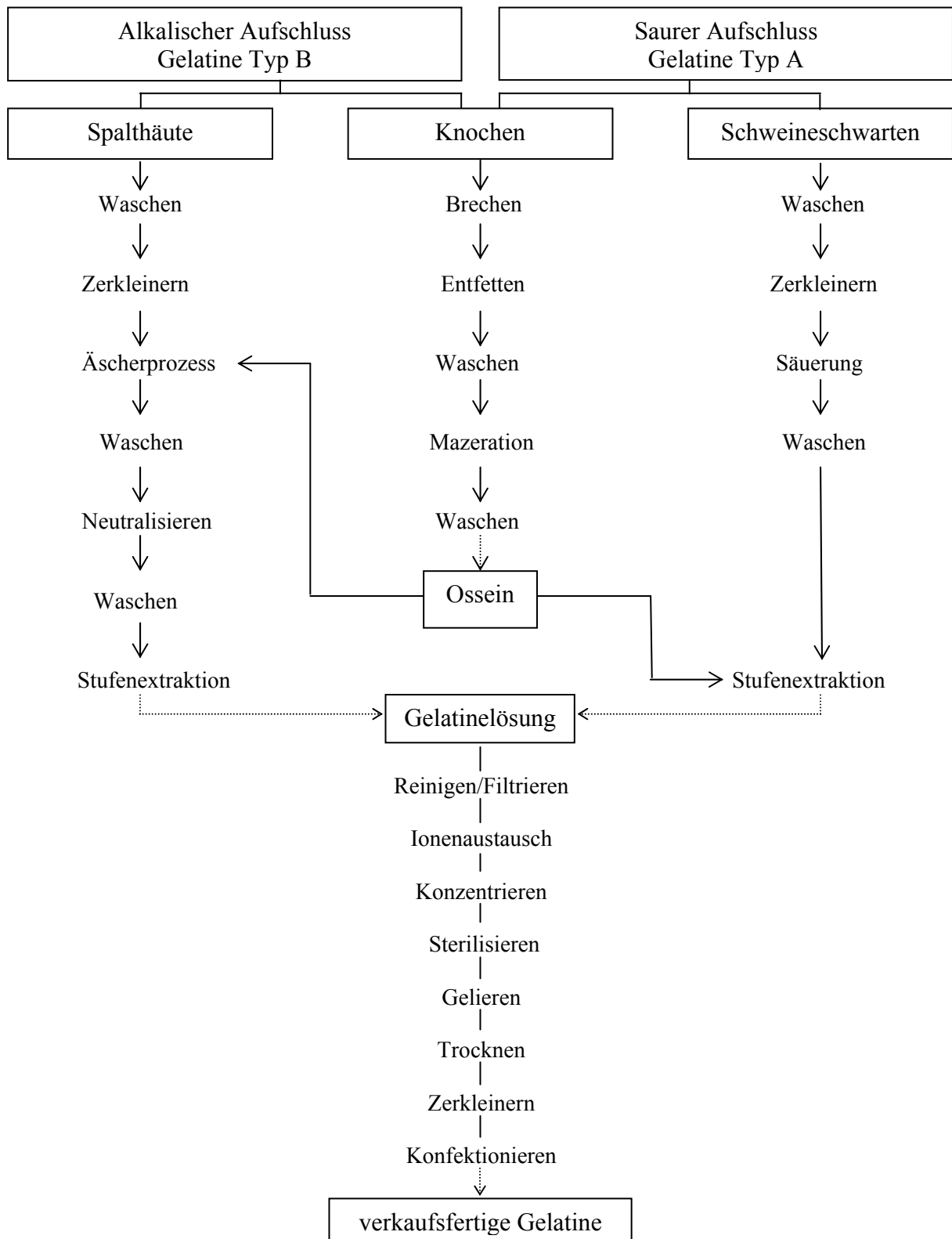


Abb. 5: Fließschema zur Herstellung von Gelatine (nach SCHRIEBER 1988)

### 2.2.3.1 Saures Aufschlussverfahren für den Rohstoff Knochen

#### Vorbereitung des Rohmaterials

Die Frischknochen werden stufenweise in nacheinander geschalteten Zweiwellenbrechern zerkleinert, bis das Knochenschrot eine Korngröße von 3 – 20 mm aufweist. Das Knochenschrot wird vorgewaschen und mit 85 °C heißem Wasser unter starker mechanischer Verwirbelung entfettet. Als Nebenprodukte fallen bei diesem Verfahrensschritt Knochenfett und Fleischknochenmehl an. Das entfettete Knochenschrot wird anschließend enzymatisch vom Periost und noch anhaftender Skelettmuskulatur sowie Bindegewebe befreit. Die Gelatineindustrie verwendet für diesen Prozess eine Enzymlösung mit einer geeigneten Protease, z.B. Alkalase.

Das so vorbehandelte und nochmals gewaschene Knochenschrot wird in einem Heißluftstrom auf 5 – 10 % Restfeuchte getrocknet, mittels Sieben in verschiedene Körnungen klassiert und bis zur weiteren Verarbeitung in Silos zwischengelagert (GELITA 2001).

#### Demineralisierung (Mazeration)

Das getrocknete Knochenschrot wird über einen Zeitraum von 6 Tagen im Gegenstromverfahren mit verdünnter Salzsäure (6 %) entmineralisiert. Das Gegenstromverfahren wird aus ökonomischen Gründen durchgeführt; so werden die Knochen zu Beginn der Demineralisierung mit bereits mineralisch angereicherter Säurelösung behandelt, während erst in der letzten Stufe des Prozesses eine frisch hergestellte Säurelösung auf die weitgehend entmineralisierten Knochen einwirkt.

Bei diesem Schritt, der auch als Mazeration bezeichnet wird, gehen die mineralischen Komponenten des Knochens, die ihm die mechanische Festigkeit verleihen, wie Hydroxyapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  und Calciumcarbonat, in Lösung oder werden zersetzt. Zurück bleibt das kollagene, schwammartige Grundgerüst des Knochens, das sogenannte Ossein. Das Ossein ist der eigentliche Rohstoff für die Gelatineherstellung aus Knochen.

Nach Entfernung der Salzsäurelösung vom 6. Tag wird das Ossein für ca. 7 h mit verdünnter Schwefelsäurelösung (0,18 N) behandelt (OSTERMAIER 2001).

Aus der verbrauchten, stark mineralisch angereicherten Salzsäurelösung wird durch Zugabe einer Calciumhydroxid-Suspension (Kalkmilch) der pH-Wert der Lösung auf ca. pH 4,0 er-

höht und Calciumhydrogenphosphat als Dihydrat ausgefällt. Das nach anschließender Trocknung vorliegende Dicalciumphosphat wird als Düngemittel eingesetzt (SCHRIEBER 1988).

### Waschen

An die letzte Säurebehandlung schließt sich ein intensiver, mehrstündiger Waschprozess an. Unter mechanischer Durchwirbelung und mit mehrmaligem Wasserwechsel wird das Ossein säurefrei gewaschen, so dass der pH-Wert am Ende des Waschprozesses 2,9 +/- 0,3 beträgt (OSTERMAIER 2001).

### Extraktion

Das Ausschmelzen der Gelatine (Extraktion) aus dem Ossein geschieht mit heißem Wasser unter stufenweiser Temperaturerhöhung in geschlossenen Edelstahlbehältern. Es werden insgesamt drei bis fünf Extrakte im Temperaturbereich von 55 – 90 °C gewonnen, wobei die Gelatine aus den ersten, niedrig temperierten Extraktionsstufen die höchste Gelierkraft aufweist. Die Extraktionszeit beträgt jeweils ca. 5 h; nach jeder Extraktion wird das verbliebene Ossein erneut mit heißem Wasser versetzt und die Gelatine unter entsprechender Temperaturkontrolle ausgeschmolzen.

### Reinigung und Filtration

Die bei der Extraktion gewonnene Gelatinelösung wird in Hochleistungsseparatoren von Fettspuren und Kollagenfasern aus dem Rohmaterial befreit. Nach der Zentrifugation erfolgt eine weitere Reinigung durch Zentrifugal-Anschwemmfilter, in denen durch Kieselgur (Diatomeenerde) feine Trübstoffe zurückgehalten werden. Anschließend wird die Gelatinelösung durch Zellulose-Plattenfilter, wie sie auch in der Getränkeindustrie verwendet werden, filtriert (SCHRIEBER 1988).

### Ionenaustausch

Durch den Rohstoffaufschluss und die Extraktion ist die Gelatinelösung stark mit Mineralsalzen (z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) angereichert, die je nach Anwendungszweck und Kundenanforderung entfernt werden müssen. Für die Entsalzung werden Kunstharzionenaustauscher eingesetzt, vorwiegend durch ein nacheinander geschaltetes Kationen- und Anionenaustauschverfahren (BABEL 1996).

### Konzentration

Die zu diesem Zeitpunkt vorliegende Gelatinelösung besteht noch zu ca. 95 % aus Wasser, welches zur Konzentration der Lösung reduziert werden muss. Dazu dient das Verfahren der Vakuumeindampfung, bei dem die Gelatinelösung in mehrstufigen Vakuumverdampfern eingedickt wird. Bei bis zu 80 °C und einem Vakuum von bis zu – 0,9 bar verdampfen große Mengen Wasser. Im Einsatz sind Plattenverdampfer, Umlaufverdampfer und Dünnschichtverdampfer. Je nach Gelatinetyp werden in diesem Verfahrensschritt Konzentrationen von ca. 35 % TS erreicht.

### Sterilisation

Die Sterilisation erfolgt in einer Kurzzeit-Hochoverhitzungsanlage. Die Gelatinelösung wird dort für mindestens 5 sec auf 140 °C erhitzt. Eingesetzt werden sowohl Plattenwärmeaustauscher als auch das Verfahren der Direktampfinjektion.

### Gelierung und Trocknung

Im Anschluss an die Sterilisation wird die konzentrierte Gelatinelösung an einer Kühltrommel, einem Endloskühlband oder durch Extrusion geliert. Die erstarrte Gelatine wird durch Lochscheiben gepresst; das hierbei entstehende nudelförmige Gel wird in Bandtrocknern mit filtrierter, erwärmter und entkeimter Luft getrocknet. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt hierbei ist die Diffusion des Wassers aus tieferen Gelschichten an die Oberfläche, wo es verdampfen kann. Wird die Trocknung zu schnell durchgeführt, so kommt es zu einer Verhornung der Geloberfläche, die die weitere Trocknung und die spätere Auflösung beim Anwender stark behindert. Um diesen Effekt zu vermeiden, wird die Temperatur der Trock-

nungsluft nur ganz allmählich angehoben, und zwar von ca. 30 - 35 °C in der Anfangsphase auf max. 50 – 60 °C. Die Endfeuchte der Gelatine beträgt 9 - 13%.

Nach der Trocknung wird die Gelatine gebrochen, grob gemahlen und in Chargen von 1 – 2 t zwischengelagert. Nach Abschluss der physikalischen, chemischen und bakteriologischen Untersuchungen der Produktionschargen (siehe 2.2.7) folgt die Freigabe zur weiteren Verwendung.

### Standardisierung

Um die Gelatine der späteren spezifischen Anwendung voll anzupassen und den Anforderungen der einzelnen Abnehmer individuell zu genügen, ist eine Standardisierung notwendig. Dies erfolgt durch das Mahlen zu Pulvergelatine und durch Vermischen der einzelnen Produktionschargen nach Maßgabe der physikalischen, chemischen und bakteriologischen Analysendaten. Durch diese Maßnahme werden Mischungen mit konstanter Beschaffenheit bis zu einer Größenordnung von 100 to hergestellt (SCHRIEBER 1988; GELITA 2001).

## **2.2.3.2 Alkalisches Aufschlussverfahren für den Rohstoff Knochen**

### Vorbereitung des Rohmaterials und Mazeration

Die Knochen, die für das alkalische Aufschlussverfahren vorgesehen sind, unterliegen der gleichen Vorbehandlung wie unter 2.2.3.1 beschrieben. Die Mazeration wird ebenfalls wie unter 2.2.3.1 für das saure Aufschlussverfahren beschrieben durchgeführt mit der Abweichung, dass die Behandlung mit Schwefelsäurelösung unterbleibt. Der sich an die Mazeration anschließende Waschprozess erfolgt wie unter 2.2.3.1 beschrieben.

### Äscherung

Als Äscherung bezeichnet man die weitere chemische Behandlung des Osseins mit einer Calciumhydroxid-Suspension (Kalkmilch) verschiedener Konzentrationsstufen. Während dieser ca. 9 Wochen andauernden Behandlung wird die Kalkmilch mehrfach erneuert, und durch schonende mechanische Bewegung wird eine gleichmäßige Verteilung des Osseins gewährleistet. Die Äscherung bewirkt u.a. die Extraktion von alkalilöslichen, nichtkollagenen Protei-

nen aus dem Ossein sowie die weitere Hydrolyse von kovalenten Quervernetzungen des Kollagens (BABEL 1996).

#### Neutralisation

Nach Abschluss der Äscherung wird das Ossein mit Wasser alkalifrei gewaschen. Um den pH-Wert für die nachfolgende Extraktion einzustellen, wird das Ossein für mehrere Stunden mit einer verdünnten Phosphorsäurelösung behandelt. Anschließend wird die Säure in einem intensiven Waschprozess aus dem Ossein entfernt, so dass der pH-Wert des Ossein schließlich  $\text{pH } 6,9 \pm 0,3$  beträgt (OSTERMAIER 2001).

Die Extraktion der Gelatine sowie die nachfolgenden Verfahren der Herstellung erfolgen wie für das saure Aufschlussverfahren unter 2.2.3.1 beschrieben.

#### **2.2.3.3 Sonderformen der Gelatine**

Neben der typischen granulierten Gelatine für die industrielle Weiterverarbeitung werden weitere Sonderformen in den Handel gebracht (GELITA 2001):

#### Blattgelatine

Pulvergelatine genau eingestellter Qualität wird unter Vakuum blasenfrei aufgelöst, nochmals erhitzt und auf einer Kühltrommel zu einem breiten Geleefilm ausgegossen. Die in Streifen geschnittene Geleefolie wird auf einem Netz zu endlosen Blattstreifen getrocknet, die am Ende dieses Vorganges auf die jeweils benötigte Länge geschnitten werden.

#### Instantgelatine

Diese Gelatine, die kaltwasserlöslich ist, gewinnt man durch die Anwendung von Sprühtrocknungs- oder Walzentrocknungsverfahren, mit deren Hilfe Gelatinelösungen mit oder ohne Zusätzen getrocknet werden. Dadurch entstehen feine Partikel mit amorpher Struktur, da die Gelierungsphase während der Trocknung übersprungen wird.

### Gelatine-Hydrolysat

Hydrolysate werden überwiegend so gewonnen, dass man normale Gelatine mittels Enzymen in ihrer Molekülgröße stark reduziert. Nach erneuter Erhitzung, die auch die Enzyme zerstört, werden die konzentrierten Lösungen sprühgetrocknet, und es entstehen frei fließende Pulver, die kaltwasserlöslich sind und keine Gelierkraft mehr besitzen.

### **2.2.4 Eigenschaften**

Im Verlauf der Gelatineherstellung wird die Tripelhelix des Kollagens durch chemisch – thermische Hydrolyse gebrochen. Dies führt zu den veränderten physikalischen Eigenschaften von Gelatine im Vergleich zum Kollagen.

Die technologisch wichtigste Eigenschaft von Gelatine ist ihre Fähigkeit zu thermoreversiblen Sol/Gel-Umwandlungen. Wenn eine warme, wässrige Gelatinelösung mit einem Gelatinegehalt von mehr als 0,5 % auf 35 – 40 °C abgekühlt wird, nimmt zuerst die Viskosität der Lösung drastisch zu; danach bildet sich beim weiteren Abkühlen ein Gel. Als Maßstab für die Gelierkraft (synonym auch Gallertfestigkeit) gilt der sogenannte Bloomwert. Ermittelt wird der Bloomwert mit einem speziellen Messgerät, dem Bloomgelometer, das die Oberflächenverformung eines Gelatinegels unter definierten Bedingungen misst. Die zur Oberflächenverformung aufzuwendende Kraft wird als Bloomwert oder einfach nur als Bloom bezeichnet (EISENBRAND u. SCHREIER 1995; SCHOTT 1996).

Die Viskosität von Gelatinelösungen wird von der Gelatinequalität und –konzentration, der Temperatur und dem pH-Wert beeinflusst; sie nimmt mit zunehmender Konzentration und abnehmender Temperatur zu.

Das Herstellverfahren einer Gelatine legt ihren isoelektrischen Punkt (IEP) fest. Bei sauer aufgeschlossener Gelatine liegt der IEP bei einem pH zwischen 6,5 und 9,0, während alkalisch aufgeschlossene Gelatine einen IEP zwischen 4,8 und 5,0 aufweist. Für den Einsatz von Gelatine ist das Wissen um den IEP von Bedeutung, weil eine Übereinstimmung von IEP der Gelatine und pH-Wert des Gelatineproduktes zu Trübungen und Verlusten an Gelfestigkeit führen kann (JOHNSTON-BANKS 1990).

Die Umwandlungstemperatur für die thermoreversible Sol/Gel-Umwandlung wird als Erstarrungs- bzw. Schmelzpunkt bezeichnet. Im Handel befindliche Gelatinen schmelzen, je

nach Gelatinequalität und –konzentration, zwischen 25 und 35 °C. Die entsprechenden Erstarungspunkte liegen 2 – 5 °C tiefer (BABEL 1996).

Gelatine weist außerdem oberflächenaktive Eigenschaften auf und nimmt an der Bildung von Luft/Wasser- und Öl/Wasser-Grenzflächen teil. Dabei wird die Entstehung und Stabilisierung von Schäumen und Emulsionen unterstützt. Außerdem ist Gelatine ein sehr wirksames Schutzkolloid, das Kristall- und Teilchenaggregation verhindert und damit heterogene Suspensionen stabilisiert.

Gelatine ist geruchlos und praktisch farblos, außerdem besitzt sie einen nur sehr geringen Eigengeschmack, der in allen Anwendungsbereichen durch die Geschmackskomponenten und Aromen der mitverarbeiteten Produkte überdeckt wird (SCHRIEBER 1988; FALBE und REGITZ 1990).

### **2.2.5 Verwendungsmöglichkeiten**

Die vielfältigen Eigenschaften der Gelatine, die jährlich weltweit in einer Gesamtmenge von ca. 260.000 to (davon in Europa ca. 115.000 to) produziert wird, erklären ihren umfangreichen Einsatz im Bereich der Lebensmittel-, Pharma- und Fotoindustrie (vgl. Abbildung 6).

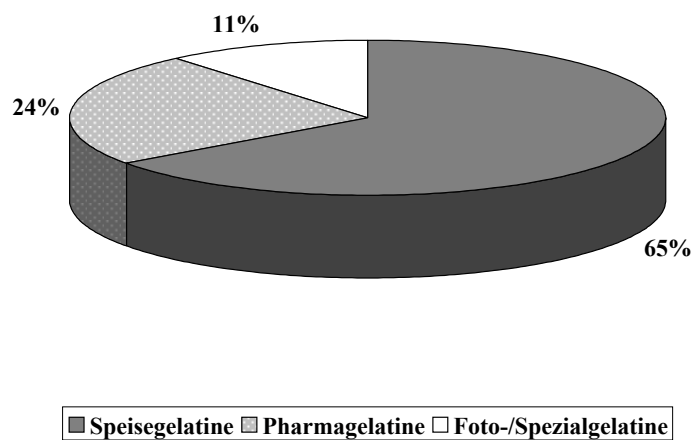
Als Speisegelatine wird sie zur Verbesserung von Aussehen und Konsistenz in Fleischwaren (z.B. Sülzen und andere Aspikwaren) ebenso eingesetzt wie in Süßwaren (Gummibonbons, Götterspeise, Kaubonbons, Schaumzuckerwaren). Während Gelatine in Joghurt zur Verhinderung von Molkeabsonderungen an der Oberfläche (Synärese) verwendet wird, wirkt sie in Speiseeis hemmend auf das Kristallwachstum von Eis und Zucker und verleiht dadurch dem Produkt die gewünschte cremige Textur und Langzeitstabilität (HUDSON 1993). Auch in Backwaren und Brotaufstrichen wirkt Gelatine als Stabilisator, Emulgator sowie als Aufschlagmittel. Als leicht verdaulicher, zusätzlicher Proteinträger ist Gelatine weiterhin ein wertvoller Bestandteil in Diät- und Aufbaukost. In der Getränkeindustrie wird Gelatine als positiv geladenes Kolloid zur Klärung von Wein und Fruchtsäften verwendet; das Prinzip beruht auf der Ausfällung negativ geladener Trübeilchen und Gerbstoffe, die anschließend abfiltriert werden können (SCHOTT 1996).

In der Pharmaindustrie stellt Gelatine das Basismaterial für die Herstellung von Hart- und Weichkapseln dar und dient als Binde- und Presshilfsmittel bei der Produktion von Tabletten



und Dragees. Gelatineschwämme werden in der Wundversorgung zur Blutstillung eingesetzt, und auch in Blutersatzmitteln ist Gelatine ein wichtiger Bestandteil (HEESCHEN 2002).

Der dritte große Anwendungsbereich für Gelatine ist die Fotoindustrie. Da Gelatine klare und hinreichend flexible Schichten bildet, die gut Wasser absorbieren und quellen, ist sie ideal geeignet für die Beschichtung fotografischer Trägermaterialien wie Filme und Fotopapier. Außerdem übt Gelatine während der Herstellung fotografischer Schichten eine Schutzkolloidwirkung bei der Fällung der Silberhalogenide aus (BABEL 1996).



**Abb. 6: Anwendungsbereiche der Gelatine weltweit (nach HEESCHEN 2002)**

### **2.2.6 Lebensmittelrechtliche Anforderungen**

Seit Dezember 2002 bestimmt in Deutschland die Speisegelatine-Verordnung (Verordnung zur Festlegung lebensmittelhygienerechtlicher Anforderungen an die Herstellung, Behandlung und das Inverkehrbringen von Speisegelatine und an deren Ausgangserzeugnisse) die Anforderungen an Gelatine, die für den menschlichen Verzehr bestimmt ist.

Mit dieser Verordnung wurden die beiden EU-Entscheidungen 1999/724/EG vom 28. Oktober 1999 (Bedingungen für die Herstellung und das Vermarkten von Speisegelatine in der Gemeinschaft) und 2000/20/EG vom 10. Dezember 1999 (Zertifikate für die Einfuhr von Speisegelatine und Ausgangsmaterialien zu deren Herstellung aus Drittländern) in deutsches Recht umgesetzt. Die beiden Entscheidungen folgen dem Auftrag der Richtlinie 92/118/EWG in Anhang 2, Kapitel 2, spezifische Hygienevorschriften für Speisegelatine festzulegen.

Die Speisegelatine-Verordnung stellt eine Ergänzung der für die Herstellung und Vermarktung von Speisegelatine bestehenden allgemeinen Regelungen nach dem Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz dar und bedeutet eine Konkretisierung der Anforderungen an die Herstellung, das Inverkehrbringen und die Einfuhr von Speisegelatine. Durch die Vorgaben an die Verwendung der Ausgangserzeugnisse zur Herstellung von Speisegelatine nimmt die Verordnung auch eine Verbindung zur BSE-Problematik auf und stellt sicher, dass nur nach dem Fleischhygienerecht verzehrfähiges Ausgangsmaterial von tauglich beurteilten Rindern, Schafen und Ziegen für die Herstellung von Speisegelatine verwendet werden darf; außerdem wird die Verwendung von Wiederkäuerknochen aus Ländern der Kategorie 4 (z.B. Großbritannien, Portugal) als Ausgangsmaterial verboten. Während die Verarbeitungsnormen für Knochen, die von Wiederkäuern aus Ländern der Kategorie 3 gewonnen wurden (z.B. Deutschland), genau definiert sind (Mazeration mit 4 % HCl für mindestens 2 Tage, anschließende Behandlung mit gesättigter Kalklösung für mindestens 20 Tage), werden die Herstellungsbedingungen für Gelatine aus anderen Ausgangsmaterialien in der Anlage der Speisegelatine-Verordnung, Kapitel 1 folgendermaßen festgelegt: „Die Ausgangserzeugnisse müssen mit Säure oder Lauge behandelt und dann ein- oder mehrmals gespült werden. Der pH-Wert muss anschließend eingestellt werden. Die Speisegelatine muss durch ein- oder mehrfaches Erhitzen mit anschließender Reinigung durch Filtration und Sterilisation extrahiert werden.“ Es werden also keine konkreten Vorgaben zu Art und Dauer der Säure- bzw. Laugebehand-

lung der Ausgangserzeugnisse, die nicht von Wiederkäuern der Kategorie 3 gewonnen werden, für die Herstellung von Gelatine gemacht.

Außerdem werden in Kapitel 1 der Anlage die zu erfüllenden mikrobiologischen Kriterien, Rückstandshöchstmengen sowie physikalische Parameter für die verkehrsfähige Speisegelatine festgelegt, die in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt werden:

### Gesetzliche Anforderungen an das Enderzeugnis der Gelatineherstellung

Tab. 3: Mikrobiologische Parameter

Mikrobiologische Parameter	Grenzwert
aerobe Bakterien insgesamt	10 <sup>3</sup> /g
Coliforme (30 °C)	0/g
Coliforme (44,5 °C)	0/10g
sulfitreduzierende anaerobe Bakterien (ohne Gaserzeugung)	10/g
<i>Clostridium perfringens</i>	0/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	0/g
Salmonellen	0/25g

Tab. 4: Chemisch-physikalische Parameter

Chemisch-physikalische Parameter	Grenzwert
As	1 ppm
Pb	5 ppm
Cd	0,5 ppm
Hg	0,15 ppm
Cr	10 ppm
Cu	30 ppm
Zn	50 ppm
Feuchtigkeit (105 °C)	15 %
Asche (550 °C)	2 %
SO <sub>2</sub>	50 ppm
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 ppm

### **2.2.7 Futtermittelrechtliche Anforderungen**

Die neue Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 über tierische Nebenprodukte, die am 1. Mai 2003 wirksam wird, beinhaltet die rechtlichen Anforderungen an Gelatine, die nicht für den menschlichen Verzehr bestimmt ist und als Futtermittel verwendet wird; die derzeitigen vollständigen Verbote der Verfütterung tierischer Produkte an Wiederkäuer und der Verfütterung von Gelatine, die aus Wiederkäuerknochen hergestellt wurde, an Nutztiere bleiben unberührt. In der Verordnung werden die tierischen Nebenprodukte nach dem potentiellen Risiko für Tiere, Menschen und Umwelt in drei Kategorien eingeteilt. Es wird vorgeschrieben, wie jede Kategorie entsorgt werden muss. Nur Material der Kategorie 3 (das sind Nebenprodukte gesunder, tauglich beurteilter Tiere, die zum menschlichen Verzehr geschlachtet wurden) dürfen zur Herstellung von Futtermitteln verwendet werden. Erzeugnisse tierischen Ursprungs mit Rückständen von Tierarzneimitteln, die den gemeinschaftlich festgesetzten Höchstwert überschreiten, werden in die Kategorie 2 eingeordnet und dürfen nur anderen Zwecken als der Futtermittelherstellung zugeführt werden (z.B. der Biogaserzeugung).

Die Mindestanforderungen an das Herstellungsverfahren von Gelatine, die als Futtermittel verwendet werden soll, entsprechen den geltenden Anforderungen an Speisegelatine, es entfallen jedoch die Vorgaben für mikrobiologische und chemisch-physikalische Kontrollen sowie für Rückstandskontrollen des Enderzeugnisses.

### **2.3 Folgerungen aus dem Schrifttum und daraus resultierende Zielsetzung für die eigenen Untersuchungen**

Tetracycline zählen zu den bei lebensmittelliefernden Tieren am häufigsten eingesetzten Antibiotika. Aufgrund ihrer Eigenschaft, sich als unlösliche Chelatverbindungen über lange Zeiträume in Knochen einzulagern, sind Tetracycline als gebundene Rückstände in den Knochen tauglich und untauglich beurteilter Schlachtierkörper gleichermaßen ein häufiger Befund; vor allem die Knochen von Schweinen sind stark belastet.

Schweineknochen stellen eine wichtige Rohstoffquelle für die Herstellung von Gelatine dar. Aufgrund der nachweislich hohen Belastung von Schweineknochen mit Rückständen von Tetracyclinen sollten die Prozessschritte der Gelatineherstellung eine vollständige Elimination

der Rückstände aus den Ausgangsmaterialien gewährleisten. Im Rahmen einer experimentellen Herstellung von Gelatine aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln konnten in dem Endprodukt Rückstände von Tetracyclinen nachgewiesen werden; angewendet wurden das saure Aufschlussverfahren und die handwerkliche Methode (WEIDENBERG 2000).

Ziel der eigenen Untersuchungen ist, im Rahmen einer Herstellung von Gelatine aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln den Verbleib der Tetracycline während der einzelnen Produktionsschritte aufzuzeigen. In Kooperation mit der deutschen Gelatineindustrie wird angestrebt, bei der Herstellung von Gelatine nach dem sauren Aufschlussverfahren im Labormaßstab die tatsächlichen industriellen Bedingungen so weit wie möglich zu simulieren. Außer den Ausgangsmaterialien sollen die Zwischenprodukte sowie während des Herstellungsprozesses entstehenden Abfälle und Abwässer auf Rückstände von Tetracyclinen untersucht werden. Dafür erscheint auch erforderlich, die tatsächliche Ausbeute der von KÜHNE et al. (2000) vorgeschlagene Extraktion der Knochen mit 1 M HCl zu überprüfen, um verlässliche quantitative Aussagen über den Verbleib der Tetracycline von Rohstoff bis zum Endprodukt treffen zu können.

Im Schrifttum finden sich in der Fragestellung der Hitzestabilität von gebundenen Tetracyclin-Rückständen nur Angaben zu Fleischknochenmehlen, daher soll insbesondere der Prozessschritt der Trocknung des Knochenschrotes hinsichtlich seiner Auswirkungen auf die Tetracyclin-Gehalte im Knochen untersucht werden.

Außerdem soll im Anschluss an die Herstellung von Gelatine das Ionenaustauschverfahren, das in der Industrie zur Entsalzung der Gelatinelösung eingesetzt wird, im Labormaßstab simuliert werden, um zu klären, ob der Ionenaustausch eventuell zu einer Elimination von möglichen Tetracyclin-Rückständen in Gelatine beiträgt.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Herstellung von Gelatine aus Knochen**

#### **3.1.1 Gewinnung des Probenmaterials**

Es wurden insgesamt ca. 30 kg tetracyclinhaltige Röhrenknochen von tauglich beurteilten, geschlachteten Mastschweinen verwendet. Die Auswahl der Knochen fand in einem lokalen Zerlegebetrieb statt und erfolgte durch Screening mittels UV-Lampe (Merck GmbH, 1.10203) bei einer Wellenlänge von 366 nm. Das Knochenmaterial wurde in einen abgedunkelten Raum verbracht und die Oberfläche der einzelnen Knochen unter UV-Auflicht untersucht.

Ausgewählt wurden nur deutlich fluoreszenzpositive Knochen mit zahlreichen, an der Oberfläche sichtbaren fluoreszierenden Bereichen.

Das gewonnene Probenmaterial wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

#### **3.1.2 Herstellungsverfahren**

##### **3.1.2.1 Zerkleinerung des Knochenmaterials**

Um die tatsächlichen Bedingungen während der industriellen Produktion von Gelatine weitestgehend simulieren zu können, war es für die geplanten Versuche notwendig, das Knochenmaterial auf die industriell übliche Schrotgröße zu zerkleinern.

In der Hochschule stand für diesen Prozessschritt keine geeignete Einrichtung zur Verfügung. In Kooperation mit einem großen deutschen Gelatineproduzenten erfolgte der Versand der gefrorenen Schweineknochen per Kühlspektion in das Knochenwerk der Firma. Dort wurden die Knochen mittels eines Zweiwellenbrechers (Zahnkranzabstand 10 mm) auf die industriell übliche Korngröße von 3 – 20 mm zerkleinert.

Unmittelbar nach der Zerkleinerung wurde das Knochenmaterial tiefgefroren und per Kühlspektion zurück an die Hochschule gesandt, wo es bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert wurde.

### 3.1.2.2 Entfettung

Nach der Zerkleinerung erfolgte für die weiteren Produktionsschritte eine Aufteilung des zerkleinerten Rohmaterials in zehn Ansätze. Jeweils 2,5 kg Knochen wurden in einen Edelstahl-Eimer (12 l Fassungsvermögen) eingewogen und mit je 6 l Wasser versetzt. Die Entfettung erfolgte im Kessel-Autoklav (KORIMAT KA 200®, Christian Wagner KG) unter regelmäßiger manueller Durchwirbelung des Knochenmaterials bei einer Wassertemperatur von 85 °C für 1 h. Nach Ablauf von 1 h wurden die einzelnen Ansätze über ein Sieb abgossen und das Entfettungswasser aufgefangen. Das verbliebene Knochenmaterial wurde erneut mit jeweils 6 l Wasser versetzt und unter den oben beschriebenen Bedingungen entfettet.

Von dem aufgefangenen Wasser aus der Entfettung erfolgte eine Probennahme von 100 ml pro Ansatz. Die Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei –20 °C gelagert.

### 3.1.2.3 Enzymatische Behandlung

Nach der Entfettung erfolgte eine enzymatische Behandlung des Knochenmaterials, um noch vorhandene Reste von Skelettmuskulatur und Bindegewebe zu entfernen. Das für diesen Prozeß notwendige Enzym Alkalase wurde von einem großen deutschen Gelatineproduzenten zur Verfügung gestellt.

Pro Ansatz im Edelstahl-Eimer wurden 6 l Wasser und 4 ml Alkalase zugegeben. Im Kessel-Autoklav bei einer Wassertemperatur von 58 °C betrug die Einwirkungszeit der Enzymlösung auf die Knochen 3 h. Während der Einwirkungszeit wurde das Knochenmaterial mehrmals manuell durchmischt.

Nach Ablauf der Einwirkungszeit wurden die einzelnen Ansätze über ein Sieb abgossen und die Enzymlösung aufgefangen. Von der Enzymlösung eines jeden Ansatzes wurde eine Probe von 100 ml entnommen und bei –20 °C gelagert.

Das Knochenschrot wurde nach der Enzymbehandlung unter fließendem Wasser gewaschen, und es erfolgte aus jedem Ansatz eine Probenahme von 70 g Knochenschrot. Die Proben wurden bis zur Aufbereitung bei –20 °C tiefgefroren.

#### **3.1.2.4 Trocknung**

Das entfettete und enzymatisch behandelte Knochenschrot wurde bei 60 °C im Trockenschrank (T 5050, Heraeus Christ GmbH) über den Zeitraum von 8 h getrocknet.

Nach diesem Vorgang wies das Knochenschrot eine durchschnittliche Trockensubstanz von 94 % auf.

Es erfolgte eine Probenahme in einer Menge von 70 g pro Ansatz. Die Proben wurden bis zur Aufbereitung bei –20 °C gelagert.

#### **3.1.2.5 Mazeration**

Für die Mazeration wurden aus acht Ansätzen je 750 g getrocknetes Knochenschrot verwendet. Die Ansätze wurden mit je 1,0 l einer 6 %-igen Salzsäurelösung (Carl Roth GmbH & Co KG, 4625.2) versetzt und 24 h bei einer Umgebungstemperatur von +14 °C gelagert.

Nach 24 h wurde die Salzsäure eines jeden Ansatzes durch Abgießen über ein Sieb von dem Knochenschrot getrennt und das Volumen der Salzsäure ermittelt. Außerdem wurden mittels eines pH-Meters (pH-Meter 530, WTW GmbH) der pH-Wert sowie mit Hilfe eines Dichtearäometers (Labor- und Analysen-Technik GmbH, 1660320031) die Dichte der Salzsäure bestimmt, und es erfolgte eine Probenahme von jeweils 200 ml. Die Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei –20° C tiefgefroren. Das Knochenschrot wurde jeweils erneut mit 1,0 l einer 6 %-igen Salzsäure versetzt und 24 h bei einer Umgebungstemperatur von +14 °C gelagert.

Der oben beschriebene Salzsäurewechsel sowie die anschließende Probenahme wurden an den vier folgenden Tagen wiederholt, so dass die gesamte Mazeration mit Salzsäure über einen Zeitraum von insgesamt sechs Tagen durchgeführt wurde.

Nach der Entfernung der Salzsäure vom 6. Tag der Mazeration wurde das aus dem Knochenschrot entstandene Ossein mit 1,0 l einer 0,18 N Schwefelsäurelösung (Carl Roth GmbH & Co KG, 4623.2) versetzt und 7 h bei +14 °C gelagert. Anschließend wurde die Schwefelsäurelösung durch Abgießen über ein Sieb von dem Ossein getrennt und das jeweilige Volumen, der pH-Wert sowie die Dichte der Schwefelsäure gemessen. Es erfolgte eine Probenahme von jeweils 200 ml, und die Proben wurden bei –20 °C gelagert.



Das verbliebene Ossein wurde 3 min unter fließendem Wasser gewaschen und 1 h mit Wasser bedeckt stehen gelassen. Anschließend wurde der Waschvorgang in gleicher Weise wiederholt und das Ossein abschließend 3 min unter fließendem Wasser gewaschen. Der pH-Wert des Osseins betrug nun 2,9.

Von jedem Ansatz wurde eine Probe des Osseins in einer Menge von 70 g entnommen und bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### **3.1.2.6 Extraktion**

Die Extraktion der Gelatine wurde in 4 Stufen im Kessel-Autoklav durchgeführt.

Das Ossein der einzelnen Ansätze wurde gewogen, und es wurde im Verhältnis 1,0:1,3 Wasser dazugegeben. Die Extraktion wurde jeweils über 5 h bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt:

1. Stufe: **55 °C**
2. Stufe: **60 °C**
3. Stufe: **60 °C**
4. Stufe: **90 °C**

Nach jeder Extraktion wurde die ausgeschmolzene Gelatine über ein Sieb von dem verbliebenen Ossein getrennt, und es wurde das Gewicht der Gelatinelösung sowie des Osseins ermittelt. Das verbliebene Ossein wurde dann für die folgende Extraktion erneut im Verhältnis 1,0:1,3 mit Wasser versetzt.

Nach der letzten Extraktion bei  $90\text{ °C}$  verblieben die restlichen Partikel des Osseins in der Gelatinelösung, und es wurde das Gesamtgewicht ermittelt.

### **3.1.2.7 Filtration**

Um aus der ausgeschmolzenen Gelatine eventuelle verbliebene Schwebstoffe und Partikel des Osseins zu entfernen, wurde eine Filtration durchgeführt. Die Gelatinelösung wurde über einen trockenen Faltenfilter ( $\text{Ø } 15\text{ cm}$ , Macherey-Nagel GmbH & Co KG, A 799) filtriert und anschließend zum Ausgelieren bei  $+7\text{ °C}$  über Nacht gelagert.

### **3.1.3 Sensorische Untersuchung der Gelatine**

Nach der Lagerung bei +7 °C wurde eine sensorische Untersuchung der Gelatine durchgeführt. Beurteilt wurden die Eigenschaften Geruch, Gelierfähigkeit und Klarheit. Bis zur weiteren Untersuchung und Aufbereitung wurde die Gelatine bei –20 °C gelagert.

## **3.2 Aufarbeitung der Proben für die High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

### **3.2.1 Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen**

#### **3.2.1.1 Knochen mit der Korngröße 2-6 mm**

Am 1. Tag des Vorversuches wurden aus getrocknetem, nicht für die Gelatineherstellung benötigtem Knochenmaterial Stichproben von 100 g entnommen. Die Proben wurden im gefrorenen Zustand mit einer Knochenmühle (P 42, Siepmann) zerkleinert. Nach diesem Vorgang variierte die Korngröße der Knochen zwischen 2 – 6 mm.

Von jeder Probe wurden 5 g in einen Zentrifugenbecher eingewogen und mit 20 ml 1 M HCl (Carl Roth GmbH & Co KG, 4625.2) versetzt. Diese Mischung wurde etwa 20 sec mit dem Ultraturrax (Art-Micra D-8, ART Labortechnik) bei 17.800 U/min homogenisiert. Anschließend wurde der Zentrifugenbecher mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurde die Aufarbeitung fortgesetzt, indem die Probe erneut für etwa 20 sec mit dem Ultraturrax bei 17.800 U/min homogenisiert wurde. Zur weiteren Extraktion wurde die Probe für 10 min im Ultraschallbad (Branson 12, Jürgens GmbH & Co) behandelt und anschließend 10 min bei 8.000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge Z 383 K, Hermle Labortechnik GmbH). Nach der Zentrifugation erfolgte die Überführung des Überstandes in ein Becherglas.

Der im Zentrifugenbecher verbliebene Bodensatz wurde nochmals mit 20 ml 1 M HCl überschüttet und der Extraktionsvorgang wiederholt; die Überstände wurden vereinigt.

Auch nach wiederholtem Extraktionsvorgang befanden sich im Bodensatz noch Knochenpartikel mit fester Struktur. Unter UV-Auflicht (UV-Lampe 1.10203, Merck GmbH) waren einzelne fluoreszierende Bereiche auf den Knochenpartikeln sichtbar.

Die Probe wurde im Zentrifugenbecher erneut mit 20 ml 1 M HCl überschüttet, mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C gelagert.

Der pH-Wert der vereinigten Überstände aus der Extraktion wurde mit 5 M NaOH (Carl Roth GmbH & Co KG, 9356.1) auf pH 4,0 eingestellt; verwendet wurde hierzu ein pH-Meter (pH 530, WTW GmbH). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Probe bei 8.000 U/min für 10 min. Der Überstand wurde über einen trockenen Faltenfilter (Ø 11 cm, Macherey-Nagel GmbH & Co KG) in einen Erlenmeyerkolben abgegossen.

Die so vorbereitete Probe konnte nun zur weiteren Aufbereitung auf eine beladene Chelating-Sepharose-Säule gegeben werden.

### Herstellung der Chelating-Sepharose-Säule:

Eine Glassäule (Ø 2 cm) wurde mit etwas Glaswolle bestückt, bevor 5 ml der Chelating-Sepharose-Suspension (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, I-4510) eingefüllt wurden. Nachdem sich das feste Material abgesetzt hatte, wurde die überschüssige Flüssigkeit abgelassen und die Säule mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe trocken gesaugt.

20 ml Kupfersulfatlösung (5 g CuSO<sub>4</sub> (Merck Eurolab GmbH, 102791) / 1 Aqua dest.) wurden über das Gelbett gegeben, und auf dieses wurde ein weiterer Glaswollepfropf geschoben. Anschließend wurden 15 ml Succinatpuffer pH 4 (5,9 g Bernsteinsäure (Carl Roth GmbH & Co KG, 8268.2) / 1 Aqua dest.) über die Säule gegeben.

Nachdem die Probe über die Chelating-Sepharose-Säule gelaufen war, wurde die Säule zunächst mit 10 ml Aqua dest., dann mit 30 ml Methanol (Carl Roth GmbH & Co KG, 7342.1) und nochmals zweifach mit 10 ml Aqua dest. gewaschen.

Die Elution der Tetracycline erfolgte mit 40 ml EDTA-Succinatpuffer (37,2 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Titrierkomplex III, (Carl Roth GmbH & Co KG, 8043.2) / 1 Succinatpuffer pH 4); dieser Vorgang wurde mit 10 ml dieser Lösung wiederholt.

Es schloss sich eine Reinigung der vereinigten Eluate über ein C18ec-Festphasensäulchen (Chromabond Säulen C18ec, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, 730014) an. Dieses Säulchen

wurde vorher zunächst mit 5 ml Methanol und dann mit 5 ml Aqua dest. konditioniert. Nach dem Durchlaufen der Eluate wurde das Säulchen mit 5 ml Aqua dest. gewaschen und anschließend 10 min mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe lufttrocken gesaugt.

Die Tetracycline wurden über Nacht mit 5 ml Methanol eluiert.

Das Einengen des Eluates am nächsten Tag erfolgte im Rotations-Vakuum-Konzentrator (Alpha-RVC, Martin Christ GmbH) bei 30 °C unter den vom Hersteller empfohlenen Betriebsbedingungen für methanolhaltige Proben.

Die eingedampfte Fraktion von etwa 0,4 ml wurde schließlich mit Eluent für die HPLC (Acetonitril (Carl Roth GmbH & Co KG, 7330.1) : Oxalsäure (Merck Eurolab GmbH, 100495) im Verhältnis 1:1) auf 1,0 ml aufgefüllt.

Die so vorbereitete Probe wurde bis zur HPLC-Untersuchung bei -20 °C gelagert.

Am 3. Tag des Vorversuches wurde der mit 1 M HCl überschüttete Bodensatz aus der ersten Extraktion erneut mit dem Ultraturrax bei 17.800 U/min für 10 min homogenisiert und, wie oben beschrieben, im Ultraschallbad behandelt sowie zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen trockenen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben überführt. Der verbliebene Bodensatz wurde erneut mit 20 ml 1 M HCl überschüttet, homogenisiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Der Überstand aus der zweiten Extraktion der Knochenpartikel wurde wie oben beschrieben weiter für die HPLC-Untersuchung aufbereitet.

Am 4. Tag wurde der verbliebene, mit HCl versetzte Bodensatz der Probe einem dritten, vollständigen Extraktionsvorgang unterzogen. Nach diesem Prozeß war die Knochenmatrix soweit aufgelöst, dass sich im Anschluß an die Zentrifugation nur noch eine geringe Menge Bodensatz im Zentrifugenbecher befand. Dieser Bodensatz wurde nicht weiter aufgearbeitet. Der Überstand aus der dritten Extraktion wurde wie oben beschrieben weiter für die HPLC-Untersuchung aufbereitet.

### **3.2.1.2 Knochen mit der Korngröße 1-2 mm**

Um einen homogenen Zerkleinerungsgrad der Knochen zu gewährleisten und damit auch die notwendige Extraktionszeit zu verkürzen, wurden die in der Knochenmühle (P 42, Siepmann) zerkleinerten Knochen in das Institut für Tierernährung verbracht und dort in einer Mikroschlagmühle (Type DCFH 48, Culatti AG) weiter zermahlen.

Um ein durch den Restfettgehalt der Knochenproben bedingtes Verklumpen in der Mühle zu vermeiden, wurde das Knochenmaterial vor dem Mahlvorgang einer Kaltentfettung mit Petrolether (Carl Roth GmbH & Co KG, 9320.2) unterzogen. Die Korngröße der Knochen betrug nach dem Mahlvorgang 1 - 2 mm.

Es wurden 5 g des gemahlten Knochenmaterials in einen Zentrifugenbecher eingewogen und mit 20 ml 1 M HCl überschüttet. Die Probe wurde etwa 20 sec im Ultraturax bei 17.800 U/min homogenisiert. Anschließend wurde der Zentrifugenbecher mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C gelagert.

Ab dem folgenden Tag wurde die Probe den unter 3.2.1.1 beschriebenen Extraktionsstufen unterzogen.

### **3.2.2 Knochen**

Sowohl die frischen als auch die getrockneten Knochenproben wurden in tiefgefrorenem Zustand mit der institutseigenen Knochenmühle zu Partikeln der Korngröße 2-6 mm zerkleinert. Anschließend erfolgte eine Kaltentfettung der Proben mit Petrolether. Die so vorbereiteten Proben wurden in das Institut für Tierernährung verbracht und dort mit einer Mikroschlagmühle zu Partikeln mit einer Korngröße von 1 – 2 mm zermahlen.

Je 5 g der gemahlten Probe wurden in einen Zentrifugenbecher eingewogen und mit 20 ml 1 M HCl überschüttet. Anschließend erfolgte für ca. 20 sec eine Homogenisation mit dem Ultraturax bei 17.800 U/min. Der Zentrifugenbecher wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurde die Probe wiederholt homogenisiert, anschließend 10 min im Ultraschallbad behandelt und 10 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Becherglas abgossen, und mit dem verbliebenen Bodensatz wurde der oben genannte Ex-

traktionsvorgang einmal wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C gelagert.

Der nach Abgießen des zweiten Überstandes im Zentrifugenbecher verbliebene Bodensatz wurde erneut mit 20 ml 1 M HCl überschüttet, homogenisiert und nach Abdeckung mit Aluminiumfolie über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurde der Extraktionsvorgang mit dem verbliebenen Bodensatz aus der 1. Extraktion noch einmal wiederholt, und der gewonnene Überstand wurde mit den Überständen vom Vortag vereinigt. Es erfolgte eine Einstellung des pH-Wertes mit 5 M NaOH auf pH 4,0. Die so vorbereitete Probe wurde auf eine beladene Chelating-Sepharose-Säule gegeben und nach der unter 3.2.1.1 beschriebenen Methode weiter für die HPLC-Untersuchung aufgearbeitet.

### **3.2.3 Entfettungswasser und Enzymlösung**

Jeweils 50 ml der Probe wurden in einen Erlenmeyerkolben überführt. Unter ständigem Rühren erfolgte die Einstellung des pH-Wertes mit 1 M HCl auf pH 4,0. Anschließend wurde die Probe auf zwei Zentrifugenbecher verteilt und 10 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation über einen trockenen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben überführt und auf eine beladene Chelating-Sepharose-Säule gegeben; die weitere Aufarbeitung für die HPLC-Untersuchung erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben.

### **3.2.4 Ossein**

Es wurden 5 g der Probe in einen Zentrifugenbecher eingewogen, und die Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.2.2 für Knochen beschrieben mit der Abweichung, dass bereits nach Vereinigung der ersten beiden Überstände die Einstellung des pH-Wertes und die anschließende Aufreinigung über die Chelating-Sepharose-Säule sowie das C18ec-Festphasensäulchen vorgenommen wurde (siehe 3.2.1.1).

### 3.2.5 Gelatine

Von der Gelatine, die keinem Ionenaustausch unterzogen wurde, wurden je 10 g in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 40 ml Pepsinlösung überschüttet.

Die Gelatineproben, mit denen ein Ionenaustausch durchgeführt worden war, wurden jeweils als Gesamtmenge im Erlenmeyerkolben mit 40 ml Pepsinlösung überschüttet.

#### Herstellung der Pepsinlösung:

Zu 1,25 g Pepsin (Acros Organics, 41707-1000) wurden unter Rühren 200 ml auf 40 °C erwärmtes Aqua dest. gegeben. Anschließend wurden 2,5 ml einer 37 %-igen HCl (Carl Roth GmbH & Co KG, 4625.2) hinzugegeben. Der pH-Wert dieser Lösung lag bei 0,8.

Nach 45-minütiger Inkubation bei 40 °C im Wasserbad (Typ 3047, Köttermann) wurde der pH-Wert der Probe mit 5 M NaOH auf pH 4,0 eingestellt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 8000 U/min. Der Überstand wurde über einen trockenen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben abgegossen, und der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf pH 4,0 eingestellt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 8.000 U/min, und der Überstand wurde über einen trockenen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben abgegossen.

Die weitere Aufarbeitung der Probe über eine Chelating-Sepharose-Säule sowie ein C18ec-Festphasensäulchen erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben.

### 3.2.6 Salzsäure aus der Mazeration

Es wurden jeweils 50 ml der Salzsäure in einen Erlenmeyerkolben überführt. Unter ständigem Rühren erfolgte mit 5 M NaOH die Einstellung des pH-Wertes auf pH 4,0. Anschließend wurde die Probe auf zwei Zentrifugenbecher verteilt und 10 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände nach der Zentrifugation wurden über einen trockenen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben überführt und auf eine beladene Chelating-Sepharose-Säule gegeben. Die weitere Aufarbeitung der vereinigten Überstände erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben.

Bei der Aufarbeitung der Salzsäure aus den ersten fünf Tagen der Mazeration befanden sich nach Einstellung des pH-Wertes und Zentrifugation der Probe unterschiedliche Mengen eines

Bodensatzes in den Zentrifugenbechern. Diese Bodensätze wurden pro Probe in einem Zentrifugenbecher vereinigt und mit 40 ml 1 M HCl überschüttet. Anschließend wurde die Probe etwa 10 sec mit dem Ultraturax bei 17.800 U/min homogenisiert, mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurde der Extraktionsvorgang wiederholt. Die Proben der Salzsäure aus dem 1. bis zum 4. Tag der Mazeration wiesen auch nach der zweiten Extraktion noch Bodensätze auf, so dass diese Proben die Durchführung eines dritten Extraktionsvorganges erforderlich machten. Die Überstände wurden nach jeder Extraktion über eine beladene Chelating-Sepharose-Säule gegeben und wie unter 3.2.1.1 beschrieben weiter für die HPLC-Untersuchung aufgearbeitet.

Das Ergebnis der HPLC-Untersuchung auf Tetracyclinrückstände in der Salzsäure wurde für den 1. bis 5. Tag der Mazeration aus der Summe der Teilergebnisse der einzelnen Extraktionen berechnet.

### **3.2.7 Dicalciumphosphat**

Von der Salzsäure aus dem 4. Tag der Mazeration wurden zwei Stichproben (je 50 ml) entnommen. Mit diesen beiden Proben wurde unter Verwendung von 10 %-iger Kalkmilch ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) eine pH-Wert-Einstellung auf pH 4,0 durchgeführt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 8.000 U/min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Von den verbliebenen Bodensätzen wurden je 10 g entnommen, mit je 40 ml 1 M HCl überschüttet und etwa 10 sec mit dem Ultraturax bei 17.800 U/min homogenisiert. Anschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes mit 5 M NaOH auf pH 4,0. Nach der pH-Wert-Einstellung wurden die Proben 10 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände nach der Zentrifugation wurden über einen trockenen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben überführt und auf eine beladene Chelating-Sepharose-Säule gegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben.



### 3.3 HPLC-Untersuchung

Die HPLC-Anlage bestand aus folgenden Geräten bzw. Materialien:

HPLC-Pumpe	La Chrom L 7110, Merck Eurolab GmbH
Degasser	Knauer GmbH
Vorsäule	CC 8/4 Lichrospher 100-5 RP 18, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Trennsäule	CC 125/4 Lichrospher 100-5 RP 18, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
UV-Detektor	Photodiode Array UV/VIS-Detektor, Typ SPD-M6A, Shimadzu GmbH
Integrator	C-R5A Chromatopac, Shimadzu GmbH

Als Eluenten wurden verwendet:

a.) für den Nachweis der Tetracycline und ihrer Epimere:

30 vol. % Acetonitril (Carl Roth GmbH & Co. KG, 7330.1)

70 vol. % 0,01 M Oxalsäure (Merck Eurolab GmbH, 100495)

Fluss: 0,6 ml/min

b.) für den Nachweis von Anhydrotetracyclin und Epi-Anhydrotetracyclin:

35 vol. % Acetonitril

65 vol. % Phosphorsäure, 5 %-ig (Carl Roth GmbH & Co. KG, 9079)

Fluss: 0,7 ml/min

Für die Erstellung der Eichkurven wurden Standardlösungen der folgenden Substanzen (je 1 mg in 1 ml Aqua dest.) hergestellt und bei  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert:

- Oxytetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, O-5875)
- Tetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-3383)
- Chlortetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-4881)
- 4-Epi-Oxytetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics, 25771-1000)
- 4-Epi-Tetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics, 23312-1000)
- 4-Epi-Chlortetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics, 26823-1000)
- Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics, 23313-1000)
- 4-Epi-Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics, 23311-1000)

Mit dem jeweiligen Eluenten wurden die Arbeitsstandards täglich neu für die HPLC verdünnt. Die Eichkurven wurden mit den Konzentrationen 1, 5 und 10  $\mu\text{g/ml}$  erstellt.

Die Wiederfindungsraten zu den Extraktionsmethoden für Tetracycline aus Knochen und Gelatine wurden aus den vorhandenen laboreigenen Daten übernommen.

Für die Ermittlung der Wiederfindungsraten der Extraktionsmethode für Tetracycline aus HCl wurde rückstandsfreie 1 M HCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, 4625.2) mit den einzelnen Tetracyclinen dotiert und einer Aufarbeitung unterzogen. Oxytetracyclin sowie alle Formen des Tetracyclins wurden jeweils in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  dotiert. Chlortetracyclin und 4-Epi-Chlortetracyclin wurden wegen der geringeren Empfindlichkeit des UV-Detektors jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  dotiert.

Die Messung am UV-Detektor erfolgte bei einer Wellenlänge von 360 nm für die Tetracycline und ihre Epimere bzw. einer Wellenlänge von 435 nm für die Anhydrotetracycline und ihre Epimere.

Die Kalkulation der Ergebnisse erfolgte über die Peakflächen unter Anwendung der externen Standard-Methode und unter Berücksichtigung der experimentell ermittelten Wiederfindungsraten mittels Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel (Version 2000). Die Umrechnung in  $\mu\text{g/kg}^{-1}$  erfolgte unter Berücksichtigung der Einwaagen und des Injektionsvolumens.

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte unter Beachtung der Richtlinien für die Qualitätssicherung im Rückstandslabor (HEITZMAN 1994).

### **3.4 Chemische Untersuchungen**

Es wurden pro Extraktion jeweils zwei Stichproben des Enderzeugnisses Gelatine entnommen. Diese Stichproben wurden auf die chemischen Parameter Asche, Trockensubstanz, Gesamtfett, Gesamteiweiß und Bindegewebeseiweiß untersucht.

#### **3.4.1 Asche-Bestimmung**

Die Asche-Bestimmung erfolgte gemäß der amtlichen Untersuchungsmethode (L 07.00-4) zur Bestimmung der Asche in Fleisch und Fleischerzeugnissen nach §35 LMBG (BGA 1995).

Die feinzerkleinerten Proben wurden in kleinen Quarzgutschalen mit 15 %-iger Magnesiumacetatlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, PO261.1) vermengt und im Muffelofen (MR 170 E, Heraeus Christ GmbH) bei 600 °C verascht. Die Bestimmung der Masse erfolgte durch Differenzwägung.

#### **3.4.2 Trockensubstanz-Bestimmung**

Die Trockensubstanz-Bestimmung erfolgte gemäß der amtlichen Untersuchungsmethode (L 07.00-3) zur Bestimmung der Trockenmasse in Fleischerzeugnissen nach §35 LMBG (BGA 1995).

Die Proben wurden mit Seesand (Carl Roth GmbH & Co. KG, 8441.2) vermischt, im Trockenschrank (T 5050, Heraeus Christ GmbH) bei 103 °C getrocknet und ausgewogen.

#### **3.4.3 Fettgehaltsbestimmung**

Die Fettgehaltsbestimmung erfolgte gemäß der amtlichen Untersuchungsmethode (L 07.00-6) zur Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Fleischerzeugnissen nach § 35 LMBG (BGA 1995).

Die gut durchmischte Probe wurde mit Salzsäure aufgeschlossen und die Aufschlussflüssigkeit durch zwei angefeuchtete Faltenfilter (Ø 15 cm, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, A799) filtriert. Der Filtrerrückstand wurde sofort getrocknet und 4 h mit Petrolether (Carl

Roth GmbH & Co KG, 9320.2) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand bei 103 °C unter Atmosphärendruck getrocknet, abgekühlt und gewogen. Der Fettgehalt wurde aus der Differenz zwischen Ein- und Auswaage errechnet.

### **3.4.4 Rohprotein-Bestimmung**

Die Rohprotein-Bestimmung erfolgte gemäß der amtlichen Untersuchungsmethode (L 07.00-7) zur Bestimmung des Rohproteins in Fleischerzeugnissen nach § 35 LMBG (BGA 1995).

Hierzu wurde der organisch gebundene Stickstoff mit konzentrierter Schwefelsäure (Carl Roth GmbH & Co KG, 4623.2) in Ammoniumsulfat überführt. Danach wurde Lauge im Überschuss zugegeben und nach Destillation der Ammoniak in gesättigter Borsäure-Lösung (Merck Eurolab GmbH, 100165) aufgefangen und anschließend titriert.

### **3.4.5 Bindegewebeseiweiß-Bestimmung**

Die Bestimmung des Gehaltes an Bindegewebeseiweiß erfolgte nach der amtlichen Untersuchungsmethode (L 06.00-8) zur Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen nach §35 LMBG (BGA 1995). Die Probe wurde durch Kochen mit Salzsäure (6 mol/l, Carl Roth GmbH & Co. KG, 4652.2) aufgeschlossen. Nach Abtrennung des Fettes wurde das Hydroxyprolin unter Verwendung von Chloramin T (Merck Eurolab GmbH, 102426) oxidiert. Nach Zugabe von 4-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck Eurolab GmbH, 103058) wurde die Extinktion der Lösung photometrisch bei 558 nm gemessen (Helios Beta, Unicam). Sie ist der Hydroxyprolinkonzentration direkt proportional.

## 3.5 Ionenaustausch

### 3.5.1 Vorbereitung

#### a.) Vorbereitung der Ionenaustauscherharze

Für den Ionenaustausch wurden Kunstharzionenaustauscher (Lewatite) verwendet, die von einem großen deutschen Gelatinehersteller zur Verfügung gestellt wurden:

- ▶ Kationenaustauscher: S 1428, Bayer®, funktionelle Gruppe: Sulfonsäure
- ▶ Anionenaustauscher: MP 62, Bayer®, funktionelle Gruppe: tertiäres Amin.

Vor dem Einsatz der Harze mussten diese zunächst regeneriert werden. Die Regeneration des Kationenaustauscherharzes erfolgte mit 5 %-iger HCl, während das Anionenaustauscherharz mit 4 %-iger NaOH (Carl Roth GmbH & Co KG, 9356.1) regeneriert wurde.

Es wurden jeweils 5 ml des Harzes in eine doppelwandige Glassäule (Ø 1,5 cm) eingefüllt und mit 25 ml Aqua dest. gewaschen; die Durchflussgeschwindigkeit betrug 25 ml/30 min. Anschließend wurden jeweils 15 ml der Säure bzw. Lauge auf das Harz gefüllt und langsam abtropfen gelassen. Die Regeneration erfolgte mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 15 ml/h. Anschließend wurden die Harze mit Aqua dest. und einer Durchflussgeschwindigkeit von 25 ml/30 min gewaschen. Der Regenerationsvorgang wurde als beendet angesehen, wenn das abtropfende Aqua dest. einen pH-Wert zwischen 3,5 und 4 (Kationenaustauscher) bzw. zwischen 9,5 und 10 (Anionenaustauscher) aufwies.

#### b.) Vorbereitung der Gelatineproben

Für die Versuche zum Ionenaustausch wurde Gelatine aus der laboreigenen Produktion verwendet. In der vorausgegangenen HPLC-Untersuchung der Gelatine auf Rückstände von Tetracyclinen konnte die Gelatine als rückstandsfrei beurteilt werden.

Von der Gelatine wurden insgesamt 32 Proben von jeweils 20 g in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Die Proben wurden 15 min bei 40 °C im Wasserbad (Typ 3047, Köttermann GmbH) verflüssigt. Es erfolgte eine Dotierung der noch verflüssigten Proben mit jeweils

20 µg Tetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-3383) und 20 µg Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics, 23313-1000).

Die so vorbereiteten Proben wurden vor der weiteren Aufarbeitung 1 h im Kühlschrank bei +8 °C gelagert.

### c.) Aufbau der Versuchsanordnung

Um die notwendige konstante Prozesstemperatur für das Ionenaustauschverfahren zu erreichen, wurde die mit dem jeweiligen Harz befüllte, doppelwandige Glassäule über einen PVC-Schlauch an die Warmwasserleitung im Labor angeschlossen. Über einen weiteren PVC-Schlauch, der mit der Glassäule verbunden wurde, konnte das eingeleitete Wasser die Säule wieder verlassen. Auf diese Weise wurde durch das ständig nachfließende warme Wasser die Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur in der Glassäule gewährleistet. Die Temperatur des Wassers aus der Leitung betrug +52 °C.

Die Glassäule wurde bereits 15 min vor der Befüllung mit Gelatinelösung an die Wasserleitung angeschlossen.

## 3.5.2 Durchführung

### a.) Kationenaustausch

Der Kationenaustausch wurde mit 8 Proben durchgeführt. Die mit Tetracyclin und Anhydrotetracyclin dotierten Proben wurden für 15 min im Wasserbad bei 55 °C auf die notwendige Prozesstemperatur gebracht und anschließend auf die mit dem Kationenaustauscherharz S 1428 beladene Glassäule überführt. Die Gelatinelösung wurde langsam über das Harz abtropfen gelassen; die Durchflussgeschwindigkeit betrug 15 ml/h. Die abtropfende Lösung wurde in einem Erlenmeyerkolben aufgefangen.

Die Glassäule wurde abschließend mit 10 ml Aqua dest., das im Wasserbad auf +55 °C erwärmt wurde, gespült. Dieser Spülvorgang diente dem Zweck, eventuelle zwischen den Harzkügelchen verbliebene Reste der Gelatinelösung in den Erlenmeyerkolben zu überführen.

Die Proben wurden über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C gelagert und am folgenden Tag weiter aufbereitet.

Das Ionenaustauscherharz wurde nach jedem Durchlauf verworfen, so dass nur frisch regeneriertes Harz für die jeweiligen Versuche verwendet wurde.

b.) Anionenaustausch

Es wurden 8 Proben einem Anionenaustauschverfahren unterzogen. Der Versuch wurde nach dem gleichen Verfahren durchgeführt wie unter 3.5.2 a.) beschrieben mit der Abweichung, dass die Glassäule mit 5 ml des Anionenaustauscherharzes MP 62 befüllt war.

c.) Kombinierter Kationen- und Anionenaustausch

Für diesen Versuch wurden insgesamt 8 Proben verwendet. Die Proben wurden zunächst wie unter 3.5.2 a.) beschrieben einem Kationenaustausch unterzogen. Anschließend wurde die jeweils in einem Erlenmeyerkolben aufgefangene Gelatinelösung 15 min im Wasserbad bei +55 °C erwärmt, und die Lösung wurde wie unter 3.5.2 b.) beschrieben über eine mit Anionenaustauscherharz beladene Glassäule abtropfen gelassen.

Nach diesen beiden Schritten wurde die jeweils in einem Erlenmeyerkolben aufgefangene Gelatinelösung bis zur weiteren Aufbereitung über Nacht im Kühlschrank bei +8 °C gelagert.

d.) Kontrolle zur Ermittlung der Wiederfindungsraten

Um die Wiederfindungsraten für Tetracyclin und Anhydrotetracyclin zu bestimmen, wurden 8 dotierte Gelatineproben keinem Ionenaustausch unterzogen und direkt für die HPLC-Untersuchung aufgearbeitet.

### **3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau B. Schneider und Herrn Dr. M. Beyerbach, Institut für Biometrie und Epidemiologie der Tier-

ärztlichen Hochschule Hannover, unter Verwendung des SAS-Programmes (Statistical Analysis System).

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe einer deskriptiven Statistik charakterisiert (Minimum, 25. Perzentil, Median, 75. Perzentil und Maximum bei nicht normal verteilten Daten bzw. arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung bei normal verteilten Daten).

Zum Vergleich der verschiedenen Ionenaustauschverfahren im Hinblick auf die Elimination von Tetracyclin-Rückständen in Gelatine wurde eine 1-faktorielle Varianzanalyse durchgeführt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der UV-Untersuchung

Die Auswahl der Schweineknochen für die Herstellung der Gelatine erfolgte durch die Untersuchung mit UV-Auflicht bei der Wellenlänge von 366 nm. Es wurden ausschließlich Knochen mit deutlich positiver Fluoreszenz ausgewählt.

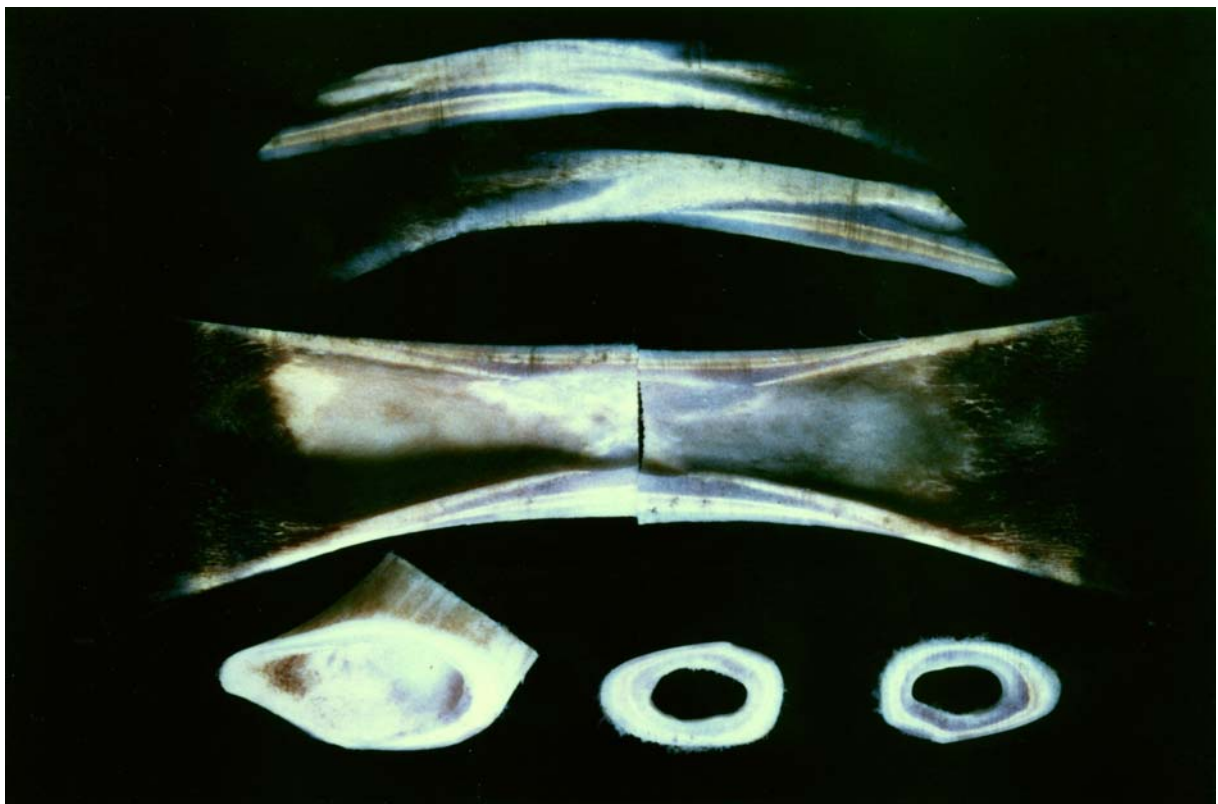


Abb. 7: Ansicht eines tetracyclinhaltigen Knochens unter UV-Licht (Wellenlänge 366 nm)

## 4.2 Mittlere Wiederfindungsraten der angewendeten Methoden

Es wurden folgende mittlere Wiederfindungsraten der angewendeten Methoden zur Extraktion von Tetracyclinen aus Knochen bzw. Ossein, HCl und Gelatine ermittelt (Rohdaten vgl. Anhang 1):

**Tab. 5: Mittlere Wiederfindungsraten zur Extraktion von Tetracyclinen (Angaben in % mit Standardabweichung (SD), Rohdaten siehe Anhang 1)**

<b>Tetracyclin</b>	<b>Wiederfindungsrate aus Knochen und Ossein [%]</b>	<b>Wiederfindungsrate aus HCl [%]</b>	<b>Wiederfindungsrate aus Gelatine [%]</b>
<b>OTC</b>	<b>66,1 ± 4,1</b>	<b>60,9 ± 4,5</b>	<b>64,1 ± 5,6</b>
<b>TC</b>	<b>65,5 ± 3,1</b>	<b>62,1 ± 2,1</b>	<b>69,6 ± 8,2</b>
<b>E-TC</b>	<b>60,1 ± 1,1</b>	<b>62,0 ± 4,7</b>	<b>59,8 ± 7,5</b>
<b>ATC</b>	<b>46,0 ± 1,4</b>	<b>46,4 ± 2,0</b>	<b>47,1 ± 2,0</b>
<b>E-ATC</b>	<b>43,8 ± 2,7</b>	<b>46,9 ± 4,2</b>	<b>45,3 ± 1,4</b>
<b>CTC</b>	<b>56,3 ± 8,1</b>	<b>54,9 ± 2,0</b>	<b>61,5 ± 5,6</b>
<b>E-CTC</b>	<b>48,7 ± 1,8</b>	<b>43,7 ± 4,3</b>	<b>48,3 ± 8,6</b>

### 4.3 Ergebnisse der Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen

#### 4.3.1 Ergebnisse der Aufarbeitung von Knochen mit der Korngröße 2-6 mm

Nach der mit 1 M HCl durchgeführten eintägigen Extraktion von Tetracyclin-Rückständen aus Knochen, die in der institutseigenen Knochenmühle zu Partikeln mit der Korngröße von 2-6 mm zermahlen worden waren, konnte unter UV-Auflicht noch eine positive Fluoreszenz nachgewiesen werden. Daraufhin wurden zur Ermittlung der Extraktionszeit, die zur vollständigen Erfassung gebundener Rückstände von Tetracyclinen in Knochen erforderlich ist, Vorversuche durchgeführt.

Aus den grob zermahlenden Knochen (Korngröße 2-6 mm) konnten auch am 3. Extraktionstag noch gebundene Rückstände von Tetracyclinen nachgewiesen werden, so dass sich bei dieser Korngröße die Durchführung einer Extraktion über drei Tage als notwendig erwies, um eine vollständige Herauslösung der Tetracyclin-Rückstände aus den Knochen zu gewährleisten (vgl. Anhang 2, Tab. IV).

##### 4.3.1.1 Erster Extraktionstag

Tab. 6: Tetracyclin-Bestimmung am 1. Extraktionstag, Knochen grob zermahlen (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

	<b>Median</b>	<b>25. Pztl.</b>	<b>75. Pztl.</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>OTC</b>	<b>164</b>	144	199	0,00	287
<b>E-TC</b>	<b>563</b>	517	614	255	854
<b>TC</b>	<b>1470</b>	1285	1739	846	2060
<b>E-CTC</b>	<b>253</b>	226	684	156	1215
<b>CTC</b>	<b>897</b>	647	1324	518	1719
<b>E-ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Gesamtsumme</b>	<b>3596</b>	2844	4257	1958	5994

## 4.3.1.2 Zweiter Extraktionstag

Tab. 7: Tetracyclin-Bestimmung am 2. Extraktionstag, Knochen grob zermahlen (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

	<b>Median</b>	<b>25. Pztl.</b>	<b>75. Pztl.</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>OTC</b>	<b>36,3</b>	32,5	43,1	0,00	45,6
<b>E-TC</b>	<b>529</b>	382	621	347	753
<b>TC</b>	<b>842</b>	757	1011	711	1795
<b>E-CTC</b>	<b>1254</b>	1068	1602	1028	1960
<b>CTC</b>	<b>1348</b>	1009	1663	923	2988
<b>E-ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	186	0,00	452
<b>Gesamtsumme</b>	<b>4138</b>	3776	4426	3067	7991

## 4.3.1.3 Dritter Extraktionstag

Tab. 8: Tetracyclin-Bestimmung am 3. Extraktionstag, Knochen grob zermahlen (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

	<b>Median</b>	<b>25. Pztl.</b>	<b>75. Pztl.</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>OTC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>E-TC</b>	<b>38,5</b>	30,8	69,1	26,2	82,7
<b>TC</b>	<b>60,0</b>	48,1	132	38,4	152
<b>E-CTC</b>	<b>0,00</b>	0,00	69,2	0,00	99,4
<b>CTC</b>	<b>122</b>	89,9	136	0,00	198
<b>E-ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Gesamtsumme</b>	<b>271</b>	220	357	64,6	461

### 4.3.2 Ergebnisse der Aufarbeitung von Knochen mit der Korngröße 1-2 mm

Bei den mit einer Mikroschlagmühle fein zermahlene Knochen (Korngröße 1-2 mm) konnte bereits mit einer zweitägigen Extraktion die vollständige Erfassung der gebundenen Rückstände von Tetracyclinen erreicht werden (vgl. Anhang 2, Tab.V).

#### 4.3.2.1 Erster Extraktionstag

Tab. 9: Tetracyclin-Bestimmung am 1. Extraktionstag , Knochen fein zermahlen (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

	<b>Median</b>	<b>25. Pztl.</b>	<b>75. Pztl.</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>OTC</b>	<b>262</b>	53,3	733	36,4	856
<b>E-TC</b>	<b>799</b>	746	869	491	1020
<b>TC</b>	<b>2059</b>	1528	2196	1127	3208
<b>E-CTC</b>	<b>428</b>	180	848	131	1112
<b>CTC</b>	<b>1363</b>	1241	1564	999	2007
<b>E-ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Gesamtsumme</b>	<b>5204</b>	4719	6041	3270	6259

#### 4.3.2.2 Zweiter Extraktionstag

Tab. 10: Tetracyclin-Bestimmung am 2. Extraktionstag, Knochen fein zermahlen (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

	<b>Median</b>	<b>25. Pztl.</b>	<b>75. Pztl.</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>OTC</b>	<b>93,7</b>	40,1	128	0,00	253
<b>E-TC</b>	<b>336</b>	262	517	188	1009
<b>TC</b>	<b>744</b>	532	969	354	1312
<b>E-CTC</b>	<b>491</b>	296	650	202	1129
<b>CTC</b>	<b>982</b>	574	1201	429	1926
<b>E-ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>ATC</b>	<b>0,00</b>	0,00	109	0,00	162
<b>Gesamtsumme</b>	<b>2761</b>	1776	3615	1455	5208

#### **4.3.2.3 Dritter Extraktionstag**

Nach dem dritten Extraktionstag konnten in den fein zermahlene Knochen (Korngröße 1-2 mm) keine Rückstände von Tetracyclinen mehr nachgewiesen werden.

#### **4.4 Ergebnisse der HPLC-Untersuchung der Knochen vor und nach der Trocknung auf gebundene Rückstände von Tetracyclinen**

Die Berechnung der Tetracyclin-Gehalte erfolgte zur Vergleichbarkeit der Daten auf 100 % TS unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für Knochen (vgl. Anhang 3, Tab. VI-VIII).

Während der Median der Gesamtsumme der Tetracycline vor der Trocknung (12,0 mg/kg) einen ähnlichen Wert wie nach der Trocknung (12,8 mg) aufwies, variierten die Mediane für die einzelnen Tetracyclin-Derivate teilweise deutlich: Die Summe von TC und E-TC zeigte nach der Trocknung eine Zunahme von 3,74 mg/kg auf 5,56 mg/kg; dagegen wurde die Summe von CTC und E-CTC von 7,04 mg/kg durch den Trocknungsprozess auf 4,96 mg/kg reduziert. Die Mediane für den Gehalt an OTC in den Knochen zeigten mit 0,24 mg/kg bzw. 0,30 mg/kg nur geringe Unterschiede. ATC und E-ATC nahmen durch die Trocknung im Medianwert von 1,32 auf 0,83 mg/kg ab.

Tab. 11: Vergleich der Tetracyclin-Gehalte der Knochen vor und nach Trocknung (Angaben in mg/kg, berechnet auf 100 % TS unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten).

		<b>Median</b>	<b>25. Pztl.</b>	<b>75. Pztl.</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>OTC</b>	<b>frisch</b>	<b>0,24</b>	0,11	0,50	0,00	0,69
	<b>getrocknet</b>	<b>0,30</b>	0,23	0,87	0,12	1,77
<b>Summe E-TC +TC</b>	<b>frisch</b>	<b>3,74</b>	3,43	5,28	3,07	8,20
	<b>getrocknet</b>	<b>5,56</b>	5,09	7,81	4,50	8,23
<b>Summe E-CTC +CTC</b>	<b>frisch</b>	<b>7,04</b>	4,97	9,88	3,33	11,0
	<b>getrocknet</b>	<b>4,96</b>	3,96	7,44	2,13	10,0
<b>Summe E-ATC + ATC</b>	<b>frisch</b>	<b>1,32</b>	1,05	1,59	0,59	1,68
	<b>getrocknet</b>	<b>0,83</b>	0,77	1,05	0,48	1,50
<b>Gesamtsumme</b>	<b>frisch</b>	<b>12,0</b>	9,60	17,0	8,54	19,0
	<b>getrocknet</b>	<b>12,8</b>	10,9	15,0	9,63	19,1

#### 4.5 Ergebnisse der HPLC-Untersuchung der Enzymlösung aus der enzymatischen Behandlung der Knochen

In der Enzymlösung aus der Behandlung der Knochen konnten keine Rückstände von Tetracyclinen nachgewiesen werden.

#### 4.6 Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Abwassers aus der Entfettung der Knochen

In dem Abwasser aus dem Entfettungsprozess der Knochen konnten keine Rückstände von Tetracyclinen nachgewiesen werden.

## 4.7 Ergebnisse der Untersuchungen der Salzsäure und der Schwefelsäure aus der Mazeration

### 4.7.1 Bestimmung von Volumen, pH-Wert und Dichte

Die Messungen von Volumen, pH-Wert und Dichte wurden jeweils direkt nach der Trennung der Säure von dem Ossein durchgeführt. Eine Übersicht über die Mittelwerte liefert Tabelle 12 (vgl. Anhang 4, Tab. X – XII):

Tab. 12: Volumen, pH-Werte und Dichte der Säure aus der Mazeration

Säure	Volumen [ml]	pH	Dichte [g/ml]
HCl 1. Tag	750	2,22	1,105
HCl 2. Tag	1000	1,53	1,130
HCl 3. Tag	1000	0,95	1,116
HCl 4. Tag	1000	0,51	1,076
HCl 5. Tag	1000	0,00	1,050
HCl 6. Tag	1000	0,00	1,034
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7. Tag	1000	0,55	1,005

#### 4.7.1.1 Volumen

Nach dem 1. Tag der Mazeration betrug das Volumen der Salzsäure, die zu Beginn mit einem Volumen von 1000 ml zu den Knochen gegeben wurde, durchschnittlich 750 ml, da die getrockneten Knochen die Flüssigkeit teilweise aufgenommen hatten. An den folgenden Tagen der Mazeration entsprach das Volumen der zugeführten Säure (1000 ml) jeweils auch dem ermittelten Volumen der mit Mineralsalzen angereicherten Säure.



#### 4.7.1.2 pH-Werte

Die täglich frisch zugeführte, 6 %ige Salzsäure wies einen pH-Wert von 0 auf. Während der ersten vier Tage der Mazeration wurde eine Erhöhung des pH-Wertes festgestellt; nach dem 5. und 6. Tag entsprachen die pH-Werte jeweils dem Wert der frisch zugeführten Salzsäure. Während der 7 h dauernden Behandlung der Knochen mit 0,18 N Schwefelsäure, die einen pH-Wert von 0,55 aufwies, kam es zu keiner Erhöhung des pH-Wertes. Einen Überblick über die pH-Werte liefert Abbildung 8:

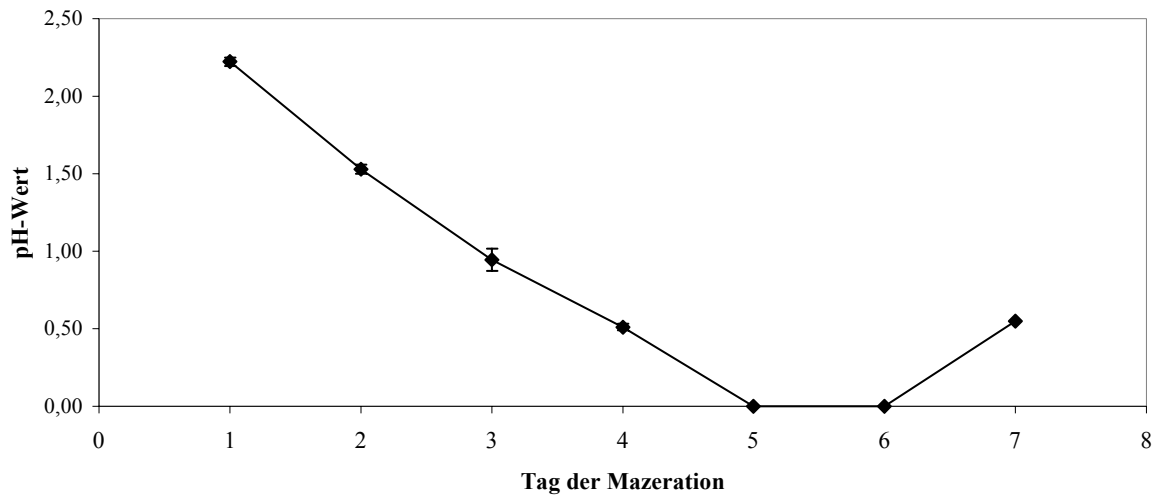


Abb. 8: Mittlere pH-Werte der Säurelösungen während der Mazeration (MW  $\pm$  SD)

### 4.7.1.3 Dichte

Während der Mazeration kam es zu einer Entmineralisierung der Knochen und damit zu einer Erhöhung der Dichte der Säurelösungen. Die Salzsäure nach dem 2. Tag der Mazeration wies mit 1,130 g/ml die höchste mittlere Dichte auf. Nach dem 6. Tag der Mazeration betrug die mittlere Dichte der Salzsäure 1,034 g/ml und entsprach mit diesem Wert annähernd der Dichte einer frischen 6 %igen Salzsäure (1,030 g/ml). Die Schwefelsäure wies nach einer Einwirkungszeit von 7 h auf die Knochen eine mittlere Dichte von 1,005 g/ml auf und unterschied sich mit diesem Wert nicht von der ursprünglichen Dichte vor der Knochenbehandlung. Einen Überblick über den Verlauf der Dichte der Säurelösungen liefert Abbildung 9:

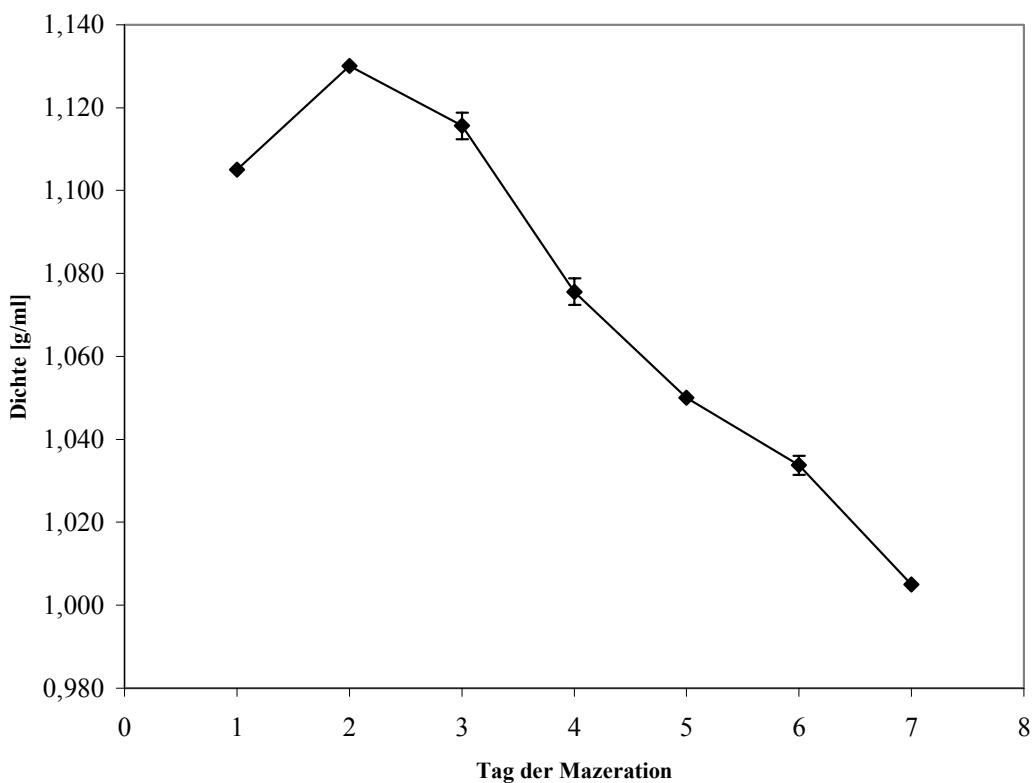


Abb. 9: Mittlere Dichte der Säurelösungen während der Mazeration (Angaben in g/ml; MW  $\pm$  SD)

#### 4.7.2 Ergebnisse der HPLC-Untersuchung auf Rückstände von Tetracyclinen

Die graphische Darstellung der ermittelten Daten erfolgte in Form von Box Whisker Plots. Der grau unterlegte Kasten (die „Box“) umfasst den Wertebereich, in dem sich jeweils 50 % der Daten aus der betreffenden Datengruppe (n=8) befinden. Dieser Bereich wird nach oben durch das 75. Perzentil begrenzt, während das 25. Perzentil die untere Grenze der Box bestimmt. Der horizontale schwarze Balken in dem Kasten beschreibt jeweils die Lage des Median (Zentralwert) innerhalb der Datengruppe. An den Endpunkten der beiden Linien, die eine Verlängerung der Box nach oben und nach unten darstellen, lassen sich außerdem das Maximum und das Minimum der Datengruppe ablesen.

Die Berechnung der ermittelten Werte erfolgte unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten und des Säurevolumens (vgl. Anhang 5, Tab. XIII-XXVI).

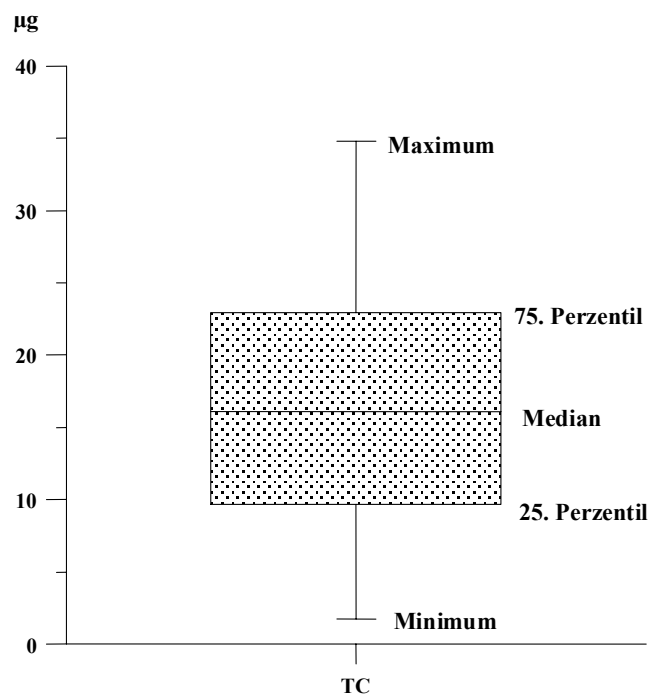


Abb. 10: Beispiel für den Aufbau eines Box Whisker Plots

#### 4.7.2.1 Absolute Tetracyclin-Gehalte

##### Salzsäure aus dem 1. Tag der Mazeration

In der Salzsäure aus dem ersten Tag der Mazeration konnten sowohl Oxytetracyclin als auch Tetracyclin, Chlortetracyclin und Anhydrotetracyclin mit ihrem jeweiligen Epimer nachgewiesen werden. Tetracyclin und Chlortetracyclin wurden in etwa doppelt so hohen Konzentrationen nachgewiesen wie ihr 4-Epimer; so betrug der mittlere Wert für Chlortetracyclin 303  $\mu\text{g}/750\text{ ml}$  und für 4-Epi-Chlortetracyclin 157  $\mu\text{g}/750\text{ ml}$ . Mit dem Verhältnis 2:1 dominierte Tetracyclin außerdem über Anhydrotetracyclin (351  $\mu\text{g}/750\text{ ml}$  bzw. 180  $\mu\text{g}/750\text{ ml}$ ).

Der mittlere Gesamtgehalt aller Tetracycline betrug 1,21 mg/750 ml (vgl. Anhang 5, Tab. XIII).

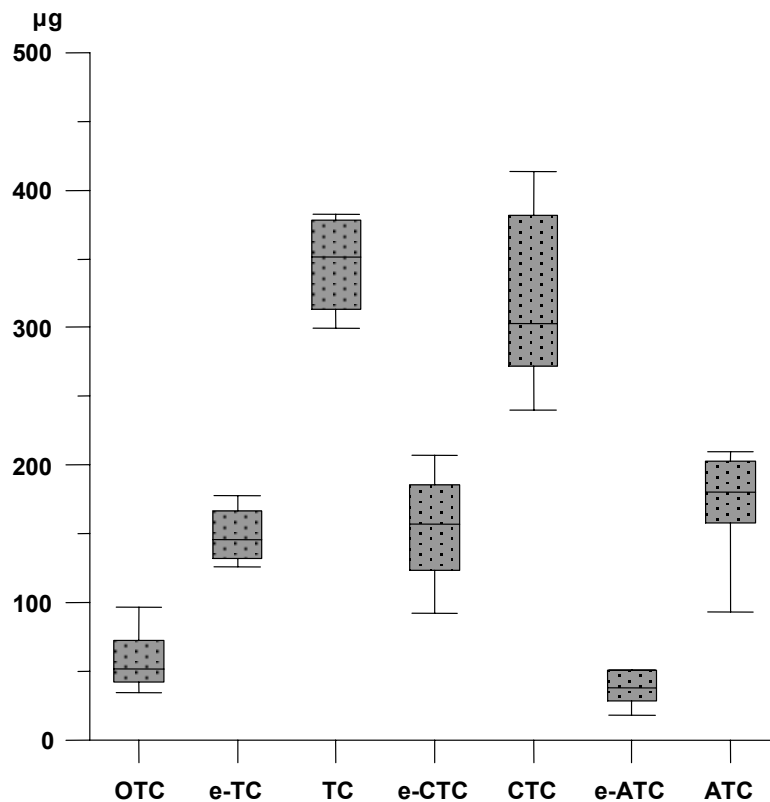
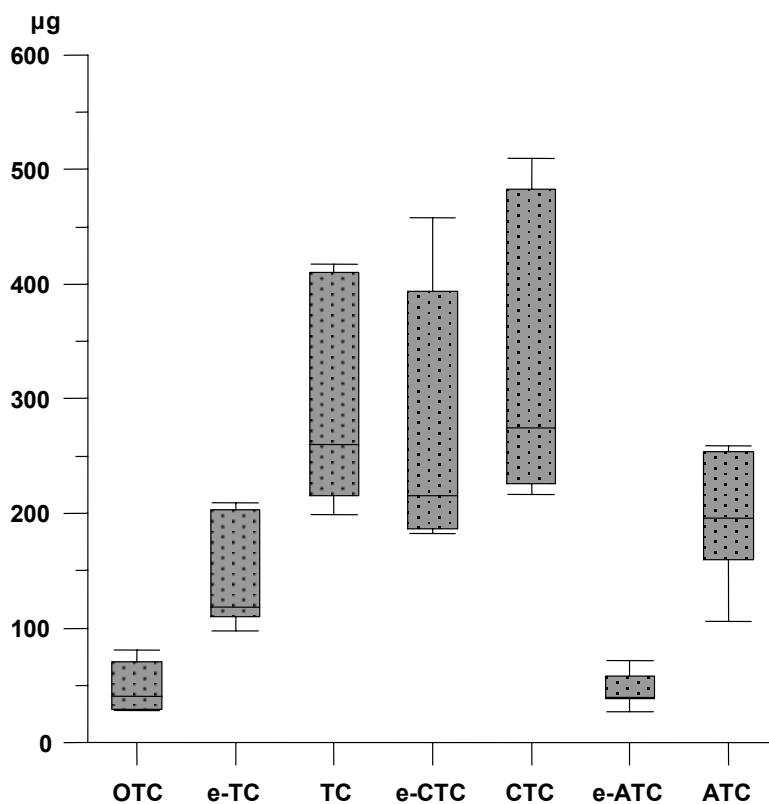


Abb. 11: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 1. Tag der Mazeration (Angaben in  $\mu\text{g}/750\text{ ml}$  unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

Salzsäure aus dem 2. Tag der Mazeration

Auch am zweiten Tag der Mazeration konnten sowohl Oxytetracyclin als auch Tetracyclin, Anhydrotetracyclin und Chlortetracyclin mit ihrem jeweiligen Epimer in der Säure nachgewiesen werden.

Der Gesamtgehalt aller Tetracycline betrug 1,12 mg/l (vgl. Anhang 5, Tab. XIV).



**Abb. 12: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 2. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)**

Salzsäure aus dem 3. Tag der Mazeration

Während sich am dritten Tag der Mazeration Oxytetracyclin sowie Tetracyclin und 4-Epimer in ähnlicher Konzentration wie am Vortag nachweisen ließen, konnte eine Verdopplung der mittleren Gehalte an Anhydrotetracyclin und seinem Epimer im Vergleich zum zweiten Tag mit 378  $\mu\text{g/l}$  (ATC) bzw. 86,9  $\mu\text{g/l}$  (E-ATC) beobachtet werden. Gegenüber dem Vortag erhöhte sich auch der mittlere Gehalt an Chlortetracyclin und 4-Epimer mit insgesamt 676  $\mu\text{g/l}$  um ca. 38 %.

Der mittlere Gesamtgehalt der Tetracycline betrug 1,59 mg/l (vgl. Anhang 5, Tab. XV).

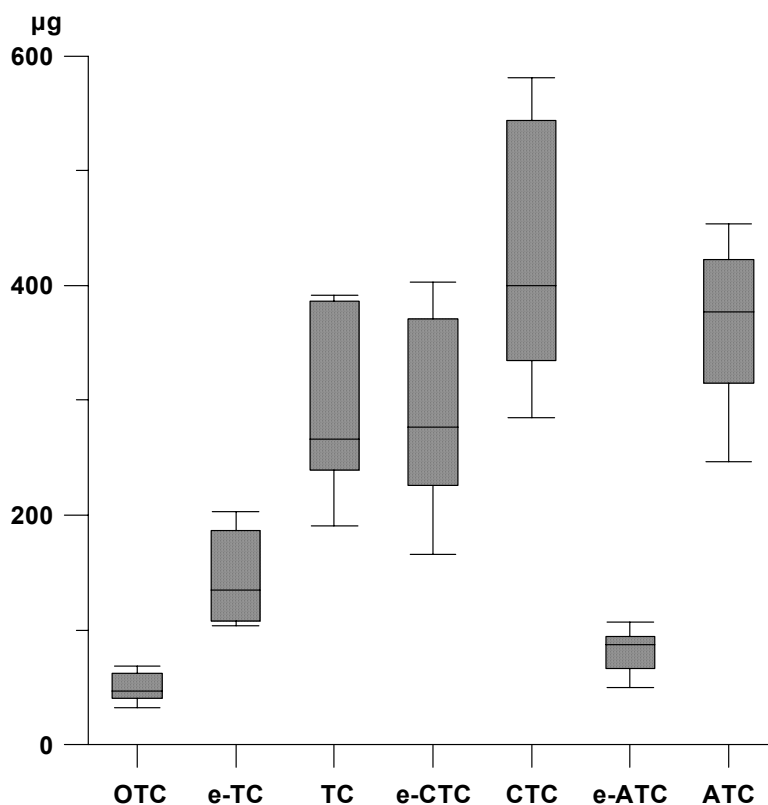
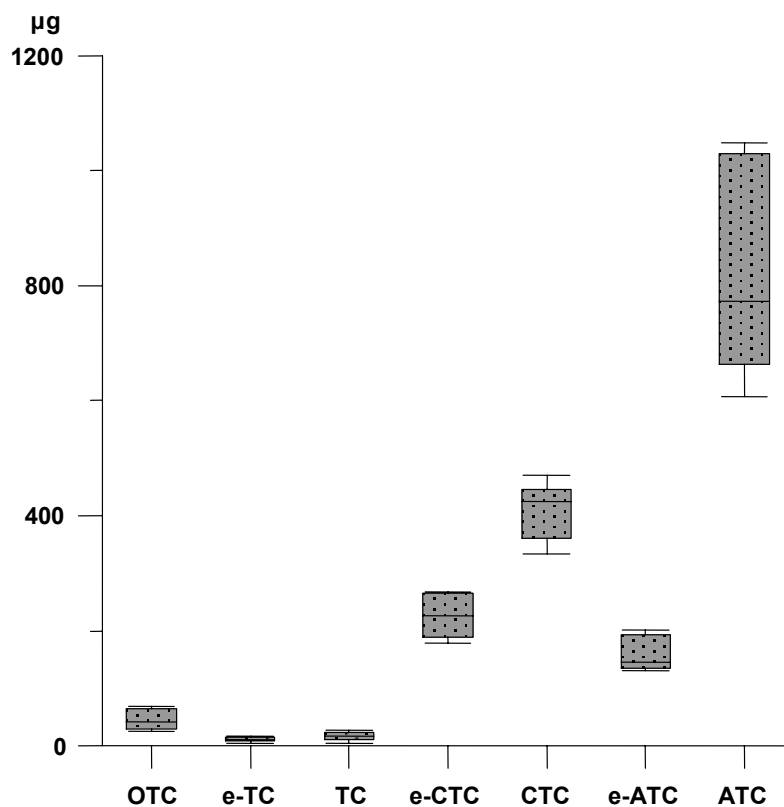


Abb. 13: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 3. Tag der Mazeration (Angaben in  $\mu\text{g/l}$  unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

Salzsäure aus dem 4. Tag der Mazeration

Am vierten Tag der Mazeration war die Veränderung der Anhydrotetracyclin-Konzentrationen besonders auffällig: Es kam gegenüber dem Vortag mit 917 µg/l zu einer Verdopplung des mittleren Gehaltes. Im Gegensatz dazu konnte TC mit seinem 4-Epimer nur noch in geringer Konzentration (17,0 µg/l und 11,3 µg/l) nachgewiesen werden. Oxytetracyclin löste sich am vierten Tag mit 42,1 µg/l in ähnlicher Konzentration aus den Knochen wie in den ersten drei Tagen. Auch die Summe der mittleren Gehalte von Chlortetracyclin und 4-Epimer unterschied sich mit 649 µg/l nicht wesentlich von der des Vortages (676 µg/l). Die mittlere Gesamtmenge aller Tetracycline betrug 1,61 mg/l (vgl. Anhang 5, Tab. XVI).

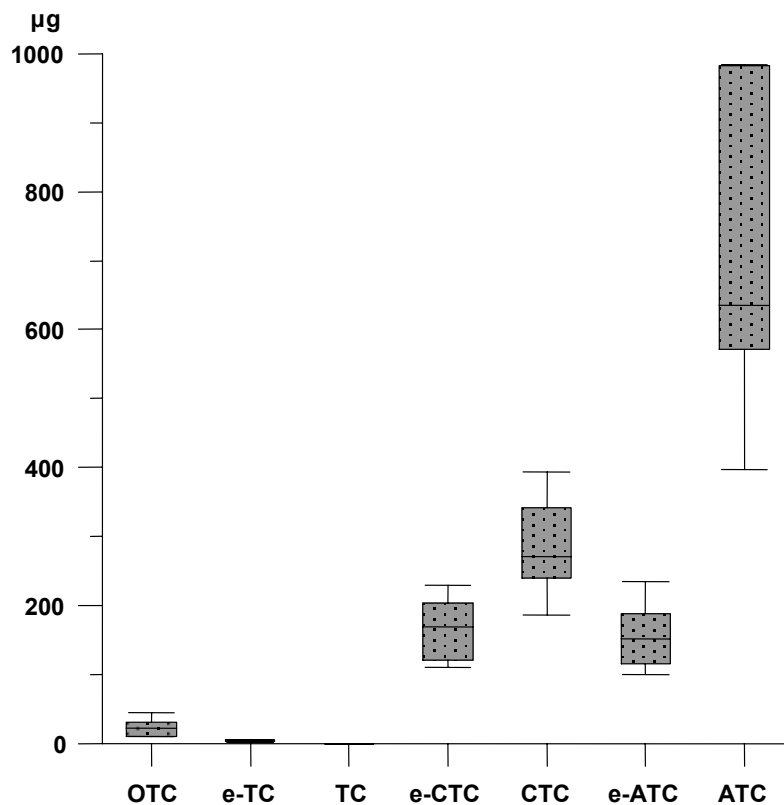


**Abb. 14: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 4. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)**

Salzsäure aus dem 5. Tag der Mazeration

Am fünften Tag der Mazeration konnte in der Säure kein Tetracyclin mehr nachgewiesen werden; lediglich das 4-Epimer war mit der geringen Konzentration von 3,8 µg/l vorhanden. Die Menge des nachgewiesenen Oxytetracyclins wurde gegenüber dem Vortag auf die Hälfte reduziert (22,1 µg/l). Den größten Anteil an der Gesamtmenge der Tetracycline zeigten Anhydrotetracyclin und sein Epimer mit 788 µg/l. Chlortetracyclin und das dazugehörige Epimer konnten in der Konzentration von insgesamt 441 µg/l nachgewiesen werden.

Die mittlere Gesamtmenge aller Tetracycline betrug 1,24 mg/l (vgl. Anhang 5, Tab.XVII).



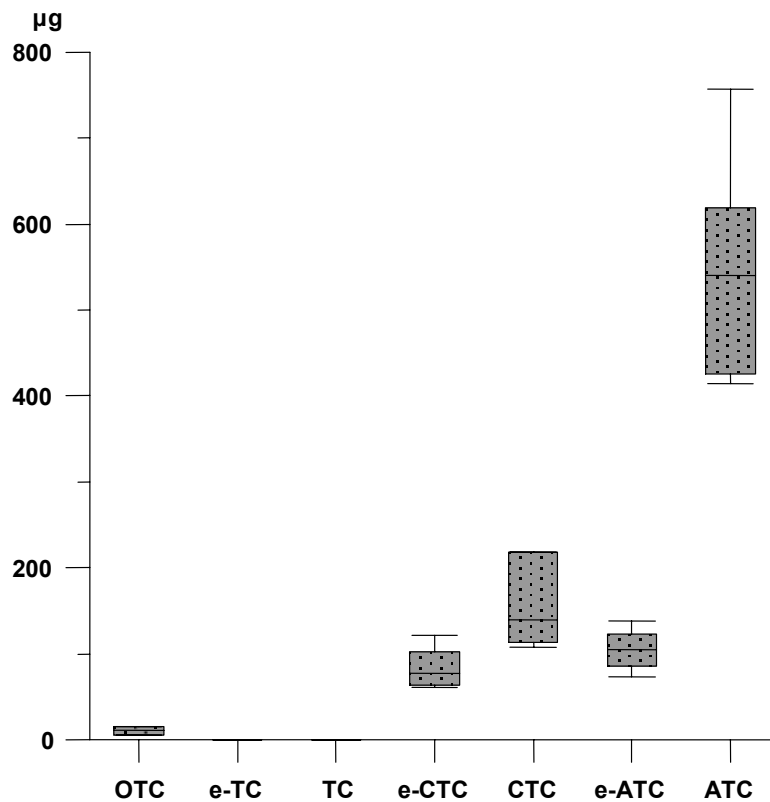
**Abb. 15: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 5. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)**



Salzsäure aus dem 6. Tag der Mazeration

Am sechsten Tag der Mazeration, an dem die Knochen der letzten Behandlung mit Salzsäure unterzogen wurden, konnten weder Tetracyclin noch das Epimer in der Säure nachgewiesen werden. Anhydrotetracyclin und das Epimer wurden als Summe mit einem Gehalt von 644  $\mu\text{g/l}$  bestimmt. Die Summe von Chlortetracyclin und Epimer betrug mit 217  $\mu\text{g/l}$  etwa die Hälfte des am fünften Tag nachgewiesenen Gehaltes (441  $\mu\text{g/l}$ ). Auch der erfasste Gehalt von Oxytetracyclin betrug ca. 50 % des am Vortag bestimmten Wertes.

Der mittlere Gesamtgehalt aller Tetracycline betrug 0,87 mg/l (vgl. Anhang 5, Tab. XVIII).



**Abb. 16: Tetracyclin-Gehalte aus dem 6. Tag der Mazeration (Angaben in  $\mu\text{g/l}$  unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)**

Schwefelsäure aus dem 7. Tag der Mazeration

Am siebten Tag der Mazeration wurden die Knochen für 7 h mit Schwefelsäure behandelt. In dieser Säure konnten Anhydrotetracyclin und das Epimer in der Menge von 403 µg/l nachgewiesen werden. Chlortetracyclin und das Epimer wurden mit einem Gehalt von 103 µg/l bestimmt. Außerdem konnten Spuren von Oxytetracyclin gefunden werden (3,1 µg/l).

Der mittlere Gesamtgehalt aller Tetracycline betrug 0,52 mg/l (vgl. Anhang 5, Tab. XIX).

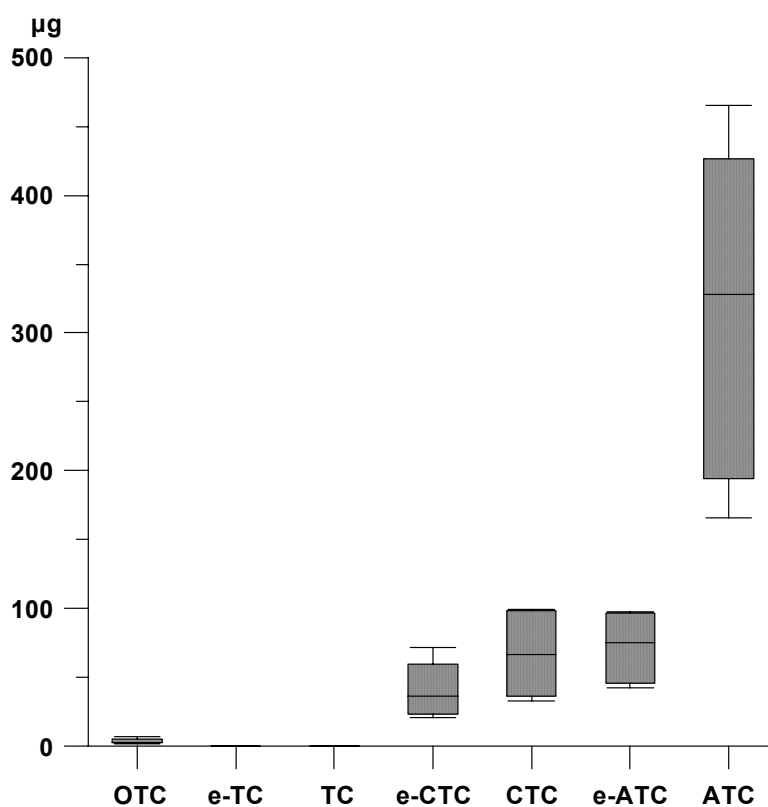
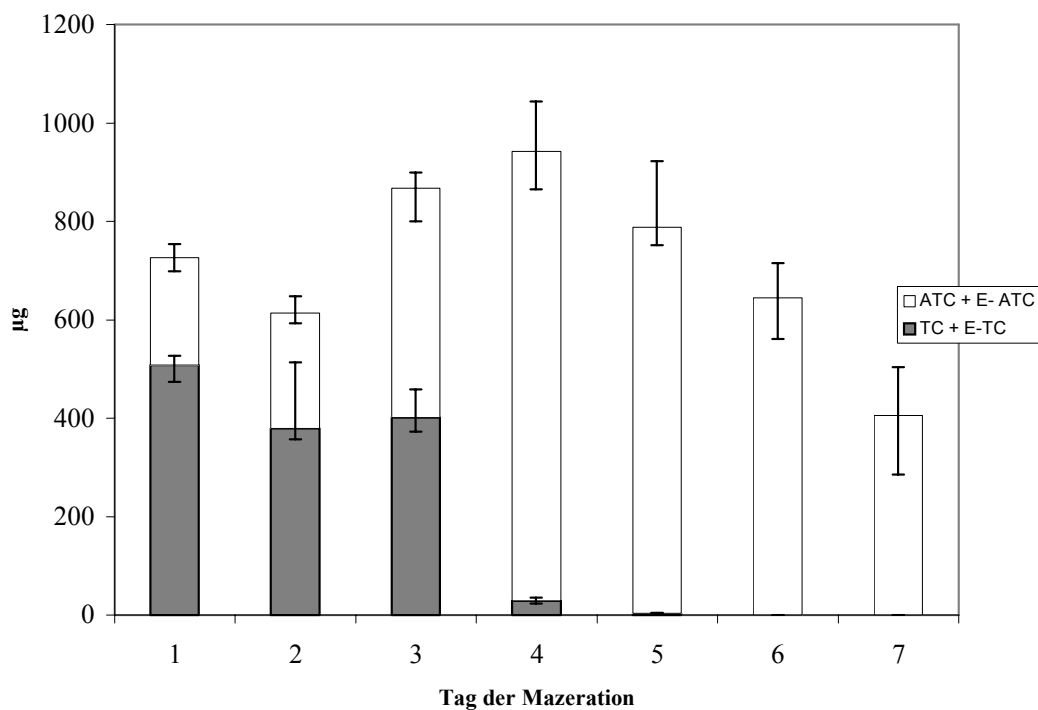


Abb. 17: Tetracyclin-Gehalte in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aus dem 7. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

### Vergleich der mittleren Gehalte von Tetracyclin und Anhydrotetracyclin in HCl und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Verlauf der Mazeration

Während sich Tetracyclin nur bis zum 5. Tag der Mazeration in der Säure nachweisen ließ, konnte Anhydrotetracyclin über den gesamten Zeitraum der Mazeration nachgewiesen werden. Am 1. Tag dominierte Tetracyclin mit einem mittleren Gehalt von 508 µg/750 ml deutlich über Anhydrotetracyclin (mittlerer Gehalt 219 µg/750 ml). Im Verlauf der Mazeration fand die Verschiebung dieses Mengenverhältnisses in Richtung des Anhydrotetracyclins statt; am 4. Tag der Mazeration wurde Anhydrotetracyclin mit einem mittleren Gehalt von 914 µg/l nachgewiesen, während der mittlere Gehalt von Tetracyclin nur 28,1 µg/l betrug. Am 4. Tag der Mazeration wurde gleichzeitig die höchste Gesamtsumme von TC und ATC sowie ihrer Epimere festgestellt.



**Abb. 18:** Vergleich der mittleren Gehalte (Median  $\pm$  25./75. Pztl.) von TC und ATC in HCl und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Verlauf der Mazeration (Angaben in µg/750 ml am 1. Tag und in µg/l am 2. - 7. Tag unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

#### 4.7.2.2 Prozentualer Verlauf der Freisetzung der einzelnen Tetracycline in die Säure während der Mazeration

##### Oxytetracyclin (OTC)

Während der ersten vier Tage der Mazeration wurde Oxytetracyclin kontinuierlich jeweils in einer Menge zwischen 18,7 % und 22,6 % des Gesamtgehaltes freigesetzt. Am fünften Tag fanden sich noch 8,42 % in der Säure. Oxytetracyclin konnte mit 1,48 % des Gesamtgehaltes in der Schwefelsäure bis zum letzten Tag der Mazeration nachgewiesen werden (vgl. Anhang 5, Tab. XX).

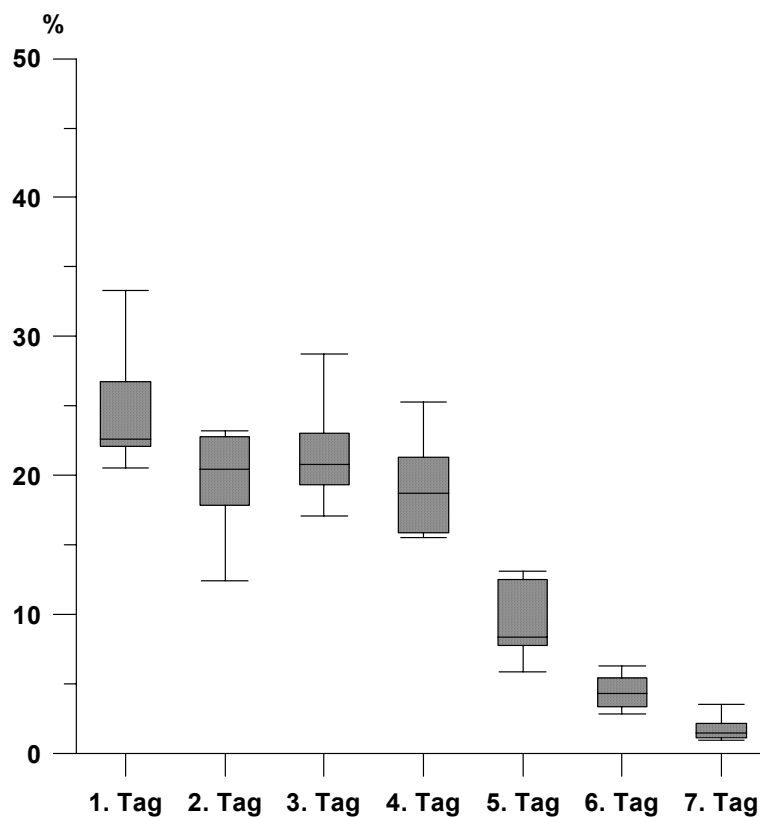


Abb. 19: Freisetzung von OTC während der Mazeration (Angaben in %)

Tetracyclin und 4-Epi-Tetracyclin (TC + E-TC)

Tetracyclin und das Epimer konnten nur bis zum fünften Tag der Mazeration in der Säure nachgewiesen werden. Die Freisetzung der größte Menge des Gesamtgehaltes erfolgte innerhalb der ersten drei Mazerationstage, beginnend mit 37 % am ersten Tag in absteigender Konzentration. Am vierten Tag konnten 1,85 % der Gesamtmenge gefunden werden, und am fünften Tag konnte nur noch der geringe Anteil von 0,29 % bestimmt werden, wobei dieser Restanteil nur 4-Epi-Tetracyclin enthielt (vgl. Anhang 5, Tab. XXI + XXII).

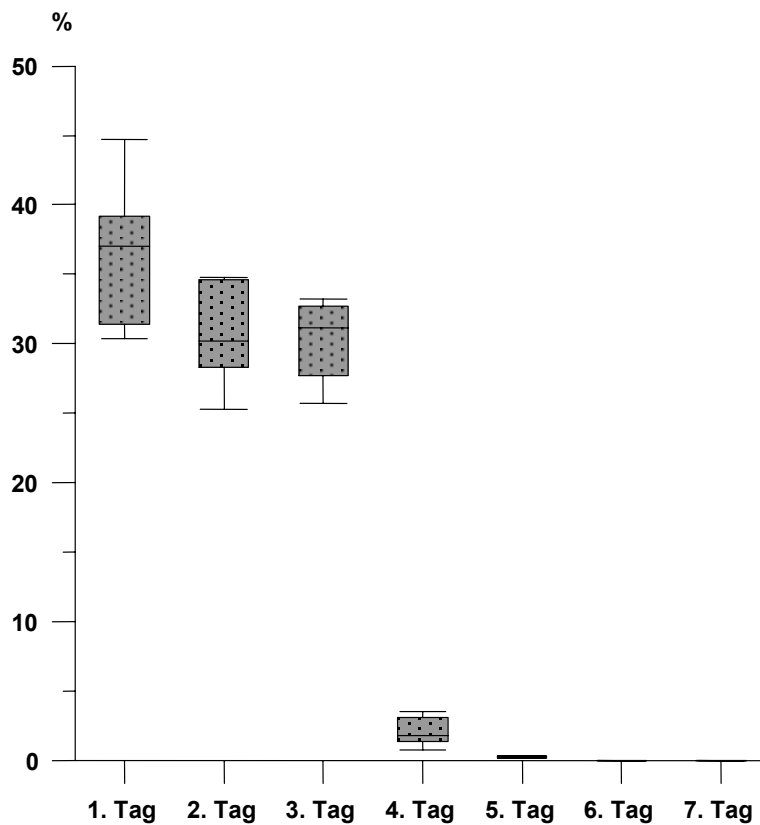


Abb. 20: Freisetzung von TC und Epimer während der Mazeration (Angaben in %)

Anhydrotetracyclin und 4-Epi-Anhydrotetracyclin (ATC + E-ATC)

Die prozentualen täglichen Anteile der Gesamtmenge von Anhydrotetracyclin und Epimer stiegen vom ersten bis zum vierten Tag kontinuierlich von 5,59 % auf 26,2 % an. Ab dem fünften Tag der Mazeration nahm die Freisetzung mit 22,1 % wieder ab. Anhydrotetracyclin und das Epimer konnten über den gesamten Zeitraum der Mazeration in der Säure nachgewiesen werden; am letzten Tag wurden noch 10,5 % der erfassten Gesamtmenge aus den Knochen freigesetzt (vgl. Anhang 5, Tab. XXIII + XXIV).

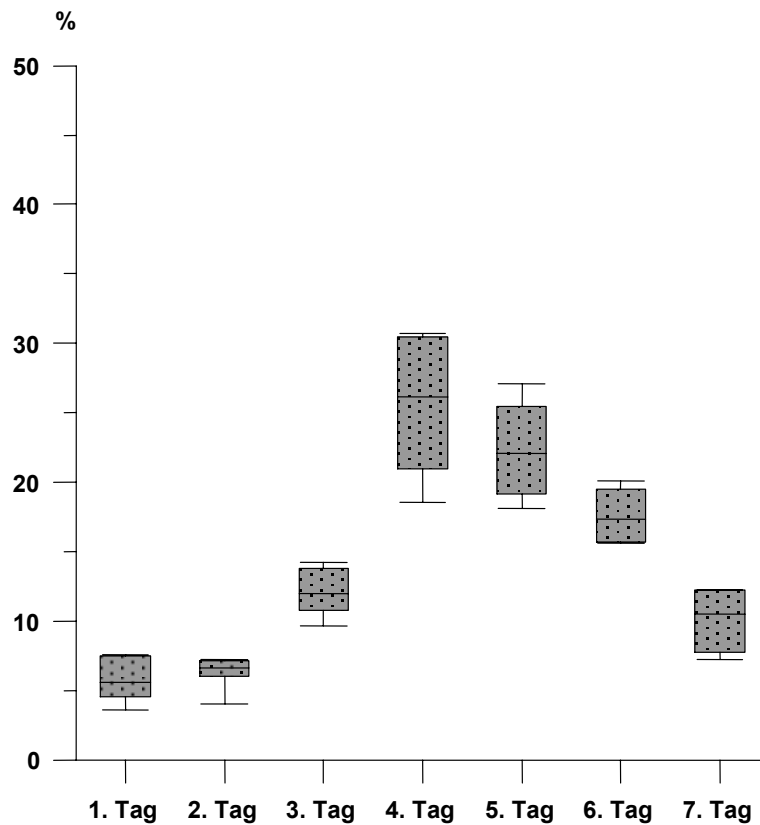
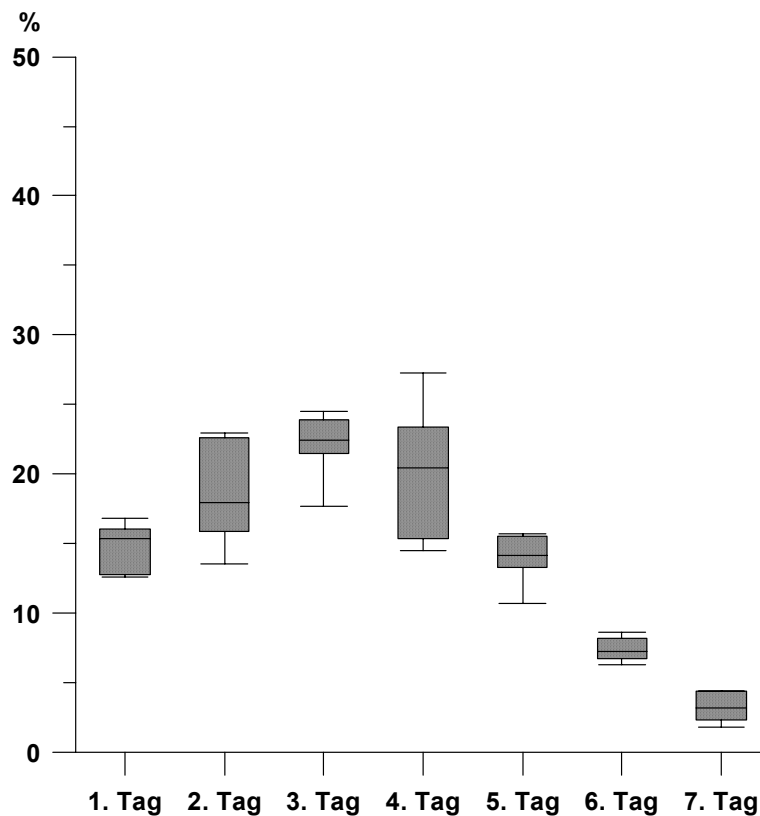


Abb. 21: Freisetzung von ATC und Epimer während der Mazeration (Angaben in %)

Chlortetracyclin und 4-Epi-Chlortetracyclin (CTC + E-CTC)

Am ersten Tag der Mazeration wurden von der erfassten Gesamtmenge des Chlortetracyclins und seinem Epimer 15,3 % nachgewiesen. Am zweiten und dritten Tag konnte mit 17,9 % und 22,4 % jeweils eine Steigerung der täglichen prozentualen Freisetzung beobachtet werden. Am vierten Tag wurden 20,5 % in der Säure bestimmt. Auch Chlortetracyclin konnte mit seinem Epimer über den gesamten Zeitraum der Mazeration nachgewiesen werden, wobei sich der geringste Gehalt mit 3,2 % in der Schwefelsäure befand (vgl. Anhang 5, Tab. XXV + XXVI).



**Abb. 22: Freisetzung von CTC und Epimer während der Mazeration (Angaben in %)**

#### 4.8 Vergleich der Tetracyclin-Gehalte von Knochen und Säure

Verglichen wurden die absoluten Gehalte der Tetracycline in den getrockneten Knochen (mg/750 g) vor der Mazeration mit der Summe der absoluten Gehalte in der Säure (mg/6,75 l) nach der Mazeration. In Tabelle 13 sind die wichtigen Kennzahlen zu den jeweiligen Daten-  
gruppen aufgeführt; im folgenden Text wird nur auf den Median der unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten ermittelten Daten Bezug genommen (vgl. Anhang 5, Tab.XIII-XIX und Anhang 6, Tab. XXVII).

Von der in den Knochen nachgewiesenen Menge an Oxytetracyclin (0,41 mg) konnte nur etwa die Hälfte (0,22 mg) in der Säure gefunden werden. Auch Chlortetracyclin und das 4-Epimer wurden in der Säure in einer geringeren Konzentration (2,91 mg) nachgewiesen als ursprünglich in den Knochen (3,63 mg).

Interessant ist das Verhältnis Tetracyclin/Anhydrotetracyclin in Knochen und Säure: In den getrockneten Knochen konnten Tetracyclin und sein Epimer in einer Menge von 4,44 mg nachgewiesen werden; davon fanden sich in der Säure lediglich 29,5 %. Umgekehrt konnte im Hinblick auf Anhydrotetracyclin und sein Epimer eine deutliche Zunahme der Konzentration in der Säure beobachtet werden: Während in den Knochen nur insgesamt 0,58 mg gefunden werden konnten, betrug der Gehalt in der Säure insgesamt 3,80 mg, was eine Zunahme von 655 % bedeutet. Betrachtet man im Vergleich jedoch die Gesamtgehalte der Tetracycline und Anhydrotetracycline in Knochen und Säure, so sind die Werte annähernd gleich (5,17 mg in Knochen und 5,08 mg in Säure).

Die Gesamtsumme der in der Säure nachgewiesenen Tetracycline weist mit 8,16 mg einen niedrigeren Wert auf als die in den getrockneten Knochen nachgewiesene Gesamtsumme (9,89 mg).



**Tab. 13: Tetracyclin-Gehalte in Knochen vor der Mazeration und in der Säure nach der Mazeration (Angaben in mg/750 g Knochen und in mg/6,75 l Säure unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)**

		<b>Median</b>	<b>25. Pztl.</b>	<b>75. Pztl.</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>OTC</b>	<b>Knochen</b>	<b>0,41</b>	0,17	0,72	0,09	1,26
	<b>Säure</b>	<b>0,22</b>	0,19	0,29	0,14	0,35
<hr/>						
<b>Summe E-TC +TC</b>	<b>Knochen</b>	<b>4,44</b>	3,73	5,79	3,05	5,91
	<b>Säure</b>	<b>1,29</b>	1,22	1,53	1,15	1,79
<hr/>						
<b>Summe E-CTC +CTC</b>	<b>Knochen</b>	<b>3,63</b>	2,69	5,89	1,45	7,15
	<b>Säure</b>	<b>2,91</b>	2,78	3,90	2,55	4,21
<hr/>						
<b>Summe E-ATC + ATC</b>	<b>Knochen</b>	<b>0,58</b>	0,50	0,61	0,34	0,92
	<b>Säure</b>	<b>3,80</b>	3,20	4,24	2,73	4,59
<hr/>						
<b>Summe TC/ATC + Epimere</b>	<b>Knochen</b>	<b>5,17</b>	4,10	6,37	3,66	6,51
	<b>Säure</b>	<b>5,08</b>	4,40	5,77	3,88	6,39
<hr/>						
<b>Gesamtsumme</b>	<b>Knochen</b>	<b>9,89</b>	7,65	11,5	6,55	13,6
	<b>Säure</b>	<b>8,16</b>	7,49	9,91	6,84	10,9

#### **4.9 Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Osseins**

In den Osseinproben konnten nach Abschluss der Mazeration keine Rückstände von Tetracyclinen mehr nachgewiesen werden.

## 4.10 Ergebnisse der Untersuchungen des Endproduktes Gelatine

### 4.10.1 Ergebnisse der sensorischen Untersuchung

Die Gelatine aus allen vier Extraktionen gelierte gut und war nach der Lagerung über Nacht bei 7° C zu einem festen Gel geworden. Unmittelbar nach der Extraktion waren in der Gelatine noch vereinzelt Restbestandteile des Osseins vorhanden, die aber durch den Prozess der Filtration entfernt wurden. Der Geruch der Gelatine war produktspezifisch und unauffällig.

#### 4.10.1.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchung

Es wurden jeweils zwei Stichproben der Gelatine pro Extraktion untersucht.

Die Gelatineproben aus der ersten Extraktion wiesen einen mittleren Trockensubstanzgehalt von 1,44 % auf. Die zweite bis vierte Extraktion ergaben als Endprodukt eine Gelatine mit einem mittleren Trockensubstanzgehalt von ca. 5 %.

**Tab. 14: Trockensubstanzgehalt der Gelatine (Angaben in %)**

Probe	Trockensubstanz
Gelatine	1,42
1. Extraktion	1,45
Gelatine	4,92
2. Extraktion	5,06
Gelatine	4,91
3. Extraktion	5,12
Gelatine	5,04
4. Extraktion	5,20

Der Anteil von Bindegewebeisweiß am Gesamteisweiß in den Gelatineproben betrug überwiegend 100 %. Die Gelatine enthielt keine Spuren von Fett und Asche.

**Tab. 15: Chemische Parameter der Gelatine, berechnet auf 100 % TS (Angaben in %)**

Probe	Asche	Gesamtfett	Gesamteiweiß	Bindegewebseiweiß
Gelatine	0,00	0,00	91,6	91,6
1. Extraktion	0,00	0,00	93,1	91,7
Gelatine	0,00	0,00	97,6	97,6
2. Extraktion	0,00	0,00	90,9	90,9
Gelatine	0,00	0,00	97,8	97,8
3. Extraktion	0,00	0,00	93,8	93,8
Gelatine	0,00	0,00	97,2	97,2
4. Extraktion	0,00	0,00	98,1	96,2

#### 4.10.2 Ergebnisse der HPLC-Untersuchung

Es konnten keine Rückstände von Tetracyclinen in der Gelatine nachgewiesen werden.

#### 4.11 Ergebnisse der Untersuchung von Dicalciumphosphat

Die HPLC-Untersuchung der Stichproben des Dicalciumphosphats auf Rückstände von Tetracyclinen führte zu folgenden Rohdaten :

**Tab. 16: Tetracyclin-Gehalte in Dicalciumphosphat (Probeneinwaage 10 g, Angaben in mg/10 g, ohne Berücksichtigung von Wiederfindungsraten)**

	OTC	E-TC	TC	E-ATC	ATC	E-CTC	CTC
<b>Stichprobe 1</b>	0,25	0,00	0,00	0,00	1,52	0,00	0,85
<b>Stichprobe 2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,24	0,00	0,63

## **4.12 Ergebnisse der Untersuchungen zum Ionenaustausch**

Die Berechnung der Reduktion der Tetracyclin-Gehalte in den Gelatineproben nach dem Ionenaustausch erfolgte unter Berücksichtigung der ermittelten Wiederfindungsraten für Tetracyclin und Anhydrotetracyclin in den Gelatineproben (vgl. Anhang 7, Tab. XXIX + XXX).

### **4.12.1 Kationenaustausch**

Die Entsalzung der Gelatine durch den Kationenaustausch führte zu einer mittleren Reduktion der Konzentrationen von Tetracyclin um 52,1 % und von Anhydrotetracyclin um 80,3 % in der Gelatine.

### **4.12.2 Anionenaustausch**

Die Entsalzung der Gelatine durch den Anionenaustausch führte zu einer mittleren Reduktion der Konzentrationen von Tetracyclin um 80,2 % und von Anhydrotetracyclin um 100 % in der Gelatine.

### **4.12.3 Kombiniertes Kationen- und Anionenaustausch**

Die nacheinander geschaltete Entsalzung der Gelatineproben durch den Kationen- und Anionenaustausch führte zu einer mittleren Reduktion der Konzentrationen von Tetracyclin um 97,6 % und von Anhydrotetracyclin um 100 %.

Der statistische Vergleich der einzelnen Ionenaustauschverfahren hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Reduktion von Tetracyclinrückständen in der Gelatine ergab hoch signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 17):

**Tab. 17: Statistischer Vergleich der Ionenaustauschverfahren hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Reduktion von Tetracyclin-Rückständen (Angabe des Signifikanzwertes p;  $p < 0.001$  = hoch signifikant)**

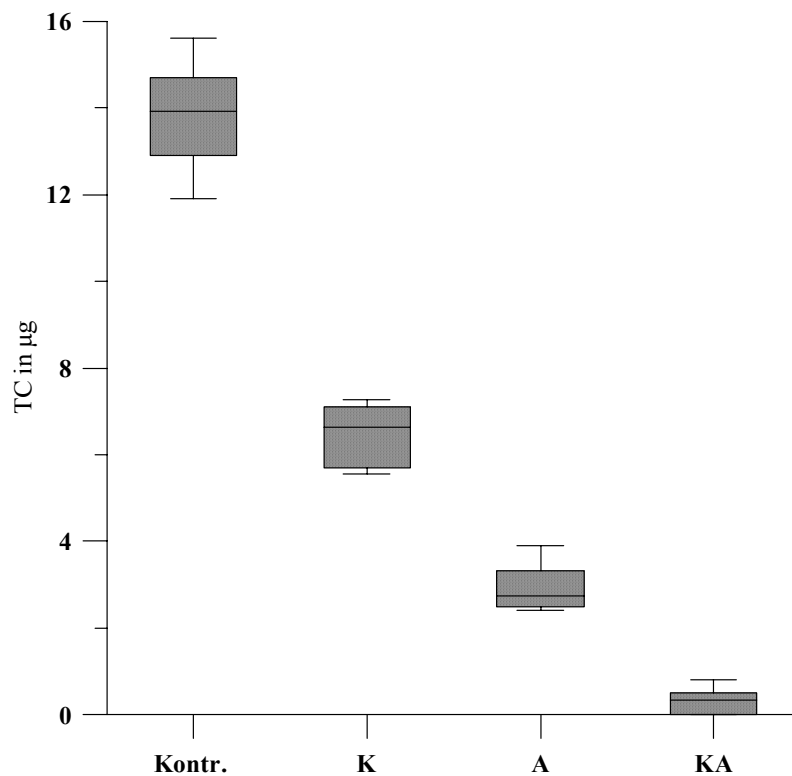
	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>KA</b>
<b>K</b>		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>A</b>	<b>&lt; 0,0001</b>		<b>&lt; 0,0001</b>
<b>KA</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	

**K** = **Kationenaustausch**

**A** = **Anionenaustausch**

**KA** = **Kationen- und Anionenaustausch**

Eine Übersicht über die Veränderung der TC- und ATC-Gehalte in den Gelatineproben durch die verschiedenen Ionenaustauschverfahren stellen die Abb. 23 und 24 dar (vgl. Anhang 7, Tab. XXIX + XXX):



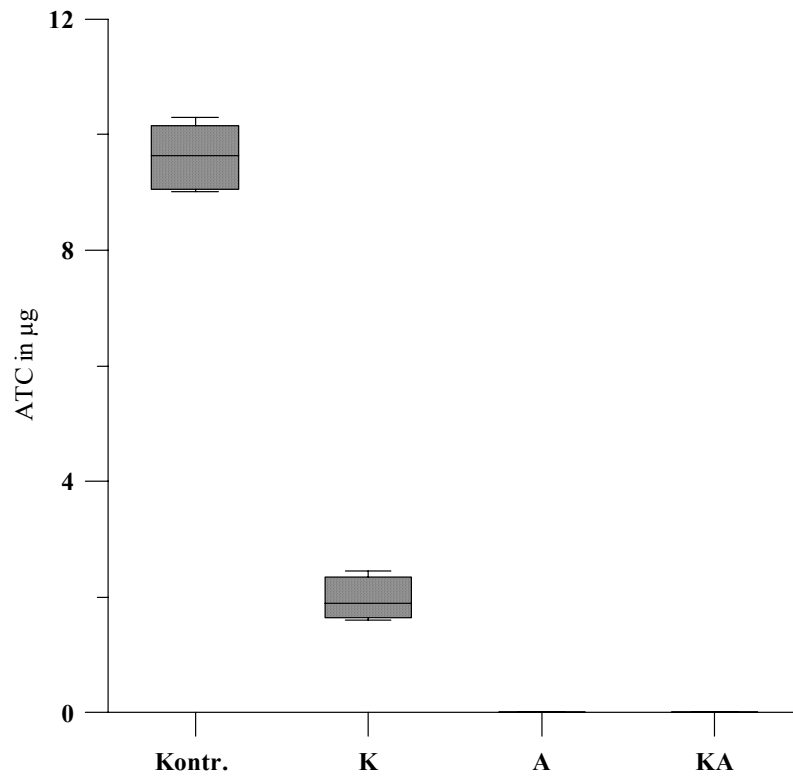
**Abb. 23: Reduktion der Tetracyclin-Gehalte in Gelatine durch verschiedene Ionenaustauschverfahren**  
(Angaben in µg/20 ml unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)

**Kontr. = Kontrolle**

**K = Kationenaustausch**

**A = Anionenaustausch**

**KA = Kationen- und Anionenaustausch**



**Abb. 24: Reduktion der Anhydrotetracyclin-Gehalte in Gelatine durch verschiedene Ionenaustauschverfahren (Angaben in µg/20 ml unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten)**

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde aus tetracyclinhaltigen Knochen tauglich beurteilten, geschlachteter Schweine eine experimentelle Gelatineherstellung nach dem sauren Aufschlussverfahren durchgeführt, wobei auf die Simulation der tatsächlichen industriellen Herstellungsbedingungen besonderer Wert gelegt wurde. Durch die Untersuchung sämtlicher Produkte, Abfälle und Abwässer während des Herstellungsprozesses sollte der Verbleib der gebundenen Rückstände von Tetracyclinen aufgezeigt werden. In einem anschließenden Versuchsaufbau wurde das von der Industrie zur Entsalzung der Gelatine durchgeführte Ionenaustauschverfahren im Labormaßstab nachgestellt und hinsichtlich seiner Eignung, Rückstände von Tetracyclinen aus Gelatine zu eliminieren, überprüft.

Die angewendeten Methoden und die erhobenen Befunde sollen im Folgenden diskutiert werden.

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### 5.1.1 Herstellung der Gelatine aus Knochen

##### Gewinnung des Rohstoffes Knochen

Als Ausgangsmaterial für die Gelatineherstellung wurden ausschließlich Knochen von tauglich beurteilten, geschlachteten Mastschweinen verwendet. Die Knochen wurden in einem norddeutschen Zerlegebetrieb mittels UV-Auflicht bei einer Wellenlänge von 366 nm auf eine positive Fluoreszenz untersucht; nur die Knochen, die eine deutlich sichtbare Fluoreszenz aufwiesen, wurden für die Gelatineherstellung ausgewählt. Der fluoreszenzoptische Nachweis stellt ein unkompliziertes und schnelles Screeningverfahren für Knochen auf gebundene Rückstände von Tetracyclinen mit einer Nachweisgrenze von 50 µg/kg dar (KÜHNE u. EBRECHT 1993).



### Zerkleinerung, Entfettung und enzymatische Behandlung der Knochen

Die Zerkleinerung der Knochen im Rahmen der Gelatineherstellung stellt einen entscheidenden Schritt für das nachfolgende Aufschlussverfahren mit Salzsäure dar, denn mit dem Zerkleinerungsgrad der Knochen wird gleichzeitig auch die Größe der Knochenoberfläche bestimmt. Die Größe der Knochenoberfläche wiederum hat entscheidenden Einfluss auf die Wirkung der Salzsäure auf die Knochen (hierzu vgl. auch die Ergebnisse unter 4.3). Während in den Untersuchungen von WEIDENBERG (2002) die verwendeten Schweineknöchen manuell mit Hilfe einer Knochensäge zerkleinert wurden, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Zerkleinerung des Ausgangsmaterials unter großtechnischen Bedingungen: In dem knochenverarbeitenden Werk eines großen deutschen Gelatineherstellers wurden die Knochen mit Hilfe eines Zweiwellenbrechers auf die industriell übliche Korngröße zerkleinert.

Die nachfolgende Heißwasser-Entfettung der Knochen erfolgte unter mehrfachem Wasserwechsel bei einer Wassertemperatur von 85 °C und regelmäßiger mechanischer Durchwirbelung des Knochenmaterials zur Förderung des Entfettungsprozesses. In der Industrie wird die Entfettung unter gleichen Bedingungen durchgeführt, zusätzlich wird jedoch eine Pressentfettung vorgenommen, auf die im Rahmen der experimentellen Gelatineherstellung aufgrund der fehlenden Einrichtungen im Labor verzichtet werden musste. Die entfetteten Knochen wurden durch eine enzymatische Behandlung vom Periost sowie von eventuell noch anhaftenden Resten von Muskulatur und Sehnenansätzen befreit; dieser Schritt wird gleichermaßen von der Gelatineindustrie durchgeführt, von der das benötigte Enzym Alkalase zur Verfügung gestellt wurde.

In den Untersuchungen von WEIDENBERG (2002) wurde sowohl auf die Entfettung der Knochen, als auch auf die anschließende Enzymbehandlung verzichtet.

### Trocknung der Knochen

In der Industrie werden die zerkleinerten Knochen in einem Heißluftstrom auf eine Restfeuchte von ca. 5-10 % getrocknet. In den eigenen Versuchen wurde die Trocknung im Heißluftstrom durch die 8 h umfassende Trocknung bei 60 °C im Trockenschrank ersetzt; die Knochen wiesen nach diesem Trocknungsprozess eine Restfeuchte von im Mittel 10,6 % auf. Eine Trocknung des Knochenschrotes wurde im Rahmen der experimentellen Gelatineherstellung von WEIDENBERG (2002) nicht durchgeführt.

### Mazeration

In der deutschen Gelatineindustrie wird die Entmineralisierung der Knochen (Mazeration) mit 6 %iger HCl und täglichem Säurewechsel über einen Zeitraum von sechs Tagen durchgeführt. Aus ökonomischen Gründen wird ein Gegenstromverfahren angewendet, d.h. zu den Knochen wird zu Beginn der Mazeration eine bereits mit Mineralsalzen angereicherte Salzsäurelösung gegeben, während frisch hergestellte 6 %ige HCl erst in der letzten Stufe des Prozesses verwendet wird. In diesem Punkt musste für die vorliegenden Untersuchungen von den industriell üblichen Herstellungsbedingungen abgewichen werden, da es ein Ziel dieser Arbeit war, den Weg der Elimination von gebundenen Tetracyclin-Rückständen in den Knochen aufzuzeigen und hierzu die Kontrolle der Tetracyclin-Gehalte in der Salzsäure gesondert an den einzelnen Mazerationstagen durchgeführt werden musste. Es wurde täglich die verbrauchte Salzsäurelösung von den Knochen entfernt und durch 6 %ige HCl ersetzt. Möglich ist, dass es durch diese Veränderung im Herstellungsprozess der Gelatine im Labormaßstab zu einer stärkeren Freisetzung der gebundenen Tetracyclin-Rückstände als im üblichen industriellen Verfahren kommen konnte; eventuell weist die von der Gelatineindustrie in den ersten Mazerationstagen verwendete, bereits mit Mineralsalzen angereicherte HCl-Lösung einen höheren pH-Wert und eine niedrigere Konzentration auf als unverbrauchte 6 %ige HCl und könnte damit zu einer verminderten Entmineralisierung der Knochen führen.

WEIDENBERG (2002) variierte in ihren Untersuchungen sowohl die Konzentration der verwendeten HCl als auch die Dauer der Mazeration, wobei ein Wechsel der Salzsäure jeweils

jeden zweiten Tag durchgeführt wurde; eine anschließende Behandlung mit verdünnter  $H_2SO_4$  wurde nicht durchgeführt.

Die sich in der industriellen Gelatineherstellung an die sechstägige Mazeration mit HCl anschließende Behandlung der Knochen mit Schwefelsäurelösung für den Zeitraum von 7 h wurde auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Dieser Prozessschritt dient dem weiteren Aufschluss der Knochen und der Entfernung unerwünschter Begleiteiweiße (OSTERMAIER 2001).

### Extraktion und Filtration

Die Gelatine wurde, wie auch in der Industrie üblich, in vier Stufen bei ansteigenden Temperaturen aus dem Ossein ausgeschmolzen. Auf eine Aufreinigung der extrahierten Gelatinelösung durch Anschwemmfilter aus Kieselgur (Diatomeenerde) musste im Rahmen der Gelatineherstellung im Labormaßstab verzichtet werden; es wurde jedoch eine Filtration über Zellosefilter durchgeführt, durch die in der Gelatinelösung vorhandene Trübstoffe und restliche Fettsuren entfernt werden konnten.

### **5.1.2 Ionenaustauschverfahren**

Die für den Ionenaustausch verwendeten Kunstharze (Lewatite) wurden von der deutschen Gelatineindustrie zur Verfügung gestellt und entsprachen damit den industriell eingesetzten Materialien. Die Regeneration der Harze mit HCl bzw. NaOH vor der Durchführung der Versuche zum Ionenaustausch wurden genau nach den Angaben der Industrie (OSTERMAIER 2001) vorgenommen. Die Aufrechterhaltung der notwendigen Prozesstemperatur während der Versuche wurde durch die Verwendung von doppelwandigen Glassäulen und heißem Wasser gewährleistet (vgl. 3.5.1). Das Schwebebettverfahren, das die Industrie zur Beförderung der Gelatinelösung durch die Ionenaustauscherharze anwendet, konnte im Rahmen der Gelatineherstellung im Labormaßstab nicht simuliert werden; statt dessen wurde die Gelatinelösung von oben auf die in der Säule befindlichen Harze gegeben und langsam durchtropfen gelassen.

### 5.1.3 Aufarbeitung der Proben für die HPLC-Untersuchung

Grundlage der Aufarbeitung der Proben für die HPLC-Untersuchung war die vorläufige amtliche Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen in Fleisch, Fisch, Milch, Ei und Honig nach § 35 LMBG (ANON. 2000). Die dort vorgeschriebene Extraktionsmethode mit Succinatpuffer eignet sich jedoch nicht für die Aufarbeitung von Knochenmaterial und Gelatine und muss entsprechend modifiziert werden (KÖRNER 2000; WEIDENBERG 2002). Für die Extraktion gebundener Rückstände von Tetracyclinen in Knochen erwies sich der Einsatz von 1 M HCl als Extraktionsmittel mit nachfolgender Einstellung des pH-Wertes auf 4,0 als geeignet (KÖRNER 2000) und wurde auch in der vorliegenden Arbeit praktiziert. In den eigenen Vorversuchen zur Aufarbeitung von Knochen konnte gezeigt werden, dass eine feine Zermahlung des Probenmaterials ( $\emptyset$  1-2 mm) und die anschließende Extraktion über den Zeitraum von zwei Tagen notwendig sind, um eine vollständige Erfassung der Rückstände von Tetracyclinen in Knochen zu gewährleisten (vgl. 4.3).

Für die Extraktion von Tetracyclinen aus Gelatine wurde die von WEIDENBERG (2002) entwickelte Methode mit Pepsinlösung durchgeführt.

Die Aufarbeitung der während des Herstellungsprozesses von Gelatine angefallenen Proben des Entfettungswassers und der Enzymlyösung erforderte keine Extraktion, sondern die Proben wurden direkt mit 1 M HCl auf den pH-Wert 4,0 eingestellt und weiter aufgearbeitet.

Für die Aufarbeitung der Salzsäure aus der Mazeration war zunächst ebenfalls keine Verwendung einer Extraktionslösung notwendig, da die ursprünglich im Knochen gebundenen Tetracycline in dem Medium Salzsäure bereits in gelöster Form vorlagen. Nach der für die weitere Aufarbeitung erforderlichen Einstellung des pH-Wertes der Salzsäureproben mit NaOH auf pH 4,0 (KÖRNER 2000) kam es zur Ausfällung einer kristallinen Substanz, die nach anschließender Zentrifugation der Probe als Bodensatz im Zentrifugenbecher verblieb. Da vermutet wurde, dass es zu einer Ausfällung von ursprünglich aus dem Knochen stammenden, nun in der Salzsäure gelösten Mineralsalzen gekommen war und die Möglichkeit der Tetracyclinbindung an diese Mineralsalze bestand, wurden die Bodensätze mit 1 M HCl versetzt und einer Extraktion und Aufreinigung unterzogen. Die Vermutung, dass in den Bodensätzen Rückstände von Tetracyclinen vorhanden sein könnten, wurde durch die nachfolgende HPLC-Untersuchung bestätigt. Die Salzsäureproben aus den ersten vier Tagen der Mazeration waren so stark mit Mineralsalzen angereichert, dass die pH-Wert-Einstellung nach Extraktion der

Tetracycline aus dem Bodensatz erneut zu einer Ausfällung kristalliner Substanzen führte, so dass diese Proben für die Rückstandskontrolle eine insgesamt dreistufige Aufarbeitung erforderten. Die Extrakte aus den Aufarbeitungen wurden jeweils einzeln der HPLC-Untersuchung zugeführt und die ermittelten Einzelergebnisse zu einer Gesamtsumme addiert.

Während die Aufarbeitung der Salzsäureproben aus dem fünften Mazerationstag nur zur einmaligen Ausfällung einer geringen Menge von Mineralsalzen führte, konnte bei der Aufarbeitung der Proben aus dem sechsten Mazerationstag und aus der Schwefelsäurebehandlung keine Ausfällung mehr beobachtet werden. Dieses beruht vermutlich auf der Tatsache, dass die Entmineralisierung der Knochen ab dem fünften Tag der Mazeration bereits weitgehend abgeschlossen war und es dadurch nur noch zu einer geringen Anreicherung der Säure mit Mineralsalzen kam. Betrachtet man die mittlere Dichte der verbrauchten Säurelösungen im Verlauf der Mazeration, so nehmen die Werte nach ihrem Maximum am zweiten Tag (1,130 g/ml) täglich ab und sind am sechsten Tag mit der Dichte einer frischen 6 %igen HCl (1,030 g/ml) vergleichbar (vgl. 4.7.1.3); anhand der Dichtemessung der verbrauchten Säurelösung erhält man also einen Hinweis auf die Intensität der stattgefundenen Entmineralisierung der Knochen. Auch in der Gelatineindustrie werden daher begleitend zu dem Mazerationsprozess sowohl die Dichte als auch die pH-Werte der Säurelösungen gemessen und protokolliert (ROTH 2001).

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen**

Nach Zerkleinerung der Knochen in der institutseigenen Knochenmühle zu Partikeln mit einer Korngröße von 2-6 mm und der anschließenden Aufarbeitung mit 1 M HCl konnten sogar am dritten Tag der Extraktion noch Gehalte an TC und E-TC (Median 60 µg/kg bzw. 38 µg/kg) sowie CTC (Median 122 µg/kg) nachgewiesen werden. Daher wurde versucht, durch die feinere Zerkleinerung der Knochen eine Verkürzung der notwendigen Extraktionszeit zur vollständigen Erfassung der Tetracyclin-Rückstände zu erreichen: Nach einer Vorzerkleinerung wurden die Knochen in einer Mikroschlagmühle zu feinen Partikeln von 1-2 mm Durchmesser vermahlen; für diesen Prozess erwies sich eine vorausgehende Kaltentfettung der Knochen als vorteilhaft, um ein Verklumpen in der Mikroschlagmühle zu vermeiden. Die vollständige

Erfassung der Tetracyclin-Rückstände in den fein zermahlene Knochen erforderte eine zwei-tägige Extraktion mit 1 M HCl; in der Extraktionsflüssigkeit nach dem 3. Extraktionstag konnten keine Rückstände von Tetracyclinen mehr nachgewiesen werden.

Die Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen ergaben, dass eine einmalige Extraktion mit 1 M HCl auch bei feiner Vermahlung des Materials (Korngröße 1-2 mm) für eine vollständige Erfassung der Rückstände von Tetracyclinen nicht ausreichend ist, sondern über mindestens zwei Tage durchgeführt werden muss.

### **5.2.2 Einfluß der Trocknung auf Tetracyclin-Rückstände in Knochen**

Bezüglich der Fragestellung, ob die Trocknung des Knochenschrotes im Rahmen der Gelatineherstellung Auswirkungen auf die Tetracyclin-Gehalte in den Knochen hat, wurden aus zehn Portionen Knochenschrot jeweils vor und nach der Trocknung (im Trockenschrank über den Zeitraum von 8 h bei 60 °C) Proben gezogen und auf Tetracyclin-Rückstände untersucht; zur Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse auf 100 % TS berechnet. Während der Median der Gesamtsumme der Tetracycline vor der Trocknung (12,0 mg/kg) einen ähnlichen Wert wie nach der Trocknung (12,8 mg) aufwies, variierten die Mediane für die einzelnen Tetracyclin-Derivate: Die Summe von TC und E-TC zeigte nach der Trocknung eine Zunahme von 49,0 %; dagegen wurde die Summe von CTC und E-CTC durch den Trocknungsprozess auf 70,5 % des in den Knochen vor der Trocknung bestimmten Gehaltes reduziert. Die Mediane für den Gehalt an OTC in den Knochen zeigten mit 0,24 mg/kg bzw. 0,30 mg/kg nur geringe Unterschiede. Die Gehalte an ATC und E-ATC nahmen durch die Trocknung im Medianwert von 1,32 mg/kg auf 0,83 mg/kg ab. Das Phänomen der Zunahme des Gehalts von TC-Rückständen in Knochen durch eine Hitzebehandlung wurde auch in den Untersuchungen von KÖRNER (2000) beschrieben: In Fleischknochenmehlen, die bei 100 °C erhitzt wurden, konnte eine Zunahme der nachgewiesenen TC-Rückstände um bis zu 75 % beobachtet werden. Der Versuch einer Erklärung für diese Veränderung erfolgte durch die Vermutung, dass die Hitzebehandlung zu einer chemischen Veränderung der Chelatkomplexe in den Knochen und somit zu einer leichteren Herauslösung des Tetracyclins während der Aufarbeitung der Knochen geführt hatte. Diese Erklärungsmöglichkeit findet jedoch keine Anwendung für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit, da aufgrund der hier durchgeführten Aufarbei-

tungsmethode für Knochen nicht zu erwarten war, dass nach der Aufarbeitung noch Rückstände von Tetracyclinen in den Knochen verbleiben konnten.

An den eigenen Untersuchungen zum Einfluß der Hitzebehandlung auf gebundene Rückstände in Knochen ist kritisch anzumerken, dass das Knochenschrot zum Zeitpunkt der Probenahme eine Korngröße von 6-20 mm aufwies und damit kein homogenes Ausgangsmaterial darstellte. Die Korngröße entsprach der industriell üblichen Größe von Knochen bei der Herstellung von Gelatine. Da es Ziel dieser Arbeit war, die Gelatineherstellung aus Knochen im Hinblick auf den Verbleib von Tetracyclin-Rückständen zu beurteilen und zu diesem Zweck die industriell üblichen Herstellungsbedingungen möglichst genau nachgestellt werden sollten, wurden die Knochen auch in der entsprechenden Korngröße getrocknet. Im Knochen gebundene Tetracycline sind nicht gleichmäßig im gesamten Knochen verteilt, sondern lagern sich herdförmig oder nur in bestimmten Schichten des Knochens ein. Die Tetracycline waren in diesem grob zerkleinerten, inhomogenen Ausgangsmaterial vermutlich sehr unterschiedlich verteilt, so dass der Vergleich der Tetracyclinegehalte von zwei stichprobenartig aus diesem Material entnommenen Proben zu methodisch bedingten Unterschieden in den Ergebnissen geführt haben könnte.

Im Hinblick auf den Gesamtgehalt aller Tetracycline hatte der Trocknungsprozess keinen Einfluss auf die gebundenen Rückstände von Tetracyclinen in Knochen.

### 5.2.3 Tetracyclin-Gehalte in den Proben aus dem Herstellungsprozess von Gelatine

#### Salzsäure und Schwefelsäure aus der Mazeration

Bei der von WEIDENBERG (2002) experimentell durchgeführten Gelatineherstellung aus tetracyclinhaltigen Knochen erwies sich die Mazeration als der bedeutendste Prozessschritt in Bezug auf die Elimination der Tetracycline. Die Mazeration mit Säure führt zu einer Entmineralisierung der Knochen und damit zur Anreicherung von gelöstem Calciumphosphat in der Säure; da die Tetracycline im Knochen als Tetracyclin-Calcium-Orthophosphat-Komplexe vorliegen (STAHLMANN u. LODE 2001), werden mit der Herauslösung des mineralischen Anteils des Knochens auch die daran gebundenen Tetracycline freigesetzt.

Um eine Aussage über Art und Umfang der Freisetzung der Tetracyclin-Rückstände an den einzelnen Mazerationstagen treffen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die tägliche Untersuchung der zur Demineralisierung der Knochen verwendeten Säure vorgenommen.

Eine Übersicht über die an den einzelnen Mazerationstagen in der Säure nachgewiesenen Gesamt mengen der Tetracycline ist in Tabelle 18 dargestellt; die Angaben in mg beziehen sich jeweils auf 750 ml Säure (Mazerationstag 1) bzw. 1000 ml Säure (Mazerationstag 2-7).

**Tab. 18:** Übersicht über die Tetracyclingehalte in der Säure an den einzelnen Mazerationstagen (Angabe der Mediane)

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Gesamt
<b>Gesamttetracycline</b>								
<b>in mg</b>	<b>1,21</b>	<b>1,12</b>	<b>1,59</b>	<b>1,61</b>	<b>1,24</b>	<b>0,87</b>	<b>0,52</b>	<b>8,16</b>
<b>Gesamttetracycline</b>								
<b>in %</b>	<b>14,8</b>	<b>13,7</b>	<b>19,5</b>	<b>19,7</b>	<b>15,2</b>	<b>10,7</b>	<b>6,4</b>	<b>100</b>

Es konnte über den gesamten Zeitraum der Mazeration eine Freisetzung von Tetracyclinen in die Säure beobachtet werden. Die anteilig größten Mengen der gelösten Tetracycline in der



Säure konnten an Tag 3 (19,5 %) und Tag 4 (19,7 %) nachgewiesen werden. An Tag 5 der Mazeration werden mit 1,24 mg/l noch 15,2 % der insgesamt nachgewiesenen Tetracycline in die Säure freigesetzt; diese Menge reduzierte sich an Tag 6 auf 10,7 %. In der Schwefelsäure, mit der die Knochen am letzten Tag der Mazeration über den Zeitraum von 7 h behandelt wurden, fanden sich noch 0,52 mg/l Tetracyclin-Rückstände, die einen Anteil von 6,37 % an der Gesamtmenge bedeuteten. Betrachtet man die Ergebnisse aus den Vorversuchen zur Aufarbeitung von Knochen für den Nachweis von Tetracyclin-Rückständen (vgl. 4.2), so konnten aus Knochen mit einer Korngröße von 2-6 mm noch am dritten Extraktionstag mit 1 M HCl Tetracycline nachgewiesen werden, d.h. eine vollständige Entmineralisierung von Knochenpartikeln dieser Korngröße konnte durch den dreitägigen Aufschluss mit HCl erreicht werden. Das für die Gelatineherstellung verwendete Knochenschrot wies eine zwischen 3 und 20 mm variierende Korngröße auf, so dass im Vergleich mit der Zeit, die die Knochenpartikel im Vorversuch zur vollständigen Demineralisierung erforderten, ein längerer Demineralisierungsprozess für das Knochenschrot mit deutlich größerer Partikelgröße zu erwarten war.

Bei Betrachtung der einzelnen Tetracyclin-Derivate, die in der Säure während der Mazeration nachgewiesen werden konnten, fällt die Veränderung des Mengenverhältnisses von TC und seines Dehydratationsproduktes ATC auf. Am vierten und fünften Mazerationstag konnten TC und E-TC nur noch in geringen Konzentrationen (Medianwerte der Summe 28,2 µg/l und 3,79 µg/l) nachgewiesen werden, und ab dem sechsten Tag waren keine Rückstände mehr nachweisbar. Dagegen konnten ATC und E-ATC über den gesamten Zeitraum der Mazeration in der Säure bestimmt werden, wobei ein Anstieg der Gehalte parallel zum Abfall der TC- und E-TC-Konzentrationen beobachtet wurde. Anhydrotetracyclin und sein Epimer entstehen in stark sauren Lösungen bei pH-Werten < 2,0 (YUEN u. SOKOLOSKI 1977; ROGALSKI 1985) sowie unter dem Einfluss hoher Temperaturen (KÜHNE et al. 2001a) durch Dehydratation aus Tetracyclin. Die Anhydrotetracycline konnten mit einem Gesamtgehalt von 3,80 mg/6,75 l in der Säure nachgewiesen werden, obwohl die ursprünglich in den Knochen erfasste Menge nur 0,58 mg/750 g betrug. Umgekehrt konnten TC und E-TC in den Knochen vor der Mazeration mit einem Gehalt von 4,4 mg/750 g nachgewiesen werden, während in der Säure nur noch 29,5 % dieses Gehaltes vorhanden waren. Bei Betrachtung der Gesamtsumme der Tetracycline in Knochen und Säure lassen sich mit 5,17 mg (Knochen) und 5,08 mg (Säu-

re) wiederum fast identische Werte feststellen. Es muss also im Verlauf der Mazeration unter dem Einfluss der niedrigen pH-Werte zu einer Umwandlung von TC in ATC gekommen sein. WEIDENBERG (2002) konnte in Gelatine, die nach dem sauren Aufschlussverfahren hergestellt worden war, höhere ATC-Konzentrationen nachweisen als in dem Rohstoff Knochen; auch hier hatte der Einfluss der Salzsäure zu einer Umwandlung von TC in ATC geführt.

Während die Mazeration der Knochen im Rahmen der Herstellung von Gelatine mit 6 %iger HCl durchgeführt wurde, erfolgte die bisher in der Literatur beschriebene (KÜHNE et al. 2000; KÖRNER 2000; WEIDENBERG 2002) und auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Extraktionsmethode für Tetracycline mit 1 M HCl. Eine 6 %ige HCl ist stärker konzentriert als eine 1 M HCl, die einer 3,65 %igen HCl entspricht; es stellt sich die Frage, ob der Einsatz einer 6 %igen HCl als Extraktionsmittel eventuell die Extraktionszeit zur vollständigen Erfassung der Tetracyclin-Rückstände im Knochen verkürzen könnte. Dabei muss unter Berücksichtigung der steigenden ATC-Konzentrationen in der Säure während der Mazeration, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt wurden, jedoch in Betracht gezogen werden, dass die 6 %ige HCl während der Extraktion zu einer verstärkten Umwandlung von TC in ATC führen könnte.

Nach der Extraktion mit 1 M HCl konnte in den für die Gelatineherstellung vorgesehenen Knochen ein ATC-Gehalt von 0,83 mg/kg (Median) nachgewiesen werden, während die Knochen, die im Rahmen der Vorversuche zur Aufarbeitung untersucht wurden, nur vereinzelt geringe Mengen von ATC enthielten. Eine Erklärung für diese Tatsache ist vermutlich ein Unterschied in der Aufarbeitung der Proben: Während der Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen wurden die jeweiligen Überstände aus der Probenextraktion unverzüglich einer pH-Wert-Einstellung auf pH 4,0 unterzogen und anschließend weiter für die HPLC aufgearbeitet. Im Gegensatz dazu erfolgte bei der nachfolgenden, über zwei Tage durchgeführten Aufarbeitung der Knochen die pH-Wert-Einstellung der Überstände erst nach Abschluss der Extraktion am zweiten Tag und der Vereinigung der Überstände aus erstem und zweitem Extraktionstag. Während der Lagerung des Probenüberstandes aus dem ersten Extraktionstag, bei dem keine sofortige pH-Wert-Einstellung nach der Extraktion erfolgte, kam es vermutlich zu einer teilweisen Umwandlung von TC in ATC. Vermutlich wird die Umwandlung von TC und ATC nicht nur von der Konzentration einer Säure, sondern auch von der Einwirkungszeit der Säure auf die Knochen beeinflusst.

### Ossein und Gelatine

In dem Ossein konnten nach Abschluss der Mazeration keine Rückstände von Tetracyclinen mehr nachgewiesen werden, und auch im Endprodukt Gelatine lagen die Tetracyclin-Konzentrationen unter der HPLC-Nachweisgrenze, so dass die Mazeration zur Elimination der ursprünglich in dem Rohstoff Knochen gebundenen Tetracyclin-Rückstände geführt hatte. Nach der Behandlung des Osseins am siebten Mazerationstag wurde in der Schwefelsäure noch eine TC-Gesamtmenge von 0,52 mg/l nachgewiesen, die sich aus ATC, E-ATC, CTC und E-CTC zusammensetzte.

Es besteht die Möglichkeit, dass sich auch nach der Mazeration eventuell noch Rückstände von Tetracyclinen in dem Ossein befanden, die nicht mehr fest im Ossein gebunden waren und durch den anschließenden intensiven Waschprozess eliminiert worden sein könnten. Da Tetracycline eine hohe Affinität zur Bindung an Proteine aufweisen (KROKER et al. 2002), ist es nicht auszuschließen, dass im Ossein noch ein Restgehalt an Tetracyclin-Rückständen vorhanden war, der mit Wasser ausgewaschen werden konnte.

### Dicalciumphosphat

In dem Dicalciumphosphat, das im Rahmen der durchgeführten Versuche stichprobenartig aus der Salzsäure nach dem vierten Mazerationstag unter Zugabe von Kalkmilch ausgefällt und mit der HPLC untersucht wurde, konnten Rückstände von Oxytetracyclin, Anhydrotetracyclin und Chlortetracyclin nachgewiesen werden.

Die übliche Aufarbeitung der mit Calciumphosphat angereicherten Salzsäurelösung aus dem Produktionsschritt der Mazeration erfolgt folgendermaßen: Durch die Zugabe einer Calciumhydroxid-Suspension (Kalkmilch) wird der pH-Wert der Säurelösung auf ca. pH 4,0 erhöht und als Dicalciumphosphat ausgefällt (SCHRIEBER 1988). Das entstehende Präzipitat wird einer Heißlufttrocknung unterzogen und kann als Düngemittel verwendet oder als mineralisches Ergänzungsfuttermittel für Tiere (ausgenommen Wiederkäuer) eingesetzt werden. Die vorliegenden Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass im Handel befindliches Dicalciumphosphat Rückstände von Tetracyclinen enthalten könnte.

### **5.2.4 Einfluß des Ionenaustauschverfahrens auf den Gehalt von Tetracyclin-Rückständen in Gelatine**

Im Rahmen der industriellen Gelatine-Produktion wird die Gelatinelösung, die durch den Herstellungsprozess mit Anionen und Kationen (z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) angereichert ist, einer Entsalzung durch Ionenaustauscher unterzogen; für diesen Prozessschritt wird ein kombinierter, nacheinander geschalteter Kationen- und Anionenaustausch unter Verwendung von Kunstharzen durchgeführt.

Das im Labormaßstab simulierte Ionenaustauschverfahren führte in den mit TC und ATC dotierten Gelatineproben zu einer deutlichen Reduktion der Tetracycline (Reduktion auf 2,39 % TC und 0,00 % ATC). Die einzeln durchgeführten Ionenaustauschverfahren bewirkten mit einer Reduktion auf 47,9 % TC (Kationenaustausch) bzw. einer Reduktion auf 19,8 % TC (Anionenaustausch) eine deutlich geringere Elimination des Tetracyclins. Der getrennt durchgeführte Anionenaustausch führte auch ohne vorgeschalteten Kationenaustausch zu einer vollständigen Elimination von ATC, während der getrennte Kationenaustausch eine Reduktion auf 19,7 % bewirkte.

Die Tetracycline besitzen saure und basische funktionelle Gruppen an ihrem Grundgerüst, die ihr amphoterer Verhalten in wässriger Lösung bedingen (STAHLMANN u. LODE 2001). Die große Anzahl eng benachbarter polarer Substituenten und die pH-Wert-abhängige Existenz positiver und negativer Ladungen ermöglichen weitreichende Wechselwirkungen mit anderen Molekülen und Ionen; insbesondere besteht eine Affinität zu Metallkationen. In der mit Kationen und Anionen angereicherten Gelatinelösung können die Tetracyclinmoleküle sowohl Verbindungen eingehen, als auch, je nach Ladungszustand, als freie Kationen oder Anionen vorliegen und durch Ionenaustauschverfahren – zumindest teilweise – aus der Lösung entfernt werden.

### **5.3 Schlussfolgerungen**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass das im Labormaßstab nach den industriell üblichen Bedingungen durchgeführte saure Aufschlussverfahren für Gelatine aus Knochen geeignet erscheint, eine vollständige Elimination eventueller gebundener Rück-

stände von Tetracyclinen im Ausgangsmaterial zu bewirken. Da es nicht in allen Produktionsschritten möglich war, den tatsächlichen industriellen Bedingungen zu entsprechen, muss die Bewertung dieses Herstellungsverfahrens mit Einschränkungen versehen werden: Die Mazeration wurde für die (im Hinblick auf die Rückstandsanalytik erforderlichen) Untersuchungen zum Verbleib der Tetracycline in HCl täglich mit frischer 6 %iger HCl durchgeführt, was möglicherweise zu einer stärkeren Elimination der Tetracyclinrückstände in den Knochen geführt haben könnte, als es im Rahmen der industriellen Herstellung der Fall ist: Aus Kostengründen wird hier zu Beginn der Mazeration des Ausgangsmaterials die HCl aus bereits vorausgegangenen Demineralisierungsprozessen von Knochen eingesetzt.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen wird durch das Ionenaustauschverfahren, das bei der industriellen Gelatineherstellung zur Entsalzung der Gelatinelösung eingesetzt wird, gleichzeitig eine Reduktion eventueller Rückstände von Tetracyclinen in der Gelatine bewirkt: Während der kombinierte Kationen- und Anionenaustausch im Mittel zu einer Reduktion der Tetracyclin-Rückstände um 97,6 % führte, konnte gleichzeitig die vollständige Elimination von Anhydrotetracyclin-Rückständen erreicht werden. Somit trägt das Ionenaustauschverfahren im Anschluss an die Herstellung von Gelatine zur Sicherheit der Gelatine im Hinblick auf Rückstände von Tetracyclinen bei.

Kritisch zu beurteilen ist, dass vom Gesetzgeber keine maßgeblichen, für den Produktionsschritt der Mazeration einzuhaltenden Bedingungen für die Herstellung von Gelatine aus Schweineknöcheln vorgegeben werden. In der Speisegelatine-Verordnung werden nur für die Behandlung von Wiederkäuerknöcheln aus Ländern der Kategorie 3 (Länder mit geringem BSE-Risiko, z.B. Deutschland) genaue Vorgaben gemacht: Die Knochen müssen mindestens über zwei Tage mit verdünnter Salzsäure (Mindestkonzentration 4 %) behandelt und anschließend einer Behandlung mit gesättigter Kalklösung über mindestens 20 Tage unterzogen und anschließend sterilisiert werden. Für die Herstellung von Gelatine aus Knochen aller anderen schlachtbaren Haustiere wird lediglich vorgegeben, dass „die Ausgangserzeugnisse mit Säure oder Lauge behandelt und ein- oder mehrmals gespült werden“ müssen. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bezüglich des Rückstandsverhaltens von Tetracyclinen in Knochen während der Gelatineherstellung nach dem sauren Aufschlussverfahren wäre es sinnvoll, die Mindestdauer von 6 Mazerationstagen mit mindestens 6 %iger HCl und an-

schließender mindestens 7 Stunden dauernder Behandlung mit verdünnter (0,18 N)  $H_2SO_4$  gesetzlich festzulegen.

Ein grundlegender Ansatzpunkt zum Schutz des Verbrauchers vor einer eventuellen Kontamination des Lebensmittels Gelatine mit Rückständen von Tetracyclinen ist die Kontrolle und Selektion des Rohmaterials zur Gelatineherstellung. Wie bereits erläutert, stellen Tetracyclin-Rückstände in Knochen einen häufigen Befund bei tauglich beurteilten, geschlachteten Haustieren dar; mittels fluoreszenzoptischem Nachweis der Tetracycline durch UV-Auflicht könnte hier eine Selektion der Knochen durchgeführt werden. Vergleicht man die gesetzlichen Anforderungen an die verwendeten Rohstoffe für Speisegelatine und für Gelatine, die als Futtermittel eingesetzt wird, so sind die Anforderungen für die Gelatine als Futtermittel sogar präziser formuliert: In der neuen Verordnung über nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte (VO (EG) Nr. 1774/2002) wird die Einteilung in drei Kategorien vorgenommen; in Kategorie 2 werden u. a. tierische Nebenprodukte eingeordnet, die Rückstände von Tierarzneimitteln oder Kontaminanten über dem gemeinschaftsrechtlich festgelegten Höchstwert (MRL) enthalten; sie dürfen nicht für die Futtermittelherstellung verwendet werden.

Problematisch erscheinen die Abfälle und Nebenprodukte, die bei der Herstellung von Gelatine anfallen und Tetracycline enthalten können. Das Nebenprodukt Dicalciumphosphat wird als Düngemittel und als mineralisches Ergänzungsfuttermittel (ausgenommen Wiederkäuer) verwendet.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird empfohlen, in weiteren Studien Handelsproben von Dicalciumphosphat auf Rückstände von Tetracyclinen zu untersuchen und zu überprüfen, ob das gesetzlich vorgeschriebene Verfahren der Heißlufttrocknung geeignet ist, eventuelle Rückstände von Tetracyclinen aus dem Produkt zu entfernen.

## 6 Zusammenfassung

Frauke Schulze

### **Verbleib in Knochen gebundener Rückstände von Tetracyclinen während der Herstellung von Gelatine mit dem sauren Aufschlussverfahren**

Für die Herstellung des Lebensmittels Gelatine werden als Rohstoffe in großem Umfang Knochen geschlachteter Tiere verwendet. Da gebundene Rückstände von Tetracyclinen in Knochen tauglich beurteilter, geschlachteter Tiere einen häufigen Befund darstellen, sollten die Produktionsschritte während der Herstellung von Gelatine eine vollständige Elimination eventueller Tetracyclin-Rückstände aus dem Ausgangsmaterial gewährleisten. Bei der experimentellen Gelatineproduktion aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln konnten Rückstände von Tetracyclinen in der Gelatine nachgewiesen werden (WEIDENBERG 2002). In Fortsetzung dieser Untersuchungen wurde unter weitgehender Simulation der tatsächlichen industriellen Bedingungen die Herstellung von Gelatine aus tetracyclinhaltigen Schweineknöcheln im Labormaßstab durchgeführt. Als Herstellungsverfahren wurde das saure Aufschlussverfahren gewählt. Ziel der Arbeit war es, den Verbleib der gebundenen Rückstände von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in Knochen während des Herstellungsprozesses aufzuzeigen. Außer den Ausgangsmaterialien und dem Endprodukt Gelatine wurden die Zwischenprodukte und die während des Herstellungsprozesses entstehenden Abfälle und Abwässer mittels HPLC auf Rückstände von Tetracyclinen untersucht. Außerdem wurde das Ionenaustauschverfahren, das in der Industrie im Anschluss an die Extraktion zur Entsalzung der Gelatine durchgeführt wird, im Labormaßstab nachgestellt und hinsichtlich seiner Eignung, Rückstände von Tetracyclinen aus Gelatine zu eliminieren, überprüft.

- Die Extraktion der Tetracycline aus Knochen und Ossein erfolgte unter Verwendung von 1 M HCl, während für die Gelatineproben Pepsinlösung verwendet wurde. In Vorversuchen zur Aufarbeitung von Knochen erwies sich die feine Vermahlung der Knochen auf eine Partikelgröße von 1-2 mm und die anschließende zweitägige Extraktion mit HCl als notwendig für eine vollständige Erfassung der gebundenen Tetracyclin-Rückstände in Knochen.

- Die Mazeration der Knochen während der Gelatineherstellung wurde mit 6 %iger HCl über insgesamt 6 Tage durchgeführt, wobei ein täglicher Wechsel der Säure erfolgte. Anschließend wurde das entstandene Ossein für 7 h mit verdünnter (0,18 N) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> behandelt. Die Mazeration führte zu einer vollständigen Freisetzung der Tetracyclin-Rückstände am Rohstoff Knochen in die Säure.
- Tetracycline wurden über den gesamten Zeitraum der Mazeration aus den Knochen freigesetzt und in der Säure nachgewiesen, wobei eine teilweise Umwandlung von Tetracyclin in Anhydrotetracyclin stattfand. Die tägliche Oxytetracyclin-Freisetzung erfolgte in den ersten vier Tagen kontinuierlich zwischen 19 % und 23 % der Gesamtmenge und nahm ab dem fünften Tag ab. Die Chlortetracyclin-Freisetzung erfolgte verzögert: am dritten und vierten Tag wurden mit 22 % und 20 % die anteilig höchsten Mengen freigesetzt. Während die Freisetzung von Tetracyclin während der ersten drei Tage kontinuierlich erfolgte, kam es ab dem vierten Tag zu einer starken Umwandlung in Anhydrotetracyclin.
- Es konnten im Ossein und in der mehrstufig bei verschiedenen Temperaturen extrahierten Gelatine keine Rückstände von Tetracyclinen nachgewiesen werden.
- Das im Labormaßstab durchgeführte kombinierte Ionenaustauschverfahren führte in der mit Tetracyclin und Anhydrotetracyclin dotierten Gelatine zur Reduktion des Tetracyclin-Gehaltes um 98 % und des Gehaltes an Anhydrotetracyclin um 100 %.



### Schlussfolgerungen:

Unter dem Eindruck der vorliegenden Ergebnisse erscheint es sinnvoll, aufgrund der Rückstandsproblematik in Knochen gebundener Tetracycline für das saure Aufschlussverfahren zur Herstellung von Gelatine gesetzliche Normen festzulegen, die sowohl die Mazerationsdauer als auch die Konzentration der zu verwendenden Salzsäure bestimmen.

Zu empfehlen wäre die Kontrolle und Selektion des Rohstoffes Knochen für die Gelatineherstellung im Hinblick auf gebundene Rückstände von Tetracyclinen, auch unter Berücksichtigung der möglichen Umweltbelastung durch den Eintrag von Tetracyclinen über die Abwässer und Nebenprodukte (z.B. Dicalciumphosphat) in die Umwelt.

## 7 Summary

Frauke Schulze

### **Elimination of bound tetracycline residues in bones during the production of acid processed gelatin**

Bones of slaughtered animals are extensively used as raw material for the production of gelatin. As bound tetracycline residues are frequently found in bones of slaughtered animals, the production steps should ensure the complete elimination of any tetracycline residues in bones. In previous studies on the production of gelatin from pig bones, tetracycline residues were found in the gelatin (WEIDENBERG 2002). Continuing these studies in the present study, the industrial production of acid processed gelatin was simulated at the laboratory scale using pig bones containing tetracyclines. The aim of the study was to determine where bound oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline residues in bones remain during the process. In addition to the bones and the gelatin, the intermediate products and the industrial effluents were analyzed for tetracycline residues. Further, a laboratory-scale ion exchange was performed to determine its suitability for eliminating tetracycline residues in gelatin; in industry the ion exchange is used for the desalination of gelatin.

- The extraction of tetracyclines from bones and ossein was performed with 1 M hydrochloric acid, while for the gelatin samples a pepsin solution was used. Following the results of first step experiments on the extraction of tetracyclines from bones, the bones were ground to a grain size of 1-2 mm and further extracted with hydrochloric acid for two days to ensure complete extraction of the tetracycline residues.
- The bones were macerated in 6 % hydrochloric acid for 6 days, changing the acid solution daily. Afterwards the ossein was treated with 0,18 N sulphuric acid for 7 hours. The process led to complete release of the bound tetracycline residues to the acid.
- The tetracyclines were released from the bones into the acid over the entire period of maceration with partial, time-dependent degradation of tetracycline to anhydrotetracycline:

19 – 23 % of the total oxytetracycline was released on each of the first four days, after which there was decrease. The chlortetracycline was released with the highest amounts after a delay, with 22 % and 20 % of the total chlortetracycline measured on the third and the fourth days.

Amounts of both tetracycline and anhydro-tetracycline were measured continuously during the first three days, after which there was considerable conversion of tetracycline to anhydrotetracycline.

- Tetracycline was not detected in the ossein nor in the gelatin at any stage of the extraction process at various temperatures.
- When gelatin spiked with tetracycline and anhydrotetracycline was passed through the ion exchange columns, 98 % of the tetracycline and 100 % of the anhydro-tetracycline was removed by the ion exchanger.

### Conclusions:

Because tetracycline residues are frequently found in bones used to produce gelatin and with respect to the results of this study, it is recommended that the regulations governing the production of gelatin include the length of time for maceration in acid solution as well as the concentration of the acid.

For gelatin production, it would also be advisable to select bones containing no detectable tetracycline residues. This is also in the interest of environmental protection: prevention of tetracycline input into the environment via the waste water and by-products, e.g., calcium-phosphate.

## 8 Schrifttumsverzeichnis

ANON. (2000):

Bestimmung von Rückständen an Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin und deren Epimeren, Doxycyclin und Demeclocyclin in Fleisch, Fisch, Milch, Ei und Honig. Vorläufige prävalidierte HPLC-Methode nach § 35.

Beuth Verlag, Berlin, L 06.00 48

ARGAST, M. u. C.F. BECK (1984):

Tetracycline diffusion through phospholipid bilayers and binding to phospholipids.

Antimicrob. Agents Chemother. 26, 263-265

BABEL, W. (1996):

Gelatine – ein vielseitiges Biopolymer.

Chemie in unserer Zeit 30, Nr. 6, 86-95

BECK, C.F., R. MUTZEL, J. BARBE u. W. MÜLLER (1982):

A multifunctional gene (*tetR*) controls Tn10-encoded tetracycline resistance.

J. Bacteriol. 150, 633-642

BERTRAND, K. P., K. POSTLE, L. V. WRAY u. W. S. REZNIKOFF (1984):

Construction of a single-copy promoter vector and its use in analysis of regulation of the transposon Tn10 tetracycline resistance determinant.

J. Bacteriol. 158, 910-919

BETTE, P. (1996):

Prüfung und Bewertung der Unbedenklichkeit von Tierarzneimitteln.

in: FREY, H.-H., u. W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

1. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, 681-696

BLOMQUIST, L., u. A. HANNGREN (1966):

Fluorescence technique applied to whole body sections for distribution studies of tetracyclines.

Biochem. Pharmacol. 15, 215-219

BRÜGGEMANN, J., U. LÖSCH, M. MERKENSCHLAGER u. I. OFFTERDINGER (1966):

Ablagerung von Tetracyclin im Knochengewebe von Tieren bei dem Zusatz von Tetracyclin zum Futter.

Zbl. Vet. A. 13, 59-74

BURDETT, V. (1986):

Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent.

J. Bacteriol. 178, 3246-3251

BUYSKE, D. A., H. J. EISNER u. R. G. KELLY (1960):

Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 130, 150-156

BVL (Hrsg.) (2003):

Resistenzmonitoring ausgewählter pathogener Bakterien von erkrankten lebensmittelliefernden Tieren.

Publikation in Vorbereitung

CHOPRA, I., P. M. HAWKEY u. M. HINTON (1992):

Tetracyclines, molecular und clinical aspects.

J. Antimicrob. Chemother. 29, 245-277

CHOPRA, I. (1994):

Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome.

J. Antimicrob. Chemother. 38, 637-640

CHOPRA, I. u. M. ROBERTS (2001) :

Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 232-260

CVMP (COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS ) (1996):

Doxycycline Hyclate, Summary Report

in: EMEA (Hrsg.)/MRL/101/96-FINAL

[Internet: <http://www.eudra.org>]

DÄMMRICH, K. (1969):

Die Eigenfluoreszenz der Tetracycline und ihre Anwendung bei der Untersuchung des Skeletts.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 16, 309-311

DEGENKOLB, J., M. TAKAHASHI, G. A. ELLESTAD u. W. HILLEN (1991):

Structural requirements of tetracycline-tet repressor interaction: Determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the tet repressor.

Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1591-1595

EGMOND, H.J.van, J.F.M. NOUWS, R. SCHILT, W.D.M. van LANKVELD- DRIESSEN, E.P.M. STREUTJENS-van NEER u. F.G.H. SIMONS (2000):

Stability of antibiotics in meat during a simulated high temperature destruction process.

In: GINKEL, L. A. van & A. RUITER (Hrsg.): Proceedings of EuroResidue IV conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, 8-10 May 2000

University of Utrecht, 430-437

EISENBRAND, G., u. P. SCHREIER (Hrsg.) (1995):

Römpp Lexikon Lebensmittelchemie.

9. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 328

FALBE, F., u. M. REGITZ (Hrsg.) (1999):

Römpp-Lexikon Chemie.

10. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1484

FEDESA (European Federation of Animal Health) (1998):

Pressemitteilung vom 6. September 1998.

zitiert in: Dtsch. Tierärztebl. 11, 1093

FEDESA (European Federation of Animal Health) (2001):

Pressemitteilung vom 13. Juni 2001.

[Internet: <http://www.FEDESA.be/Pressroom/PR-130601.htm>]

GELITA<sup>®</sup> (2001):

Die Gelatine Produktion.

The Gelatine Group, Informationsbroschüre, Eberbach

GEMMER, H., H. SEEGER u. W. SCHALE (1973):

Beurteilung von Tetracyclin-Rückständen in Knochen von Schlachttieren.

Fleischwirtsch. 53, 1598-1599

GOODMAN, J. J. (1985):

Fermentation and Mutational Development of the Tetracyclines.

in: J. J. HLAVKA u. J. H. BOOTHE (Hrsg.): The Tetracyclines.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 5-57

(Handb. Exp. Pharm. 78)

GRÄFE, U. (1992):

Biochemie der Antibiotika.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 324-327

GUINEY, D. G. Jr., P. HASEGAWA u. C. E. DAVIS (1984):

Expression of Escherichia coli of cryptic tetracycline resistance genes from Bacteroides R plasmids.

Plasmid 11, 248-252

HEESCHEN, W. (2002):

Gelatine: Vielseitige Anwendungsgebiete und Sicherheitsaspekte.

1. Europäisches GELITA Symposium 18./19. Juni 2002 in Heidelberg

Internet: [http://www.gelita.com/DGF-deutsch/news/news\\_gesunder\\_genuss.html](http://www.gelita.com/DGF-deutsch/news/news_gesunder_genuss.html)

HEITZMAN, R. J. (Hrsg.) (1994):

Veterinary Drug Residues.

Blackwell Scientific Publications, Oxford, S. 5/1

HILLEN, W., u. C. BERENS (1994):

Mechanisms underlying expression of Tn 10-encoded tetracycline resistance.

Annu. Rev. Microbiol. 48, 345-369

HLAVKA, J. J., u. J. H. BOOTHE (Hrsg.) (1985):

The Tetracyclines.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1-3

(Handb. Exp. Pharm. 78)

HUDSON, C. B. (1993):

Gelatine - Relating Structure and Chemistry to Functionality.

in: K. NISHINARI u. E. DOI (Hrsg.): Food Hydrocolloids - Structures, Properties, and Functions.

Plenum Press, New York, 347-354



JOHNSTON-BANKS, F.A. (1990):

Gelatine.

In: P. HARRIS (Hrsg.): Food Gels.

Elsevier Applied Science, London, New York, 233-289

KAUFMANN, A., B. PACCIARELLI, A. PRIJIC, B. RYSER u. S. ROTH (1999):

Bestimmung von Rückständen von Tetracyclinen in Lebensmitteln.

Mitt. Lebensm. Hyg. 90, 167-176

KLEBINGER, W. (1992):

Aktivitätsverluste von Chemotherapeutika (Tetracycline und Sulfonamide) bei der Brühwurstherstellung.

Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie und Gärungstechnologie, Diss.

KLIMOVA, N. E., u. O. B. ERMOLOVA (1976):

Embryotoxicity and the immunodepressive action of tetracycline and its epi- and anhydroderivatives.

Antibiotiki 21, 1018-1022

KÖRNER, U. (2000):

Tetracyclin-Rückstände in Tiermehlen und Fleischknochenmehlen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

KROKER, R., R. SCHERKL u. F. R. UNGEMACH (2002):

Chemotherapie bakterieller Infektionen.

in: H.-H. FREY u. W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

2. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 353-389

KÜHNE, M. (1995):

Rückstände von Tetracyclin-Metaboliten - Nachweis und Bedeutung.

in: 36. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Dtsch. Veterinärmed. Ges., Teil II, Garmisch-Partenkirchen, 1995, 179-185

KÜHNE, M., u. A. EBRECHT (1993):

The detection of fluorescence in bones - a suitable screening for tetracyclines.

in: N. HAAGSMA, A. RUITER u. P. B. CZEDIK-EYSENBERG (Hrsg.): Proceedings of the EuroResidue II conference, Veldhoven, The Netherlands, 429-432

KÜHNE, M., G. HAMSCHER, U. KÖRNER, D. SCHEDL u. S. WENZEL (2001a):

Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal derived feed containing tetracycline.

Food Chemistry 75, 29-35

KÜHNE, M. u. U. KÖRNER (2001b):

Bound chlortetracycline residues in bones: release under acidic conditions.

Food Chemistry 72, 41-44

KÜHNE, M., S. WEGMANN, A. KOBE u. R. FRIES (2000):

Tetracycline residues in bones of slaughtered animals.

Food Control 11, 175-180

KÜHNE, M. u. S. WENZEL (2001c):

4-epi chlortetracycline residues in muscle.

Arch. Lebensmittelhyg. 52, 40-42

LOSEVA, G. I., u. N. I. SHUKAILO (1972):

Formation of anhydrotetracycline and 4-epianhydrotetracycline in tetracycline in varying temperature conditions.

Antibiotiki 17 (10), 895-898

MILCH, R. A., D. P. RALL u. J. E. TOBIC (1957):

Bone localisation of tetracyclines.

J. Nat. Can. Inst. 19, 87-91

MITSCHER, L. A. (1978):

The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics.

Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, S. 4-6, 123-125

(Medicinal Research Series Vol. 9)

OCKERMAN, H. W., u. C. L. HANSEN (1988):

Glue and gelatine.

In: Ellis Horwood Series in Food Science and Technologie.

VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 132-157

OKA, H., Y. ITO u. H. MATSUMOTO (2000):

Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods.

J. Chromatogr. A 882, 109-133

OLIVA, B., G. GORDON, P. McNICHOLAS, G. ELLESTAD u. I. CHOPRA (1992):

Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of Escherichia coli.

J. Antimicrob. Chemother. 36, 913-919

ORTH, P., F. CORDES, D. SCHNAPPINGER, W. HILLEN, W. SAENGER u. W. HINRICHS (1998):

Conformational changes of the tet repressor induced by tetracycline trapping.

J. Mol. Biol. 279, 439-447

OSTERMAIER, K. (2001):

Persönliche Mitteilung.

OTTEN, H., M. PLEMPEL u. W. SIEGENTHALER (Hrsg.) (1975):

Antibiotika-Fibel.

4. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 325

ROBERTS, M. C. (1996):

Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution.

FEMS Microbiol. Rev. 19, 1-24

ROGALSKI, W. (1985):

Chemical modification of the tetracyclines.

in: J. J. HLAVKA u. J. H. BOOTHE (Hrsg.): The Tetracyclines.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 179-326

(Handb. Exp. Pharm. 78)

ROSE, M. D., J. BYGRAVE, W. H. H. FARRINGTON u. G. SHEARER (1996):

The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4. Oxytetracycline.

Food Addit. Contam. 13, 275-286

ROSE, P.I. (1987):

Gelatin.

In: H.F. MARK (Hrsg.): Encyclopedia of Polymer Science and Engineering.

Wiley, London, Vol.7, 488-513

ROTH, J. (2001):

Persönliche Mitteilung.

SCHEDL, D. (2000):

Ein Beitrag zur Risikobewertung von Tetracyclin-Rückständen in Lebensmitteln: Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin gegenüber humaner Darmflora und zur Resistenzinduktion bei E. coli durch Anhydrotetracyclin und 4-Epi-Tetracyclin.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SCHNAPPINGER, D., u. W. HILLEN (1996):

Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms.

Arch. Microbiol. 165, 359-369

SCHOTT, A. (1996):

Speisegelatine. Herstellung, Eigenschaften und Einsatzgebiete.

Food Technologie Magazin, 3/1996

SCHRIEBER, R. (1988):

Speisegelatine.

in: R. HEISS (Hrsg.): Lebensmitteltechnologie.

Zweite Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 62-6

SMIT, L.A., N. HAAGSMA und A. RUITER (1999):

Bound sulphadimidine residues in raw fermented sausage: release under acidic conditions and bioavailability in rats.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, 208, 183-188

SPEER, B. S., L. BEDZYK u. A. A. SALYERS (1991):

Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two Bacteroides transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase.

J. Bacteriol. 173, 176-183

STAHLMANN, R. u. H. LODE (2001):

Antibiotika und Chemotherapeutika.

in: FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL, U. FÖRSTERMANN u. K. STARKE  
(Hrsg.):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

8. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 837-841

THANASSI, D. G., G. S. SUH u. H. NIKAIDO (1995):

Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 177, 998-1007

TROLLDENIER, H. (1999):

Antimikrobielle Tierarzneimittel: Resistenzentwicklung und Monitoring.

In: 23. Kongr. d. Dtsch. Veterinärmed. Ges., Bad Nauheim, 1999, Ber., 3-17

VARNAM, A. H., u. J. P. SUTHERLAND (1995):

Meat and meat products – technology, chemistry and microbiology.

Verlag Chapman & Hall, London, 126

WALTON, V. C., M. R. HOWLETT u. G. B. SELZER (1970):

Anhydrotetracycline and 4-epianhydrotetracycline in market tetracyclines and aged tetracycline products.

J. Pharm. Sci. 59, 1160-1164

WEIDENBERG, E. (2002):

Vergleich verschiedener Aufschlussverfahren zur Herstellung von Gelatine aus Knochen im Hinblick auf Rückstände von Tetracyclinen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

WHO (World Health Organisation) (1969):

Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antibiotics.

12<sup>th</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No 430, WHO Geneva, 38-41

WHO (World Health Organisation) (1996):

Evaluation of certain veterinary drugs residues in food.

45<sup>th</sup> report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 32-40

WHO (World Health Organisation) (1999):

Evaluation of certain veterinary drugs residues in food.

50<sup>th</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 50-54

YAMAGUCHI, A., T. UDAGAWA u. T. SAWAI (1990):

Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the Transposon Tn10-encoded Tetracycline resistance protein.

J. Biol. Chem. 265 (9), 4809-4813

YUEN, P. H., u. T. D. SOKOLOSKI (1977):

Kinetics of concomitant degradation of tetracycline to epitetracycline, anhydrotetracycline, and epianhydrotetracycline in acid phosphate solution.

J. Pharm. Sci. 66 (11), 1648-1650

ZURHELLE, G., M. PETZ, E. MÜLLER-SEITZ u. E. SIEWERT (1999):

Tetracyclines and their metabolites in egg white and yolk.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. A 108, 299-300

## **Gesetze und Verordnungen**

Verordnung (EWG) Nr. 2377/90

des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs.

Amtsbl. der EG Nr. L 224/1

Verordnung

vom 13. Dezember 2002 zur Festlegung lebensmittelhygienerechtlicher Anforderungen an die Herstellung, Behandlung und an das Inverkehrbringen von Speisegelatine und an deren Ausgangserzeugnisse (Speisegelatine-Verordnung - GELV).

Bundesgesetzbl. I, Nr. 85, S. 4583

Verordnung (EG) Nr. 1774/2002

des Europäischen Parlaments und des Rates vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte.

Amtsbl. der EG Nr. L 273/1

Richtlinie 92/118/EWG

des Rates vom 17. Dezember 1992 über die tierseuchenrechtlichen und gesundheitlichen Bedingungen für den Handel mit Erzeugnissen tierischen Ursprungs in der Gemeinschaft sowie für ihre Einfuhr in die Gemeinschaft, soweit sie diesbezüglich nicht den spezifischen Gemeinschaftsregelungen nach Anhang A Kapitel I der Richtlinie 89/662/EWG und - in bezug auf Krankheitserreger - der Richtlinie 90/425/EWG unterliegen.

Amtsbl. der EG Nr. L 62/49



Richtlinie 96/23/EG

des Rates über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG.

Amtsbl. der EG Nr. L 125/10

Entscheidung 1999/724/EG

der Kommission vom 28. Oktober 1999 zur Änderung des Anhangs II der Richtlinie 92/118/EWG des Rates über die tierseuchenrechtlichen und gesundheitlichen Bedingungen für den Handel mit Erzeugnissen tierischen Ursprungs in der Gemeinschaft sowie für ihre Einfuhr in die Gemeinschaft, soweit sie diesbezüglich nicht den spezifischen Gemeinschaftsregelungen nach Anhang A Kapitel I der Richtlinie 89/662/EWG und - in bezug auf Krankheitserreger - der Richtlinie 90/425/EWG unterliegen.

Amtsbl. der EG Nr. L 290/32

Entscheidung 2000/20/EG

der Kommission vom 10. Dezember 1999 über Genusstauglichkeitsbescheinigungen für die Einfuhr aus Drittländern von Speisegelatine und von Rohwaren zur Herstellung von Speisegelatine.

Amtsbl. der EG Nr. L 6/60

Gesetz

über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz - LMBG) vom 9. September 1997.

Bundesgesetzbl. I, Nr. 63, S. 2296

## 9 Anhang

### Anhang 1

Übersicht über die Wiederfindungsraten von Tetracyclinen in Knochen, Ossein, Gelatine und HCl:

**Tab. I: Wiederfindungsraten bei der Extraktion von Tetracyclinen aus Knochen und Ossein**

Tetracyclin	Probe	dotierte Menge [µg/ml]	wiedergefundene Menge [µg/ml]	Wiederfindungsrate [%]
<b>OTC</b>	1	5	3,2	64,4
	2	5	3,4	67,0
	3	5	3,1	61,7
	4	5	3,6	71,4
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,3</b>	<b>66,1</b>
<b>TC</b>	1	5	3,5	69,9
	2	5	3,3	65,4
	3	5	3,2	63,6
	4	5	3,2	63,2
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,3</b>	<b>65,5</b>
<b>E-TC</b>	1	5	2,9	58,6
	2	5	3,0	60,8
	3	5	3,1	61,1
	4	5	3,0	60,0
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,0</b>	<b>60,1</b>
<b>ATC</b>	1	5	2,4	47,5
	2	5	2,3	44,9
	3	5	2,2	44,7
	4	5	2,3	46,7
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>2,3</b>	<b>46,0</b>
<b>E-ATC</b>	1	5	2,4	47,7
	2	5	2,1	41,6
	3	5	2,1	42,5
	4	5	2,2	43,3
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>2,2</b>	<b>43,8</b>
<b>CTC</b>	1	10	5,1	50,6
	2	10	5,9	58,6
	3	10	4,9	49,3
	4	10	6,7	66,8
	<b>Mittelwert</b>	<b>10</b>	<b>5,6</b>	<b>56,3</b>
<b>E-CTC</b>	1	10	4,8	47,5
	2	10	5,0	49,8
	3	10	5,1	50,6
	4	10	4,7	46,9
	<b>Mittelwert</b>	<b>10</b>	<b>4,9</b>	<b>48,7</b>

Tab. II: Wiederfindungsraten bei der Extraktion von Tetracyclinen aus Gelatine

Tetracyclin	Probe	dotierte Menge	wiedergefundene Menge	Wiederfindungsrate
<b>OTC</b>	1	5	3,0	60,3
	2	5	3,1	62,2
	3	5	3,1	61,6
	4	5	3,6	72,4
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,2</b>	<b>64,1</b>
<b>TC</b>	1	5	3,1	61,6
	2	5	3,0	59,9
	3	5	3,9	77,4
	4	5	4,0	79,4
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,5</b>	<b>69,6</b>
<b>E-TC</b>	1	5	2,9	58,4
	2	5	2,5	50,2
	3	5	3,1	62,8
	4	5	3,4	67,8
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,0</b>	<b>59,8</b>
<b>ATC</b>	1	5	2,4	47,4
	2	5	2,3	46,1
	3	5	2,5	49,8
	4	5	2,3	45,2
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>2,4</b>	<b>47,1</b>
<b>E-ATC</b>	1	5	2,3	45,3
	2	5	2,2	44,1
	3	5	2,4	47,3
	4	5	2,2	44,5
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>2,3</b>	<b>45,3</b>
<b>CTC</b>	1	10	6,9	69,2
	2	10	5,6	55,7
	3	10	6,0	60,0
	4	10	6,1	60,9
	<b>Mittelwert</b>	<b>10</b>	<b>6,2</b>	<b>61,5</b>
<b>E-CTC</b>	1	10	4,6	45,8
	2	10	5,3	52,6
	3	10	5,7	57,4
	4	10	3,8	37,6
	<b>Mittelwert</b>	<b>10</b>	<b>4,8</b>	<b>48,4</b>

Tab. III: Wiederfindungsraten bei der Extraktion von Tetracyclinen aus HCl

Tetracyclin	Probe	dotierte [µg/ml]	wiedergefundene [µg/ml]	Wiederfindungsrate [%]
<b>OTC</b>	1	5	3,4	66,9
	2	5	2,7	54,8
	3	5	2,9	57,7
	4	5	3,2	64,5
	5	5	3,0	59,4
	6	5	3,1	62,0
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,0</b>	<b>60,9</b>
<b>TC</b>	1	5	3,1	61,7
	2	5	3,2	63,8
	3	5	3,2	64,4
	4	5	3,1	61,3
	5	5	3,1	62,6
	6	5	2,9	58,7
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,1</b>	<b>62,1</b>
<b>E-TC</b>	1	5	3,1	60,9
	2	5	3,3	66,9
	3	5	2,9	58,2
	4	5	2,9	57,9
	5	5	3,0	59,2
	6	5	3,4	68,8
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>3,1</b>	<b>62,0</b>
<b>ATC</b>	1	5	2,5	49,9
	2	5	2,2	44,3
	3	5	2,3	45,6
	4	5	2,3	45,2
	5	5	2,4	47,5
	6	5	2,3	45,8
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>2,3</b>	<b>46,4</b>
<b>E-ATC</b>	1	5	2,4	47,4
	2	5	2,0	39,4
	3	5	2,5	50,8
	4	5	2,4	47,2
	5	5	2,3	45,9
	6	5	2,5	50,7
	<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>2,3</b>	<b>46,9</b>
<b>CTC</b>	1	10	5,8	57,8
	2	10	5,5	54,9
	3	10	5,5	55,2
	4	10	5,6	56,1
	5	10	5,2	52,0
	6	10	5,4	53,7
	<b>Mittelwert</b>	<b>10</b>	<b>5,5</b>	<b>54,9</b>

---

<b>Tetracyclin</b>	<b>Probe</b>	<b>dotierte [µg/ml]</b>	<b>wiedergefundene [µg/ml]</b>	<b>Wiederfindungsrate [%]</b>
<b>E-CTC</b>	1	10	4,0	40,1
	2	10	4,3	43,0
	3	10	5,2	51,7
	4	10	4,3	43,3
	5	10	4,0	40,1
	6	10	4,4	43,8
	<b>Mittelwert</b>	<b>10</b>	<b>4,4</b>	<b>43,7</b>

**Anhang 2**

**Ergebnisse der Vorversuche zur Aufarbeitung von Knochen**

Knochen grob zermahlen, Korngröße 2-6 mm:

**Tab. IV: Tetracyclin-Gehalte der grob zermahlene Knochen (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für Knochen)**

<b>1. Extraktionstag</b>								
<b>Probe</b>	<b>OTC</b>	<b>e-TC</b>	<b>TC</b>	<b>e-CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>e-ATC</b>	<b>ATC</b>	<b>gesamt</b>
<b>1</b>	0,00	539	1396	222	1007	0,00	0,00	3164
<b>2</b>	146	854	2060	1215	1719	0,00	0,00	5994
<b>3</b>	205	623	1804	270	1430	0,00	0,00	4333
<b>4</b>	287	587	1544	822	788	0,00	0,00	4028
<b>5</b>	183	255	846	156	518	0,00	0,00	1958
<b>6</b>	143	510	1248	236	601	0,00	0,00	2738

<b>2. Extraktionstag</b>								
<b>Probe</b>	<b>OTC</b>	<b>e-TC</b>	<b>TC</b>	<b>e-CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>e-ATC</b>	<b>ATC</b>	<b>gesamt</b>
<b>1</b>	44,2	753	1795	1960	2988	0,00	452	7991
<b>2</b>	44,6	633	893	1664	1199	0,00	0,00	4434
<b>3</b>	0,00	350	711	1059	946	0,00	0,00	3067
<b>4</b>	39,7	476	1051	1094	1496	0,00	248	4404
<b>5</b>	32,9	583	790	1414	923	0,00	0,00	3744
<b>6</b>	32,3	347	745	1028	1719	0,00	0,00	3871

3. Extraktionstag								
Probe	OTC	e-TC	TC	e-CTC	CTC	e-ATC	ATC	gesamt
1	0,0	82,7	152	99,4	127	0,00	0,00	461
2	0,0	42,6	71,5	0,0	116	0,00	0,00	230
3	0,0	29,6	48,6	0,0	139	0,00	0,00	217
4	0,0	77,9	152	0,0	81,0	0,00	0,00	311
5	0,0	34,3	47,9	92,3	198	0,00	0,00	373
6	0,0	26,2	38,4	0,00	0,00	0,00	0,00	64,6

Knochen fein zermahlen, Korngröße 1-2 mm:

**Tab. V: Tetracyclin-Gehalte der fein zermahlenden Knochen (Angaben in µg/kg unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für Knochen)**

1. Extraktionstag								
Probe	OTC	e-TC	TC	e-CTC	CTC	e-ATC	ATC	gesamt
1	821	731	1922	131	1210	0,00	0,00	4815
2	469	1020	3208	161	1334	0,00	0,00	6191
3	54,6	806	2196	238	1391	0,00	0,00	4687
4	36,9	491	1127	617	999	0,00	0,00	3270
5	52,9	891	2196	1112	2007	0,00	0,00	6259
6	856	793	1396	926	1621	0,00	0,00	5592

2. Extraktionstag								
Probe	OTC	e-TC	TC	e-CTC	CTC	e-ATC	ATC	gesamt
1	121	188	354	202	445	0,00	145	1455
2	66,8	249	492	238	429	0,00	0,00	1474
3	0,00	371	835	510	962	0,00	162	2840
4	131	1009	1013	1129	1926	0,00	0,00	5208
5	31,2	566	1312	697	1267	0,00	0,00	3874
6	253	301	653	472	1002	0,00	0,00	2681

---

<b>3. Extraktionstag</b>								
<b>Probe</b>	<b>OTC</b>	<b>e-TC</b>	<b>TC</b>	<b>e-CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>e-ATC</b>	<b>ATC</b>	<b>gesamt</b>
<b>1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>4</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>5</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>6</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



**Anhang 3**

**Vergleich der Tetracyclin-Gehalte der Knochen vor und nach Trocknung**

**Tab. VI: Trockensubstanz-Gehalte in Knochen vor und nach Trocknung (Angaben in %)**

	Probe									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TS-Gehalt in Knochen, frisch [%]	66,9	67,4	66,5	65,6	69,4	67,7	66,7	65,4	65,3	67,9
TS-Gehalt in Knochen, getrocknet [%]	89,2	88,5	88,6	89,4	89,7	90,5	88,7	89,9	88,7	90,8

Tetracyclin-Gehalte in Knochen vor Trocknung :

**Tab. VII: Tetracyclin-Gehalte der frischen Knochen (Angaben in mg/kg, berechnet auf 100 % TS unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für Knochen)**

Probe	OTC	e-TC	TC	e-CTC	CTC	e-ATC	ATC	gesamt
<b>1</b>	0,00	2,83	5,37	4,08	5,05	0,37	1,29	19,0
<b>2</b>	0,00	1,36	2,34	2,28	2,79	0,23	0,75	9,74
<b>3</b>	0,22	1,77	2,02	1,99	1,34	0,71	0,98	9,02
<b>4</b>	0,65	1,46	1,94	2,08	1,82	0,32	0,27	8,54
<b>5</b>	0,15	0,88	2,19	1,58	3,35	0,39	1,00	9,55
<b>6</b>	0,10	1,17	2,97	4,05	6,52	0,50	1,14	16,4
<b>7</b>	0,29	2,35	3,31	5,12	5,01	0,28	0,86	17,2
<b>8</b>	0,57	1,84	3,95	6,40	4,61	0,35	1,08	18,8
<b>9</b>	0,69	0,99	2,31	3,42	3,02	0,22	0,80	11,5
<b>10</b>	0,25	1,00	2,52	3,49	4,14	0,26	0,97	12,6

Tetracyclin-Gehalte in Knochen nach Trocknung :

**Tab. VIII: Tetracyclin-Gehalte der getrockneten Knochen (Angaben in mg/kg, berechnet auf 100 % TS unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für Knochen)**

Probe	OTC	e-TC	TC	e-CTC	CTC	e-ATC	ATC	gesamt
1	0,87	1,27	3,23	1,73	2,07	0,20	0,70	10,07
2	0,32	1,57	4,25	0,38	1,76	0,29	1,07	9,63
3	0,21	1,52	3,54	2,23	2,83	0,31	1,19	11,8
4	0,28	1,43	3,10	2,23	2,62	0,24	0,86	10,8
5	1,52	1,63	3,67	0,72	3,14	0,13	0,42	11,2
6	0,86	2,25	5,96	0,86	3,35	0,19	0,62	14,1
7	0,12	2,05	4,80	1,59	4,39	0,17	0,59	13,7
8	0,27	2,61	5,62	3,72	5,46	0,20	0,65	18,5
9	0,13	2,55	5,58	3,88	6,14	0,19	0,62	19,1
10	1,77	1,92	3,27	3,00	4,93	0,13	0,35	15,4

Tetracyclin-Gehalte der für die Gelatineherstellung verwendeten Knochen

**Tab. IX: Tetracyclin-Gehalte der für die Gelatineherstellung verwendeten Knochen (Angaben in mg/750 g unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für Knochen)**

Probe	OTC	E-TC	TC	E-CTC	CTC	E-ATC	ATC	gesamt
1	0,59	0,86	2,19	1,17	1,41	0,14	0,47	6,83
2	0,22	1,07	2,89	0,26	1,19	0,19	0,73	6,55
3	1,07	1,15	2,59	0,51	2,22	0,09	0,30	7,92
4	0,61	1,59	4,20	0,61	2,36	0,13	0,43	9,94
5	0,09	1,47	3,44	1,14	3,15	0,12	0,42	9,85
6	0,19	1,88	4,03	2,67	3,92	0,14	0,46	13,3
7	0,10	1,82	3,99	2,77	4,39	0,14	0,44	13,6
8	1,26	1,37	2,33	2,14	3,51	0,10	0,25	11,0

## Anhang 4

### Volumen, pH-Werte und Dichte der Säure aus der Mazeration

#### Volumen:

**Tab. X: Volumen der Säure aus der Mazeration (Angaben in ml)**

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
<b>Probe 1</b>	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Probe 2</b>	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Probe 3</b>	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Probe 4</b>	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Probe 5</b>	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Probe 6</b>	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Probe 7</b>	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Probe 8</b>	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000

#### pH-Werte:

**Tab. XI: pH-Werte der Säure aus der Mazeration**

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
<b>Probe 1</b>	2,21	1,50	0,83	0,50	0,00	0,00	0,55
<b>Probe 2</b>	2,25	1,53	0,91	0,50	0,00	0,00	0,55
<b>Probe 3</b>	2,20	1,50	0,92	0,55	0,00	0,00	0,55
<b>Probe 4</b>	2,22	1,59	1,03	0,50	0,00	0,00	0,55
<b>Probe 5</b>	2,23	1,53	0,90	0,54	0,00	0,00	0,55
<b>Probe 6</b>	2,22	1,51	0,93	0,50	0,00	0,00	0,55
<b>Probe 7</b>	2,26	1,54	1,01	0,50	0,00	0,00	0,55
<b>Probe 8</b>	2,18	1,53	1,03	0,50	0,00	0,00	0,55

Dichte:

**Tab. XII: Dichte der Säure aus der Mazeration (Angaben in g/ml)**

	<b>1. Tag</b>	<b>2. Tag</b>	<b>3. Tag</b>	<b>4. Tag</b>	<b>5. Tag</b>	<b>6. Tag</b>	<b>7. Tag</b>
<b>Probe 1</b>	1,1050	1,1300	1,1100	1,0700	1,0500	1,0350	1,0050
<b>Probe 2</b>	1,1050	1,1300	1,1150	1,0750	1,0500	1,0350	1,0050
<b>Probe 3</b>	1,1050	1,1300	1,1150	1,0750	1,0500	1,0300	1,0050
<b>Probe 4</b>	1,1050	1,1300	1,1200	1,0800	1,0500	1,0350	1,0050
<b>Probe 5</b>	1,1050	1,1300	1,1150	1,0750	1,0500	1,0350	1,0050
<b>Probe 6</b>	1,1050	1,1300	1,1150	1,0800	1,0500	1,0300	1,0050
<b>Probe 7</b>	1,1050	1,1300	1,1150	1,0750	1,0500	1,0350	1,0050
<b>Probe 8</b>	1,1050	1,1300	1,1200	1,0750	1,0500	1,0350	1,0050

**Anhang 5**

**Ergebnisse der HPLC-Untersuchung der Säure aus der Mazeration**

Absolute Tetracyclin-Gehalte:

**Tab. XIII: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 1. Tag der Mazeration (Angaben in µg/750 ml unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für HCl)**

<b>Probe</b>	<b>OTC</b>	<b>E-TC</b>	<b>TC</b>	<b>E-CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>E-ATC</b>	<b>ATC</b>	<b>gesamt</b>
<b>1</b>	72,7	150	362	92,2	240	38,9	168	1124
<b>2</b>	96,5	142	340	124	272	18,0	93,4	1086
<b>3</b>	51,1	132	337	143	305	37,5	193	1199
<b>4</b>	51,9	151	299	184	291	50,9	193	1220
<b>5</b>	34,5	126	314	145	300	29,0	158	1106
<b>6</b>	42,5	135	368	185	413	29,0	163	1336
<b>7</b>	67,8	167	378	207	381	44,2	210	1455
<b>8</b>	48,1	178	383	169	319	51,0	202	1350
<b>Median</b>	51,5	146	351	157	303	38,2	180	1210
<b>25. Pztl.</b>	46,7	135	331	139	286	29,0	162	1120
<b>75. Pztl.</b>	69,1	155	370	184	335	45,9	196	1340
<b>Min.</b>	34,5	126	299	92	240	18,0	93,4	1086
<b>Max.</b>	96,5	178	383	207	413	51,0	210	1455

**Tab. XIV: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 2. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für HCl)**

<b>Probe</b>	<b>OTC</b>	<b>E-TC</b>	<b>TC</b>	<b>E-CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>E-ATC</b>	<b>ATC</b>	<b>gesamt</b>
<b>1</b>	81,0	110	216	207	275	38,7	159	1086
<b>2</b>	57,7	121	262	187	226	38,0	181	1072
<b>3</b>	39,7	116	259	187	269	38,4	184	1094
<b>4</b>	28,9	97	199	182	216	27,1	105	856
<b>5</b>	28,6	116	252	225	274	39,9	208	1143
<b>6</b>	42,1	141	337	275	447	41,5	214	1498
<b>7</b>	70,1	210	410	458	510	71,7	259	1988
<b>8</b>	38,9	203	417	394	483	58,1	254	1848
<i>Median</i>	<i>40,9</i>	<i>118</i>	<i>260</i>	<i>216</i>	<i>274</i>	<i>39,3</i>	<i>196</i>	<i>1119</i>
<i>25. Pztl.</i>	<i>36,4</i>	<i>115</i>	<i>243</i>	<i>187</i>	<i>258</i>	<i>38,3</i>	<i>176</i>	<i>1083</i>
<i>75. Pztl.</i>	<i>60,8</i>	<i>156</i>	<i>356</i>	<i>305</i>	<i>456</i>	<i>45,6</i>	<i>224</i>	<i>1585</i>
<i>Min.</i>	<i>28,6</i>	<i>97,3</i>	<i>199</i>	<i>182</i>	<i>216</i>	<i>27,1</i>	<i>105</i>	<i>856</i>
<i>Max.</i>	<i>81,0</i>	<i>210</i>	<i>417</i>	<i>458</i>	<i>510</i>	<i>71,7</i>	<i>259</i>	<i>1988</i>

**Tab. XV: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 3. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für HCl)**

<b>Probe</b>	<b>OTC</b>	<b>E-TC</b>	<b>TC</b>	<b>E-CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>E-ATC</b>	<b>ATC</b>	<b>gesamt</b>
<b>1</b>	68,6	104	191	226	335	73,8	315	1313
<b>2</b>	49,6	108	239	166	285	49,7	247	1144
<b>3</b>	44,1	138	262	287	397	94,6	393	1617
<b>4</b>	44,8	124	258	259	402	66,9	335	1489
<b>5</b>	32,1	131	271	266	385	88,8	395	1569
<b>6</b>	40,9	140	280	353	509	84,9	362	1770
<b>7</b>	59,3	203	392	403	544	107	422	2130
<b>8</b>	62,4	187	386	371	581	93,8	454	2135
<i>Median</i>	<i>47,2</i>	<i>135</i>	<i>267</i>	<i>276</i>	<i>400</i>	<i>86,9</i>	<i>378</i>	<i>1593</i>
<i>25. Pztl.</i>	<i>43,3</i>	<i>120</i>	<i>253</i>	<i>251</i>	<i>372</i>	<i>72,1</i>	<i>330</i>	<i>1445</i>
<i>75. Pztl.</i>	<i>60,1</i>	<i>152</i>	<i>306</i>	<i>358</i>	<i>518</i>	<i>94,0</i>	<i>402</i>	<i>1860</i>
<i>Min.</i>	<i>32,1</i>	<i>104</i>	<i>191</i>	<i>166</i>	<i>285</i>	<i>49,7</i>	<i>247</i>	<i>1144</i>
<i>Max.</i>	<i>68,6</i>	<i>203</i>	<i>392</i>	<i>403</i>	<i>581</i>	<i>107</i>	<i>454</i>	<i>2135</i>

**Tab. XVI: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 4. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für HCl)**

<b>Probe</b>	<b>OTC</b>	<b>E-TC</b>	<b>TC</b>	<b>E-CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>E-ATC</b>	<b>ATC</b>	<b>gesamt</b>
<b>1</b>	67,6	3,8	5,0	224	361	135	608	1404
<b>2</b>	46,8	16,1	22,6	267	428	149	795	1723
<b>3</b>	37,5	12,8	16,2	224	446	136	749	1621
<b>4</b>	58,8	14,8	26,5	235	432	130	664	1561
<b>5</b>	26,0	8,7	9,7	177	334	193	1048	1797
<b>6</b>	29,7	12,0	22,1	265	470	201	1029	2028
<b>7</b>	64,2	9,6	17,7	226	422	149	703	1592
<b>8</b>	33,7	10,6	14,3	190	373	143	800	1564
<i>Median</i>	<i>42,1</i>	<i>11,3</i>	<i>16,9</i>	<i>225</i>	<i>425</i>	<i>146</i>	<i>772</i>	<i>1606</i>
<i>25. Pztl.</i>	<i>32,7</i>	<i>9,4</i>	<i>13,1</i>	<i>215</i>	<i>370</i>	<i>136</i>	<i>693</i>	<i>1563</i>
<i>75. Pztl.</i>	<i>60,1</i>	<i>13,3</i>	<i>22,2</i>	<i>243</i>	<i>436</i>	<i>160</i>	<i>857</i>	<i>1742</i>
<i>Min.</i>	<i>26,0</i>	<i>3,8</i>	<i>5,0</i>	<i>177</i>	<i>334</i>	<i>130</i>	<i>608</i>	<i>1404</i>
<i>Max.</i>	<i>67,6</i>	<i>16,1</i>	<i>26,5</i>	<i>267</i>	<i>470</i>	<i>201</i>	<i>1048</i>	<i>2028</i>

**Tab. XVII: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 5. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für HCl)**

<b>Probe</b>	<b>OTC</b>	<b>E-TC</b>	<b>TC</b>	<b>E-CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>E-ATC</b>	<b>ATC</b>	<b>gesamt</b>
<b>1</b>	44,5	3,9	0,0	143	261	100	397	949
<b>2</b>	24,9	3,0	0,0	111	250	115	571	1074
<b>3</b>	11,2	2,8	0,0	121	187	153	616	1090
<b>4</b>	30,5	3,7	0,0	182	282	151	636	1285
<b>5</b>	11,0	2,3	0,0	157	240	144	636	1191
<b>6</b>	15,4	4,6	0,0	229	341	169	666	1425
<b>7</b>	24,9	5,2	0,0	203	393	188	983	1797
<b>8</b>	19,3	5,3	0,0	196	320	235	985	1760
<i>Median</i>	<i>22,1</i>	<i>3,8</i>	<i>0,0</i>	<i>170</i>	<i>272</i>	<i>152</i>	<i>636</i>	<i>1238</i>
<i>25. Pztl.</i>	<i>14,3</i>	<i>3,0</i>	<i>0,0</i>	<i>138</i>	<i>247</i>	<i>137</i>	<i>605</i>	<i>1086</i>
<i>75. Pztl.</i>	<i>26,3</i>	<i>4,7</i>	<i>0,0</i>	<i>198</i>	<i>325</i>	<i>174</i>	<i>745</i>	<i>1509</i>
<i>Min.</i>	<i>11,0</i>	<i>2,3</i>	<i>0,0</i>	<i>111</i>	<i>187</i>	<i>100</i>	<i>397</i>	<i>949</i>
<i>Max.</i>	<i>44,5</i>	<i>5,3</i>	<i>0,0</i>	<i>229</i>	<i>393</i>	<i>235</i>	<i>985</i>	<i>1797</i>

Tab. XVIII: Tetracyclin-Gehalte in HCl aus dem 6. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für HCl)

Probe	OTC	E-TC	TC	E-CTC	CTC	E-ATC	ATC	gesamt
1	15,00	0,0	0,0	65,6	114	73,5	414	682
2	11,40	0,0	0,0	63,8	108	89,7	426	699
3	5,5	0,0	0,0	61,2	118	86,4	489	761
4	14,70	0,0	0,0	89,0	142	112	540	898
5	6,3	0,0	0,0	65,4	139	98	539	847
6	9,7	0,0	0,0	122	219	124	619	1094
7	10,30	0,0	0,0	103	207	138	756	1215
8	11,80	0,0	0,0	100	218	111	595	1036
<i>Median</i>	<i>10,80</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>77,3</i>	<i>140</i>	<i>105</i>	<i>540</i>	<i>873</i>
<i>25. Pztl.</i>	<i>8,8</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>65,0</i>	<i>117</i>	<i>88,9</i>	<i>474</i>	<i>745</i>
<i>75. Pztl.</i>	<i>12,50</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>101</i>	<i>210</i>	<i>115</i>	<i>601</i>	<i>1050</i>
<i>Min.</i>	<i>5,5</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>61,2</i>	<i>108</i>	<i>73,5</i>	<i>414</i>	<i>682</i>
<i>Max.</i>	<i>15,00</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>122</i>	<i>219</i>	<i>138</i>	<i>756</i>	<i>1215</i>

Tab. XIX: Tetracyclin-Gehalte in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aus dem 7. Tag der Mazeration (Angaben in µg/l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für HCl)

Probe	OTC	E-TC	TC	E-CTC	CTC	E-ATC	ATC	gesamt
1	5,3	0,0	0,0	28,1	38,0	45,7	166	283
2	2,7	0,0	0,0	23,5	36,6	63,3	239	365
3	2,1	0,0	0,0	27,3	58,9	56,4	297	442
4	2,7	0,0	0,0	20,8	32,6	42,3	194	292
5	3,1	0,0	0,0	44,4	80,7	86,2	415	629
6	6,7	0,0	0,0	56,9	74,1	98,0	359	594
7	5,1	0,0	0,0	59,8	98,5	96,9	466	726
8	3,2	0,0	0,0	72,1	99,8	87,4	426	689
<i>Median</i>	<i>3,1</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>36,2</i>	<i>66,5</i>	<i>74,7</i>	<i>328</i>	<i>518</i>
<i>25. Pztl.</i>	<i>2,7</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>26,4</i>	<i>37,6</i>	<i>53,8</i>	<i>228</i>	<i>347</i>
<i>75. Pztl.</i>	<i>5,2</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>57,6</i>	<i>85,1</i>	<i>89,8</i>	<i>418</i>	<i>644</i>
<i>Min.</i>	<i>2,1</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>20,8</i>	<i>32,6</i>	<i>42,3</i>	<i>166</i>	<i>283</i>
<i>Max.</i>	<i>6,7</i>	<i>0,0</i>	<i>0,0</i>	<i>72,1</i>	<i>99,8</i>	<i>98,0</i>	<i>466</i>	<i>726</i>



Prozentualer Verlauf der Freisetzung der einzelnen Tetracycline in die Säure während der Mazeration (Berechnung aus den Daten der Tab. XIII-XIX):

**Tab. XX: Prozentuale Freisetzung von OTC (Angaben in %)**

<b>Probe</b>	<b>1. Tag</b>	<b>2. Tag</b>	<b>3. Tag</b>	<b>4. Tag</b>	<b>5. Tag</b>	<b>6. Tag</b>	<b>7. Tag</b>	<b>Summe</b>
<b>1</b>	20,5	22,8	19,3	19,1	12,60	4,2	1,5	100
<b>2</b>	33,3	19,9	17,1	16,2	8,6	3,9	1,0	100
<b>3</b>	26,7	20,8	23,1	19,6	5,8	2,9	1,1	100
<b>4</b>	22,3	12,4	19,3	25,3	13,10	6,3	1,2	100
<b>5</b>	24,4	20,2	22,7	18,4	7,8	4,4	2,2	100
<b>6</b>	22,8	22,5	21,9	15,9	8,2	5,2	3,6	100
<b>7</b>	22,5	23,2	19,7	21,3	8,2	3,4	1,7	100
<b>8</b>	22,1	17,9	28,7	15,5	8,9	5,4	1,5	100
<b>Median</b>	22,6	20,5	20,8	18,7	8,4	4,3	1,5	
<b>25. Pztl.</b>	22,3	19,4	19,3	16,1	8,1	3,8	1,2	
<b>75. Pztl.</b>	25,0	22,6	22,8	20,0	9,8	5,2	1,8	
<b>Min.</b>	20,5	12,4	17,1	15,5	5,8	2,9	1,0	
<b>Max.</b>	33,3	23,2	28,7	25,3	13,10	6,3	3,6	

**Tab. XXI: Prozentuale Freisetzung von E-TC (Angaben in %)**

<b>Probe</b>	<b>1. Tag</b>	<b>2. Tag</b>	<b>3. Tag</b>	<b>4. Tag</b>	<b>5. Tag</b>	<b>6. Tag</b>	<b>7. Tag</b>	<b>Summe</b>
<b>1</b>	40,3	29,6	28,0	1,0	1,0	0,0	1,0	100
<b>2</b>	36,5	31,0	27,6	4,1	0,8	0,0	4,1	100
<b>3</b>	35,6	27,7	33,0	3,0	0,7	0,0	3,0	100
<b>4</b>	38,6	24,9	31,8	3,8	1,0	0,0	3,8	100
<b>5</b>	32,8	30,2	34,2	2,3	0,6	0,0	2,3	100
<b>6</b>	31,3	32,6	32,3	2,8	1,1	0,0	2,8	100
<b>7</b>	28,1	35,3	34,1	1,6	0,9	0,0	1,6	100
<b>8</b>	30,5	34,8	32,1	1,8	0,9	0,0	1,8	100
<b>Median</b>	34,2	30,6	32,2	2,5	0,9	0,0	2,5	
<b>25. Pztl.</b>	31,1	29,2	30,8	1,8	0,8	0,0	1,8	
<b>75. Pztl.</b>	37,0	33,1	33,3	3,2	1,0	0,0	3,2	
<b>Min.</b>	28,1	24,9	27,6	1,0	0,6	0,0	1,0	
<b>Max.</b>	40,3	35,3	34,2	4,1	1,1	0,0	4,1	

## Anhang

**Tab. XXII: Prozentuale Freisetzung von TC (Angaben in %)**

<b>Probe</b>	<b>1. Tag</b>	<b>2. Tag</b>	<b>3. Tag</b>	<b>4. Tag</b>	<b>5. Tag</b>	<b>6. Tag</b>	<b>7. Tag</b>	<b>Summe</b>
<b>1</b>	46,8	27,9	24,7	0,7	0,0	0,0	0,7	100
<b>2</b>	39,4	30,3	27,7	2,6	0,0	0,0	2,6	100
<b>3</b>	40,8	28,6	28,9	1,8	0,0	0,0	1,8	100
<b>4</b>	38,3	25,4	32,9	3,4	0,0	0,0	3,4	100
<b>5</b>	37,1	29,7	32,1	1,2	0,0	0,0	1,2	100
<b>6</b>	36,5	33,5	27,8	2,2	0,0	0,0	2,2	100
<b>7</b>	31,6	34,3	32,7	1,5	0,0	0,0	1,5	100
<b>8</b>	31,9	34,8	32,2	1,2	0,0	0,0	1,2	100
<b>Median</b>	37,7	30,0	30,5	1,6	0,0	0,0	1,6	
<b>25. Pztl.</b>	35,4	28,4	27,8	1,2	0,0	0,0	1,2	
<b>75. Pztl.</b>	39,8	33,7	32,3	2,3	0,0	0,0	2,3	
<b>Min.</b>	31,6	25,4	24,7	0,7	0,0	0,0	0,7	
<b>Max.</b>	46,8	34,8	32,9	3,4	0,0	0,0	3,4	

**Tab. XXIII: Prozentuale Freisetzung von E-ATC**

<b>Probe</b>	<b>1. Tag</b>	<b>2. Tag</b>	<b>3. Tag</b>	<b>4. Tag</b>	<b>5. Tag</b>	<b>6. Tag</b>	<b>7. Tag</b>	<b>Summe</b>
<b>1</b>	7,7	7,7	14,6	26,7	19,7	14,5	9,1	100
<b>2</b>	3,5	7,3	9,5	28,4	22,0	17,2	12,1	100
<b>3</b>	6,2	6,4	15,7	22,6	25,4	14,4	9,4	100
<b>4</b>	8,8	4,7	11,5	22,4	26,0	19,3	7,3	100
<b>5</b>	4,3	5,9	13,1	28,5	21,2	14,4	12,7	100
<b>6</b>	3,9	5,6	11,4	26,9	22,7	16,6	13,1	100
<b>7</b>	5,6	9,0	13,4	18,8	23,6	17,4	12,2	100
<b>8</b>	6,6	7,5	12,1	18,3	30,1	14,3	11,2	100
<b>Median</b>	5,9	6,8	12,6	24,7	23,1	15,5	11,7	
<b>25. Pztl.</b>	4,2	5,8	11,5	21,5	21,8	14,4	9,3	
<b>75. Pztl.</b>	6,8	7,5	13,7	27,3	25,5	17,2	12,3	
<b>Min.</b>	3,5	4,7	9,5	18,3	19,7	14,3	7,3	
<b>Max.</b>	8,8	9,0	15,7	28,5	30,1	19,3	13,1	

Tab. XXIV: Prozentuale Freisetzung von ATC

Probe	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	Summe
1	7,6	7,2	14,2	27,3	17,8	18,6	7,5	100
2	3,7	7,1	9,7	31,1	22,4	16,7	9,4	100
3	6,6	6,3	13,5	25,6	21,1	16,8	10,2	100
4	7,2	4,0	12,6	24,9	23,9	20,3	7,3	100
5	4,6	6,1	11,6	30,9	18,7	15,9	12,2	100
6	4,8	6,3	10,6	30,2	19,5	18,2	10,5	100
7	5,5	6,8	11,1	18,5	25,9	19,9	12,3	100
8	5,5	6,8	12,2	21,5	26,5	16,0	11,5	100
<i>Median</i>	5,5	6,6	11,9	26,5	21,7	17,5	10,3	
<i>25. Pztl.</i>	4,8	6,2	11,0	24,1	19,3	16,5	8,9	
<i>75. Pztl.</i>	6,8	6,9	12,8	30,3	24,4	18,9	11,7	
<i>Min.</i>	3,7	4,0	9,7	18,5	17,8	15,9	7,3	
<i>Max.</i>	7,6	7,2	14,2	31,1	26,5	20,3	12,3	

Tab. XXV: Prozentuale Freisetzung von E-CTC (Angaben in %)

Probe	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	Summe
1	9,4	21,0	22,9	22,7	14,5	6,7	2,9	100
2	13,1	19,8	17,7	28,3	11,8	6,8	2,5	100
3	14,7	17,6	27,0	21,0	11,4	5,8	2,6	100
4	16,0	15,8	22,5	20,4	15,8	7,7	1,8	100
5	13,4	20,8	24,6	16,4	14,6	6,1	4,1	100
6	12,5	18,5	23,8	17,8	15,4	8,2	3,8	100
7	12,5	27,6	24,3	13,6	12,3	6,2	3,6	100
8	11,4	26,4	24,9	12,7	13,1	6,7	4,8	100
<i>Median</i>	12,8	20,3	24,0	19,1	13,8	6,7	3,2	
<i>25. Pztl.</i>	12,2	18,3	22,8	15,7	12,1	6,2	2,6	
<i>75. Pztl.</i>	13,7	22,3	24,7	21,5	14,8	7,0	3,9	
<i>Min.</i>	9,4	15,8	17,7	12,7	11,4	5,8	1,8	
<i>Max.</i>	16,0	27,6	27,0	28,3	15,8	8,2	4,8	

Tab. XXVI: Prozentuale Freisetzung von CTC (Angaben in %)

<b>Probe</b>	<b>1. Tag</b>	<b>2. Tag</b>	<b>3. Tag</b>	<b>4. Tag</b>	<b>5. Tag</b>	<b>6. Tag</b>	<b>7. Tag</b>	<b>Summe</b>
<b>1</b>	14,8	16,9	20,6	22,2	16,1	7,0	2,3	100,0
<b>2</b>	17,0	14,1	17,8	26,7	15,6	6,7	2,3	100,0
<b>3</b>	18,2	14,9	22,0	24,7	10,4	6,6	3,3	100,0
<b>4</b>	16,2	12,0	22,4	24,1	15,7	7,9	1,8	100,0
<b>5</b>	17,1	15,7	22,0	19,1	13,7	7,9	4,6	100,0
<b>6</b>	16,7	18,1	20,6	19,0	13,8	8,8	3,0	100,0
<b>7</b>	14,9	20,0	21,3	16,5	15,4	8,1	3,9	100,0
<b>8</b>	13,3	20,2	24,3	15,6	13,4	9,1	4,2	100,0
<b>Median</b>	<i>16,4</i>	<i>16,3</i>	<i>21,6</i>	<i>20,6</i>	<i>14,6</i>	<i>7,9</i>	<i>3,1</i>	
<b>25. Pztl.</b>	<i>14,9</i>	<i>14,7</i>	<i>20,6</i>	<i>18,4</i>	<i>13,6</i>	<i>7,0</i>	<i>2,3</i>	
<b>75. Pztl.</b>	<i>17,0</i>	<i>18,6</i>	<i>22,1</i>	<i>24,2</i>	<i>15,6</i>	<i>8,3</i>	<i>3,9</i>	
<b>Min.</b>	<i>13,3</i>	<i>12,0</i>	<i>17,8</i>	<i>15,6</i>	<i>10,4</i>	<i>6,6</i>	<i>1,8</i>	
<b>Max.</b>	<i>18,2</i>	<i>20,2</i>	<i>24,3</i>	<i>26,7</i>	<i>16,1</i>	<i>9,1</i>	<i>4,6</i>	

**Anhang 6**

**Gesamt-Tetracyclin-Gehalte in Knochen und Säure aus der Mazeration**

Knochen:

**Tab. XXVII: Tetracyclin-Gehalte in Knochen vor der Mazeration (Angaben in mg/750 g unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für Knochen)**

Probe	OTC	E-TC	TC	E-CTC	CTC	E-ATC	ATC	gesamt
1	0,59	0,86	2,19	1,17	1,41	0,14	0,47	6,83
2	0,22	1,07	2,89	0,26	1,19	0,19	0,73	6,55
3	1,07	1,15	2,59	0,51	2,22	0,09	0,30	7,92
4	0,61	1,59	4,20	0,61	2,36	0,13	0,43	9,94
5	0,09	1,47	3,44	1,14	3,15	0,12	0,42	9,85
6	0,19	1,88	4,03	2,67	3,92	0,14	0,46	13,3
7	0,10	1,82	3,99	2,77	4,39	0,14	0,44	13,6
8	1,26	1,37	2,33	2,14	3,51	0,10	0,25	11,0

Säure aus der Mazeration:

**Tab. XXVIII: Tetracyclin-Gehalte in HCl und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Angaben in mg/6,75 l unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für HCl)**

Probe	OTC	E-TC	TC	E-CTC	CTC	E-ATC	ATC	gesamt
1	0,35	0,37	0,77	0,99	1,62	0,51	2,23	6,84
2	0,29	0,39	0,86	0,94	1,60	0,52	2,55	7,16
3	0,19	0,42	0,91	1,06	1,80	0,60	2,92	7,91
4	0,23	0,39	0,78	1,15	1,80	0,58	2,67	7,60
5	0,14	0,38	0,85	1,08	1,75	0,68	3,40	8,28
6	0,19	0,43	1,01	1,49	2,47	0,75	3,41	9,75
7	0,30	0,59	1,20	1,66	2,56	0,80	3,80	10,9
8	0,22	0,58	1,20	1,49	2,39	0,78	3,72	10,4

## Anhang 7

## Ergebnisse der Untersuchungen zum Ionenaustausch

Bestimmung der Wiederfindungsraten:

Tab. XXIX: Wiederfindungsraten bei der Extraktion von Tetracyclinen aus Gelatineproben

Tetracyclin	Probe	dotierte Menge [µg]	wiedergefundene Menge [µg]	Wieder- findungsrate [%]
TC	1	20	13,3	66,5
	2	20	14,7	73,5
	3	20	13,9	69,4
	4	20	11,9	59,6
	5	20	12,9	64,5
	6	20	14,4	72,0
	7	20	15,6	78,1
	8	20	14,0	69,9
	MW	<b>20</b>	<b>13,8</b>	<b>69,2</b>
ATC	1	20	9,1	45,3
	2	20	9,0	45,1
	3	20	9,5	47,5
	4	20	10,3	51,5
	5	20	9,8	49,0
	6	20	9,1	45,5
	7	20	9,8	49,2
	8	20	10,2	50,7
	MW	<b>20</b>	<b>9,6</b>	<b>48,0</b>

TC- und ATC-Gehalte in Gelatine nach Ionenaustausch:

Tab. XXX: Übersicht über den Gehalt (Angaben in µg/ml unter Berücksichtigung der Wiederfindungsra-  
ten in Tab. XXIX) und die Reduktion (Angaben in %) von TC und ATC in Gelatine nach Ionenaustausch

K=Kationenaustausch, A=Anionenaustausch; KA=kombinierter Kationen- und Anionenaustausch

Probe	TC		ATC	
	µg/ml	Red. auf %	µg/ml	Red. auf %
<b>K 1</b>	6,6	47,3	2,0	20,6
<b>K 2</b>	5,6	40,1	2,4	25,5
<b>K 3</b>	7,1	51,2	1,6	16,7
<b>K 4</b>	5,7	41,1	2,4	24,5
<b>K 5</b>	7,3	52,6	2,1	22,3
<b>K 6</b>	6,7	48,4	1,7	17,2
<b>K 7</b>	6,0	43,3	1,7	18,0
<b>K 8</b>	7,1	51,3	1,8	18,9
<i>Median</i>	6,6	47,9	1,9	19,7
<i>25. Pztl.</i>	5,9	42,7	1,7	17,8
<i>75. Pztl.</i>	7,1	51,3	2,2	22,8
<i>Min.</i>	5,6	40,1	1,6	16,7
<i>Max.</i>	7,3	52,6	2,4	25,5
<b>A 1</b>	2,6	18,9	0,0	0,0
<b>A 2</b>	3,3	24,1	0,0	0,0
<b>A 3</b>	2,7	19,6	0,0	0,0
<b>A 4</b>	2,8	20,0	0,0	0,0
<b>A 5</b>	3,1	22,0	0,0	0,0
<b>A 6</b>	2,5	18,0	0,0	0,0
<b>A 7</b>	3,9	28,2	0,0	0,0
<b>A 8</b>	2,4	17,4	0,0	0,0
<i>Median</i>	2,7	19,8	0,0	0,0
<i>25. Pztl.</i>	2,6	18,7	0,0	0,0
<i>75. Pztl.</i>	3,1	22,5	0,0	0,0

## Anhang

---

<i>Min.</i>	2,4	17,4	0,0	0,0
<i>Max.</i>	3,9	28,2	0,0	0,0
<b>KA 1</b>	0,8	5,8	0,0	0,0
<b>KA 2</b>	0,3	2,4	0,0	0,0
<b>KA 3</b>	0,3	2,4	0,0	0,0
<b>KA 4</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>KA 5</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>KA 6</b>	0,5	3,7	0,0	0,0
<b>KA 7</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>KA 8</b>	0,4	3,0	0,0	0,0
<i>Median</i>	0,3	2,4	0,0	0,0
<i>25. Pztl.</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>75. Pztl.</i>	0,4	3,2	0,0	0,0
<i>Min.</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Max.</i>	0,8	5,8	0,0	0,0



## Anhang 8

### Verzeichnis der Hersteller

Acros Organics  
B-2440 Geel (Belgien)

ART Labortechnik  
79379 Müllheim-Hügelheim

Büchi Laboratoriumstechnik GmbH  
78467 Konstanz

Carl Roth GmbH & Co KG  
76185 Karlsruhe

Christian Wagner KG  
Metallwarenfabrik  
73730 Esslingen

Culatti AG  
8005 Zürich

Heraeus Holding GmbH  
63450 Hanau

Hermle Labortechnik GmbH  
78564 Wehingen

Jürgens GmbH & Co  
30159 Hannover

Knauer GmbH  
14163 Berlin-Zehlendorf

Köttermann GmbH  
31311 Uetze/Hänigsen

LAT (Labor- und Analystechnik GmbH)  
30827 Garbsen

Macherey-Nagel GmbH & Co KG  
52355 Düren

Martin Christ  
Gefriertrocknungsanlagen GmbH  
37520 Osterode

Merck Eurolab GmbH  
64271 Darmstadt

Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co KG  
28359 Bremen

Shimadzu Deutschland GmbH  
47262 Duisburg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH  
82024 Taufkirchen

Unicam

Thermo Onix Corporation

Angleton, TX 77515 (USA)

Vacuubrand GmbH & Co KG

97877 Wertheim

WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten) GmbH

82362 Weilheim

## Danksagung

Herrn PD Dr. Michael Kühne möchte ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung sowie die stets gewährte, freundliche und geduldige Unterstützung ganz besonders herzlich danken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zentrumsabteilung für Lebensmittelkunde, Fleischhygiene und –technologie danke ich für ihre Kollegialität und ihre ständige Hilfsbereitschaft bei all meinen Fragen und Problemen. Mein ganz besonderer Dank gebührt Frau Gisela Möller, die mich so herzlich in ihr HPLC-Labor aufgenommen hat und mir unermüdlich während der gesamten Zeit der Versuche wertvollen fachlichen und nicht zuletzt auch freundschaftlichen Beistand geleistet hat. Sie hat ganz erheblich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Adolf Heise bedanken, der mir bei der Organisation der Beschaffung des Probenmaterials und während der Gelatineherstellung mit seiner Erfahrung enorm hilfreich mit Rat und Tat zur Seite stand. Frau Marija Livio danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der chemischen Analysen.

Herrn Dr. Gerd Hamscher möchte ich für seine hilfreichen fachlichen Auskünfte sowie seine freundliche Unterstützung bei der Erstellung der Strukturformeln danken.

Frau Haifa Rifai danke ich ganz herzlich für ihre wertvolle Hilfe bei allen Fragen und Problemen rund um den Computer.

Dem Institut für Tierernährung danke ich für die freundliche Bereitstellung der Mikroschlagmühle.

Herrn Dr. M. Beyerbach und Frau B. Schneider aus dem Institut für Biometrie und Epidemiologie sei gedankt für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Jost Roth, Herrn Dr. Konrad Ostermaier, Herrn Dr. Dieter Schulz und Herrn Dr. Uwe Seybold von der DGF STOESS AG danke ich sehr herzlich für ihre freundlich gewährten fachlichen Informationen, die Unterstützung bei der Zerkleinerung des Knochenmaterials und die zur Verfügung gestellten Ionenaustauscherharze.

Meiner Familie, Edzard, Familie Stöhr und all meinen Freunden danke ich für ihre ständige Unterstützung.