Projectnummers 505.0600 en 404.0600.
Ontwikkeling methoden van onderzoek voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze / Onderzoek naar het voorkomen, gehalte en stapeling van diverse diergeneesmiddelen in landbouw- en visserijprodukten.
Projectleider: dr. J. de Jong.

Rapport 92.11 Februari 1992

ONTWIKKELING VAN EEN HPLC METHODE VOOR DE SIMULTANE BEPALING VAN RESIDUEN VAN OXYTETRACYCLINE, TETRACYCLINE, CHLOORTETRACYCLINE EN DOXYCYCLINE IN MELK.
DE UITSCHEIDING VAN OXYTETRACYCLINE EN DOXYCYCLINE IN MELK VAN BEHANDELDE KOEIEN.

W.M.J. Beek, dr. J.P. Hoogland, ir. P.L.M. Berende

Afdeling: Diergeneesmiddelen

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telefax 08370-17717

Copyright 1992, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO).
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:
directeur
hoofden onderzoeksafdelingen
projectleider
afdeling diergeneesmiddelen (6x)
programmabeheer en informatievoorziening (2x)
circulatie
bibliotheek (3x)

EXTERN:
Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Veehouderij en Zuivel
Veterinaire Dienst
Rijkskeuringsdienst van Waren, Utrecht
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene (dr. R. Stephany)
DLO - Centrum voor onderzoek en voorlichting voor de pluimveehouderij
DLO - Centraal Diergeneeskundig Instituut
DLO - Instituut voor Veevoedingsonderzoek
Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees
Secretaris ORA - p/a Gezondheidsdienst voor Pluimvee te Doorn (drs M. Vertommen)
Rijksuniversiteit Utrecht, Vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke Oorsprong
Centraal Laboratorium - Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees
Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, Veterinaire Hoofdinspectie

ABSTRACT

Ontwikkeling van een HPLC methode voor de simultane bepaling van residuen van oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline in melk.
De uitscheiding van oxytetracycline en doxycycline in melk van behandelde koeien.

Development of a HPLC method for the simultaneous determination of residues of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk.
Excretion of oxytetracycline and doxycyline in the milk of treated cows.

Report 92.11 February 1992

W.M.J. Beek, J.P. Hoogland, P.L.M. Berende

DLO-State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO),
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

5 tables, 4 annexes, 18 references

A procedure is described for the analysis of tetracyclines in milk using HPLC with UV-detection. With the procedure residues of the antibiotics oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline could be determined in a single run. The limit of quantification for oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline is established to be resp. 8 μg/kg, 6 μg/kg, 22 μg/kg and 48 μg/kg. These limits are below the proposed tolerance level of 100 μg/kg. The recovery was between 61-74% with coefficients of variation of 1.8-5.6%.
After administration of oxytetracycline (intramuscular) and doxycycline (intravenous) to dairy cows, the concentration of the drugs in the milk was determined. After the last injection, the levels of oxytetracycline and doxycycline in milk remained resp. 54 and 33 hours above a level of 100 μg/kg. The binding to milk components was estimated to be between 76-84%.

Keywords: HPLC, Milk, Determination, Analysis, Residues, Antibiotics, Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline, Doxycycline.

SAMENVATTING

In dit rapport wordt de ontwikkeling van een procedure beschreven voor de bepaling van residuen van enkele tetracycline antibiotica in melk met behulp van HPLC met UV-detectie. Met de procedure kunnen residuen van oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doyxcyline in één analysegang worden bepaald. De bepaalbaarheidsgrens voor oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline werd vastgesteld op resp. 8 µg/kg, 6 µg/kg, 22 µg/kg en 48 µg/kg. Deze bepaalbaarheidsgrenzen liggen beneden de voorgestelde tolerantiegrens van 100 µg/kg. Het terugvindingspercentage ligt tussen 61-74% met een variatiecoëfficiënt van 1,8-5,6%. Na toediening van oxytetracycline (intramusculaire) en doxycycline (intraveneus) aan koeien is de concentratie bepaald. Na de laatste injectie kon oxytetracycline en doxycycline, resp. 54 en 33 uur, boven een niveau van 100 µg/kg worden aangetoond.
De binding aan melkcomponenten werd vastgesteld tussen 76-84%.

INHOUD blz

ABSTRACT 1

SAMENVATTING 3

1 INLEIDING 7

2 MATERIALEN EN METHODEN 8
2.1 Standaardstoffen 8
2.2 Reagentia 8
2.3 Instrumenten en materialen 9
2.4 Monsteropwerking 9
2.4.1 Extractie 9
2.4.2 Opzuivering en concentrering 9
2.5 Uitscheidingsproef 10

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE 11
3.1 Chromatografie 11
3.2 Detectie 11
3.3 Stabiliteit 12
3.4 Monsteropwerking 12
3.4.1 Extractie 12
3.4.2 Zuivering en concentratie 13
3.5 Karakterisering van de methode 14
3.5.1 Lineariteit 14
3.5.2 Selectiviteit 14
3.5.3 Validatie 15
3.6 Intramusculaire toediening 15
3.7 Intraveneuze toediening 17
3.8 Binding 18

4 CONCLUSIES 19

DANKWOORD 20

LITERATUUR 20

BIJLAGEN

1 INLEIDING

In de veterinaire praktijk worden tetracycline antibiotica als antimicrobieel middel ingezet tegen o.a. Gram-positieve en Gram-negatieve micro-organismen. Tetracyclines worden na toediening aan landbouwhuisdieren meestal in hun oorspronkelijke (aktieve, niet-gemetaboliseerde) vorm uitgescheiden (de Roij e.a., 1983). Het gebruik van deze verbindingen kan aanleiding geven tot vorming van residuen in consumeerbare produkten. Bij lacterende koeien die behandeld worden met tetracycline antibiotica vindt uitscheiding niet alleen plaats via mest en urine, maar ook via de melk. De aanwezigheid van tetracycline antibiotica in melk is ongewenst omdat deze middelen nadelige effecten kunnen veroorzaken bij de consument en bij de verwerking van de melk (Aerts, 1990). In Nederland en de Verenigde Staten is als maximum toelaatbaar niveau voor oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chloortetracycline (CTC) en doxycycline (DC) in melk een concentratie van 100 μg/kg voorgesteld (Aerts, 1990).

Voor de bepaling van tetracyclines in voedselprodukten (in het bijzonder: vlees) met behulp van fysisch chemische technieken zijn methoden beschreven waarbij zowel de identiteit als de hoeveelheid van de betreffende component kan worden vastgesteld. Hierbij wordt meestal gebruik gemaakt van vloeistofchromatografie (Moats, 1986; Terada e.a., 1984), dunnelaagchromatografie (Oka e.a., 1987) of fluorimetrie (Poiger e.a., 1976).

Voor de bepaling van residuen van tetracyclines in melk worden meestal microbiologische methoden gebruikt (Ellerbroek, 1989; Brady e.a., 1988; Suhren e.a., 1987). Met deze methoden is het mogelijk om de aanwezigheid van een antibioticum aan te tonen maar kan de identiteit van het middel meestal niet eenduidig worden vastgesteld. Voor de bepaling van tetracyclines in melk zijn weinig fysisch chemische methoden beschreven. Voor oxytetracycline, tetracycline of chloortetracycline zijn enkele methoden, waarbij gebruik wordt gemaakt van HPLC (Long e.a., 1990; Fletouris e.a., 1990; Thomas, 1989) of GC-MS (Traldi e.a., 1985), gepubliceerd. Met behulp van HPLC kon vanaf 10 μg/kg en met GC-HRMS vanaf 1 μg/kg de aanwezigheid ervan worden bepaald.

Voor de simultane bepaling van oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline in melk zijn voorzover bekend geen methoden beschreven. In de literatuur zijn voor de gelijktijdige bepaling in lever en vlees methoden beschreven waarbij gebruik gemaakt wordt van solid phase extractie en HPLC analyse (Mulders e.a., 1989; Oka e.a., 1985). Doel van het onderzoek is een methode te ontwikkelen voor de gelijktijdige bepaling van residuen van oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline in melk.

In dit rapport wordt het onderzoek beschreven dat is verricht naar de mogelijkheid om via solid phase extractie en reversed phase HPLC oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline in melk te bepalen. Teneinde de methode te valideren en de bruikbaarheid van de bepaling te testen werden lacterende koeien behandeld met oxytetracycline en doxycycline. De melk van de behandelde dieren werd verzameld en onderzocht. Hiermee werden gegevens verkregen met betrekking tot de eliminatie van deze middelen via de melk. Voorts werd de binding van oxytetracycline en doxycycline aan melkbestanddelen onderzocht.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1. Standaardstoffen

Oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chloortetracycline (CTC) en doxycycline (DC) werden opgelost in methanol en daarna verdund met oxaalzuuroplossing (0.01 M) tot de gewenste concentratie.

2.2 Reagentia

Alle toegepaste chemicaliën waren van p.a. kwaliteit (Merck), tenzij anders aangegeven. Met water wordt bedoeld gedemineraliseerd water gezuiverd met behulp van een Milli-Q zuiverings-systeem, minimale weerstand: 10^7 Ohm.cm-1.

Acetonitril; Iso-octaan; Methanol; Tolueen; Dinatrium ethyleendiaminetetraacetaat. 2 aq (Na2-EDTA); Dimethylchloorsilaan (DMCS), 4 % in tolueen; Citroenzuuroplossing, 0,1 M in water; Dinatriumwaterstoffosfaat, 0,2 M in water; McIlvainbuffer pH 4, 250 ml citroenzuuroplossing (0,1 M) met dinatriumwaterstoffosfaat (0,2 M) ingesteld op pH 4 en aangevuld tot 1000 ml; Extractieoplossing: EDTA in McIlvainbuffer, 0,1 M; EDTA in water, 0,1 M; Oxaalzuuroplossing, 0,01 M in water; HPLC eluens: 0,01 M oxaalzuuroplossing-acetonitril-methanol (780 - 100 - 120 v/v/v).

2.3 Instrumenten en materialen

Bij de monsteropwerking:
coolspin centrifuge (MSE), evaporator (Pierce), pH meter (model GC 820, Schott), mengapparaat (model Heidolph REAX-2), vortex (model VF 1 IKA), Baker SPE systeem (Baker), Sep-Pak C18 cartridges (Millipore); Amicon Centrifree Micropartition System (Amicon art. 4104); Filters, 0,45 μm (Acrodisc LC 13 PVDF).

Het HPLC meetsysteem:
HPLC-pomp (b.v. model 6000A, Waters), injectieautomaat (b.v. WISP 710B, Waters), UV/Vis-detector (b.v. model 9050, Varian), recorder dubbelpens (b.v. model BD41, Kipp), analytische kolom 150 x 4,6 mm I.D. gevuld met Supelco LC-8 DB (5 μm)(Supelco) met een 10 x 3 mm I.D. voorkolom gevuld met Perisorb RP 8 (30-40 μm) (Merck).
Tijdens de ontwikkelfase werd ook gebruik gemaakt van een analytische kolom 125 x 4 mm I.D. gevuld met Lichrospher 60 RP select B (5 μm) (Merck).
Het eluensdebiet was 2 ml/min (voor de Lichrospher kolom: 1,5 ml/min).
Gedetecteerd werd bij UV - 360 nm met een gevoeligheid van 0.002 Aufs.

2.4 Monsteropwerking

2.4.1 Extractie

De melk wordt gehomogeniseerd. Hiervan wordt 5 g afgewogen in een polypropyleen centrifugebuis van 80 ml. Hieraan wordt 70 ml extractieoplossing toegevoegd.
De buis wordt afgesloten en in een Heidolph mengapparaat geplaatst. Er wordt gedurende 15 minuten geroteerd en aansluitend 10 minuten gecentrifugeerd bij 4000 g (MSE-Coolspin). De bovenstaande oplossing wordt gefiltreerd via een wattenprop in een 100 ml maatkolf.
Aansluitend wordt 20 ml extractieoplossing in de centrifugebuis gebracht. De buis wordt afgesloten en krachtig geschud (handmatig) gedurende 15 seconden. Er wordt opnieuw gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 4000 g. Het heldere extract wordt via de wattenprop in de maatkolf gebracht. De trechter wordt nagespoeld met 5 ml extractieoplossing. De maatkolf wordt aangevuld met extractieoplossing, afgesloten en gemengd.

2.4.2 Opzuivering en concentrering

Een Sep-Pak C18 cartridge wordt geactiveerd met achtereenvolgens 2 ml 4 % DMCS in tolueen, 5 ml methanol, 5 ml water en 5 ml 0,1 M EDTA in water. De cartridge wordt aangesloten aan een wegwerpspuit met een inhoud van tenminste 50 ml. In de spuit wordt 50 ml monsterextract (2.4.1) gebracht. Met behulp van het Baker SPE afzuigsysteem wordt het geheel geleidelijk door de cartridge gezogen. Aansluitend wordt door de cartridge 20 ml water gezogen. Hierna wordt de Sep-Pak aangesloten aan een wegwerpspuit van 5 ml. Het geheel wordt in een kleine buis (10 ml) geplaatst en aansluitend gedurende 5 minuten bij 2000 g gecentrifugeerd. De componenten worden via backflush met 3 ml acetonitril van de droge cartridge geelueerd. Het eluaat wordt opgevangen in een polypropyleenbuis van 10 ml. Het eluaat wordt verwarmd tot 40° - 45°C en drooggedampt via overleiden van een stikstofstroom. Het residu wordt opgelost in 1,0 ml 0,01 M oxaalzuuroplossing en 2 ml isooctaan. De buis wordt 2 minuten in een ultrasoonbad geplaatst en aansluitend 15 seconden gemengd met behulp van een vortex. De buis wordt in een centrifuge geplaatst en het geheel wordt gedurende 5 minuten bij 2000 g gecentrifugeerd. Van de onderstaande waterige fase wordt zoveel mogelijk geisoleerd met behulp van een pasteurpipet. Deze oplossing wordt gefiltreerd door een 0,45 μm filter. Van het filtraat wordt direkt 100 μl in de HPLC gebracht. Voor bepaling van de concentratie worden standaardoplossingen (vers bereid) in 0,01 M oxaalzuuroplossing met concentraties van 0,1 - 0,2 - 0,5 en 1 μg/ml aan tetracyclines in de HPLC gebracht.

2.5 Uitscheidingsproef

Voor de uitscheidingsproef van tetracyclines via de melk werden 9 melkgevende koeien gebruikt. Alle dieren waren bij de start van de proef klinisch gezond. Drie koeien kregen een intramusculaire injectie (halsspier), met 6 mg oxytetracycline per kg lichaamsgewicht. Drie koeien kregen een intraveneuze injectie met 10 mg doxycycline per kg lichaamsgewicht. Deze injecties werden na 24 en 48 uur herhaald. De injecties werden telkens om 7.30 uur toegediend. Drie koeien (controlegroep) kregen geen behandeling met een antibioticum. De koeien werden tussen 7.00-7.30 uur en 17.00-17.30 uur gemolken. Er werden melkmonsters verzameld van 250 ml van elk melkmaal vanaf een melkmaal voorafgaand aan het tijdstip van injiceren tot en met 10 dagen later (21 melkmalen). De melkmonsters werden in plastic potten gedaan. De melkmonsters van de avondmelk bleven in de melkstal tot de volgende morgen. 's Morgens werden de monsters van de avond- en de ochtendmelk bij -20°C geplaatst. De dieren liepen in de weide, met bijvoedering van krachtvoer. Bijzonderheden over de gebruikte proefdieren staan vermeld in tabel 1.

Tabel 1: Overzicht specificaties proefdieren.

Groep	Dier nr.	Behandeling	Geboortedatum	Kalfdatum	Gem. melkprod. 30-5 t/m 5-6 (kg per dag)	Gem. gew. 30-5 t/m 5-6 (kg)	Dosering antibioticum (ml per keer)
1	16	geen	14-10-88	01-10-90	20	569	-
	1820		18-10-86	17-10-90	24	624	-
	1954		18-11-87	01-11-90	15	643	-
2	7	Engemycine	06-10-88	13-10-90	19	596	36
	1679		13-10-85	21-11-90	22	662	40
	1961	10%	05-12-87	22-12-90	19	664	40
3	23	Doxycycline	18-10-88	25-10-90	18	572	57
	1806		08-10-86	15-11-90	20	710	71
	1931	10%	01-10-87	17-10-90	21	581	58

Opm: 1) op 11-06, 12-06 en 13-06-1991 geinjiceerd om 7.30 uur.
2) Engemycine 10% = bevat 100 mg oxytetracycline (als hydrochloride) per ml
Doxycycline 10% = bevat 100 mg doxycycline (als hydrochloride) per ml

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Chromatografie

De HPLC scheiding van tetracycline antibiotica op reversed phase kolommen werd reeds eerder onderzocht en beschreven (Long e.a., 1990; Fletouris e.a., 1990; Thomas, 1989; Traldi e.a., 1985; Mulders e.a., 1989; Oka e.a., 1985; Tomassen, 1990). Bij hun onderzoek werden voornamelijk kolommen gebruikt gevuld met C-8 materiaal. Verder werden voornamelijk elutiemiddelen toegepast die bestonden uit een mengsel van oxaalzuur (pH 2) of fosfaatbuffer (pH 2) met als modifier acetonitril, methanol of tetrahydrofuraan. Op basis van deze gegevens werd nu ook voor een lage pH gekozen. De tetracycline antibiotica bezitten een nagenoeg gelijke structuur. Ze complexeren gemakkelijk met tweewaardige (metaal-)ionen. Bovendien gaan deze stoffen waterstofbindingen aan met de actieve plaatsen die aanwezig zijn op het silica-oppervlak van het HPLC kolommateriaal. Hierdoor zijn ze met behulp van HPLC moeilijk te scheiden. Door selectie van kolommen gevuld met gedesactiveerd reversed phase C-8 materiaal en keuze van geschikte elutiemiddelen konden redelijke scheidingen worden bereikt.
Met elutiemiddelen die bestonden uit een mengsel van acetonitril-tetrahydrofuraan-fosfaatbuffer (pH 2) (100-75-825) of acetonitril-methanol-oxaalzuur (pH 2)(100-120-780) konden op een Supelcosil LC-8 DB en Lichrospher 60 RP select B kolom adequate resoluties worden verkregen. Bij deze lage pH van het elutiemiddel werden symmetrische pieken verkregen. Bij een hogere pH (>3) bleken de pieken sterk te tailen. Dit wordt veroorzaakt doordat bij hogere pH (>3) de tetracyclinemoleculen als een moeilijk te elueren Zwitterion aanwezig zijn. Hierdoor worden er bij een hogere pH geen reproduceerbare scheidingen verkregen (Tomassen, 1990). Met de twee genoemde elutiemiddelen bleken op beide kolommen oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline in één analysegang te scheiden. Bij monsteronderzoek, waarbij de Lichrospher kolom werd gebruikt, kon met beide elutiemiddelen geen goede scheiding ten opzichte van de melkmatrix worden bereikt. Op de Supelcosil LC-8 DB bleken de tetracyclines, met een mengsel van oxaalzuur, acetonitril en methanol, wel te scheiden van de melkmatrix (bijlage 1).

3.2 Detectie

Tetracyclines vertonen absorptie in het ultraviolet gebied maar ze kunnen ook op basis van fluorescentie eigenschappen gedetecteerd worden (Tomassen, 1990). Met beide detectie principes kunnen tetracyclines worden aangetoond. De gevoeligheid is bij eenzelfde signaalruis verhouding met UV detectie hoger (detectiegolflengte 360 nm)(ca. 15 x) dan bij direkte fluorescentie detectie (excitatiegolflengte: 360 nm, emissiegolflengte: 510 nm).

Voor de detectie van residuen van tetracyclines werd de UV absorptie gekozen. Oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline bezitten in het UV absorptiespectrum twee maxima bij ca. 260 en 360 nm. De molaire absorptiecoëfficient bij 260 is groter dan bij 360 nm. Evenals in andere onderzoeken (Long e.a., 1990; Fletouris e.a., 1990; Thomas, 1989) werd bij dit onderzoek echter de hogere golflengte van 360 nm geselecteerd omdat hierbij de invloed van storende matrixcomponenten in het chromatogram minder waarneembaar is.

3.3 Stabiliteit

De tetracyclines zijn oplosbaar in methanol en zijn hierin gedurende minstens twee weken stabiel (in donker bij 4°C). In zuur milieu bleken ze minder stabiel. Na ca. 1 week bewaren in oxaalzuuroplossing (pH 2,3) konden na injectie in de HPLC bijpieken in het chromatogram worden waargenomen. De piekhoogte van de standaardstof bleek met ca. 10% in intensiteit te zijn afgenomen. Dit wordt veroorzaakt door reeds aanwezige onzuiverheden in de standaardstof maar ook door gevormde afbraakprodukten.
Door andere onderzoekers (b.v. Mack e.a., 1978) zijn deze produkten reeds beschreven als anhydro-, apo- of epi-vormen van de tetracyclines.

3.4 Monstervoorbereiding

Voor de monsteropwerking werd voor een korte en eenvoudige procedure gekozen. De methodiek zoals die is beschreven voor de bepaling van tetracyclines in ei (Tomassen, 1990) werd geselecteerd. In tegenstelling tot ei bleek deze methodiek echter niet te werken voor melk en werd derhalve gemodificeerd. De opwerkingsprocedure berust op extractie met een McIlvainbuffer (pH 4)/EDTA oplossing, een eenvoudige zuivering en concentratie over een "solid phase extraction" (SPE) kolommetje, elutie met een organisch oplosmiddel, afdampen en heroplossen in een waterige oplossing en partitie met iso-octaan. De waterige fase is geschikt voor reversed phase HPLC analyse.

3.4.1 Extractie

Tetracyclines binden sterk aan de eiwitten in biologisch materiaal. Door extractie met sterke zuren of zure onteiwittende middelen kunnen residuen van tetracyclines uit biologisch materiaal worden geïsoleerd. Door Oka e.a. (1985) werden diverse extractiemiddelen onderzocht. Bij hun onderzoek van levers bleek een 0.1 Molaire EDTA oplossing in een McIlvainbuffer (een mengsel van citroenzuur en dinatriumfosfaat met een pH van 4) het beste te voldoen.

Door Mulders e.a. (1990) en Tomassen (1990) werd voor vlees en ei eveneens deze extractieoplossing met succes toegepast.
Op basis van deze gegevens werd voor dezelfde extractieoplossing gekozen. Voor melk bleek dit extractiemiddel eveneens toepasbaar.

3.4.2 Zuivering en concentratie

De tetracycline antibiotica kunnen gezuiverd en geconcentreerd worden via cartridges gevuld met C-18 materiaal. Door Oka e.a. (1985) werd de opzuivering van leverextracten en concentratie van de residuen via een SPE C-18 kolommetje beschreven. Door Mulders e.a. (1989) is deze procedure geoptimaliseerd en toegepast voor extracten van vlees. De tetracyclines blijken irreversibel te worden geadsorbeerd aan de vrije silanolgroepen van de met C-18 materiaal gevulde kolommetjes. Bij hun procedure werden de vrije silanolgroepen van het concentreringsmateriaal gedeactiveerd, door de cartridge achtereenvolgens te behandelen met een oplossing van 4% DMCS in tolueen, methanol en water.
Door Tomassen (1990) werd deze procedure verder geoptimaliseerd door de cartridge aansluitend te behandelen met een oplossing van 0,1 M EDTA in water. In de praktijk bleek bij Mulders e.a. (1989) en Tomassen (1990) een Sep-Pak C-18 cartridge het best te voldoen. Op basis van deze bevindingen werd voor de zuivering en concentratie van residuen van tetracyclines in melk de procedure geselecteerd zoals die door Mulders et al. en Tomassen is beschreven. Nadat de tetracyclines zijn geconcentreerd op een SPE-kolom worden deze geelueerd met een organisch oplosmiddel. Mulders e.a. (1989) gebruikten hiervoor grote hoeveelheden methanol. Ons inziens kan deze aanpak aanleiding geven tot grote verliezen en is in ieder geval tijdrovend. Voor deze procedure werd niet gekozen. Door Tomassen (1990) werden twee verschillende elutiemiddelen gebruikt, afhankelijk van de te onderzoeken tetracyclines. Deze elutiemiddelen werden ook toegepast bij HPLC analyse.
Bij de opzet voor een procedure voor melk bleek dat met behulp van de door Tomassen toegepaste elutiemiddelen de tetracyclines niet voldoende gezuiverd van de matrix waren te elueren. Deze procedure is gewijzigd in elutie met een organisch oplosmiddel en aansluitend een zuivering via vloeistof-vloeistof extractie.
De tetracyclines kunnen met behulp van een kleine hoeveelheid acetonitril (3 ml) volledig van de Sep-Pak worden geëlueerd. De acetonitrilfase wordt opgevangen in een plastic buis. Hierna wordt de oplossing afgedampt tot droog en het residu opgelost in oxaalzuuroplossing. Wanneer het eluaat wordt opgevangen in een glazen buis, treedt na afdampen en heroplossen een verlies van ca. 40% op. Dit wordt mogelijk veroorzaakt doordat de tetracyclines irreversibel worden geadsorbeerd aan glaswerk: door het glaswerk vooraf te silaniseren, bijv. met DMCS, of gebruik te maken van polypropyleenmateriaal, kon dit verlies worden vermeden.

In de opwerkingsprocedure is daarom zoveel mogelijk gebruik gemaakt van polypropyleen materialen.
In de procedure wordt de laatste waterige fase verder gezuiverd door extractie met een organisch oplosmiddel. Hiervoor bleken tolueen, petroleumether, iso-octaan en hexaan geschikt. Er trad geen verlies op. Bij monsteronderzoek voldeed iso-octaan echter het best omdat hierbij geen emulsievorming optreedt.

3.5 Karakterisering van de methode

Met de uiteindelijke methode (2.4) werden verschillende experimenten uitgevoerd om de toepasbaarheid te bepalen.

3.5.1 Lineariteit

Om de lineariteit vast te stellen werd een standaardreeks geinjecteerd. Op basis van de piekhoogte was de ijklijn lineair (r^2=0.9998, N=5) tussen 0,05 en 1,00 μg/ml voor oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline.

3.5.2 Selectiviteit

Om de selectiviteit ten opzichte van mogelijk interfererende diergeneesmiddelen vast te stellen werden een aantal diergeneesmiddelen op het systeem geinjecteerd met een concentratie welke overeenkomt met 4 mg/kg van de desbetreffende component in melk. Geen van de verbindingen vermeld in tabel 2 stoorden de bepaling van oxytetracycline, tetracycline, chloortetracyline en doxycycline.

Tabel 2: Overzicht van diergeneesmiddelen welke de bepaling niet storen.

levamisol	nitrofurazon	maduramycine
oxfendazol	nitrofurantoine	olaquindox
albendazol	furazolidon	carbadox
pyranteltartraat	furaltadon	sulfamethoxazol
mebendazol	robenidine	sulfaquinoxaline
ethopabaat	dimetridazol	sulfadoxine
nitrovin	ronidazol	sulfadimidine
amprolium	lasalocid	sulfadimethoxine
decoquinaat	narasin	sulfadiazine
dinitolmide	monensin	sulfamerazine
buquinolaat	salinomycine	sulfachloorpyridazine
methylbenzoquaat	chlooramfenicol	sulfachloorpyrazine
kanamycine	trimethoprim	nicarbazin
neomycine	dihydrostreptomycine	flumequin
gentamycine	streptomycine	ipronidazol
tylosine	fenbendazol	lincomycine

3.5.3 Validatie

De linariteit bij toevoeging aan monster werd vastgesteld op resp. 50 - 100 - 200 - 500 - 1000 µg/kg niveau. Hiertoe werd aan blanco melk een bekende hoeveelheid tetracyclines toegevoegd. Na een wachtperiode van ongeveer 15-20 minuten werden de monsters opgewerkt volgens de procedure beschreven in 2.4 en aansluitend geanalyseerd m.b.v. HPLC. De recovery voor oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline bedroeg op een niveau van 50 µg/kg resp. 71%, 72%, 59% en 63%, op een niveau van 100 µg/kg resp. 74%, 70%, 61% en 61%, op een niveau van 200 µg/kg resp. 72%, 73%, 61%, en 59%, op een niveau van 500 µg/kg resp. 74%, 73%, 63% en 60% en op een niveau van 1000 µg/kg resp. 75%, 75%, 64% en 63%. Gelet op de verkregen waarden is de recovery onafhankelijk van de concentratie (chromatogrammen; bijlage 1). Aan de hand van chromatogrammen van onafhankelijke blanco monsters werden de detectiegrenzen (3 x ruis) en bepaalbaarheidsgrenzen (6 x ruis) berekend.

De detectiegrenzen lagen voor oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline detectiegrenzen op resp. 4, 3, 11 en 24 µg/kg en de bepaalbaarheidsgrenzen op resp. 8, 6, 22 en 48 µg/kg.

Voor de te bepalen stoffen ligt de bepaalbaarheidsgrens dus duidelijk lager dan de voorgestelde tolerantiegrens van 100 µg/kg.

Op een niveau van de tolerantiegrens (100 µg/kg) werd de recovery en variatiecoefficient vastgesteld (Publikatieblad EG, 1989). Voor oxytetracyline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline werden recovery 's gevonden van resp. 74% (VC=1.8%, N=10), 70% (VC=4.6%, N=10), 61% (VC=5.2%, N=10) en 62% (VC=5.6%, N=10).

3.6 Intramusculaire toediening

De resultaten van de meting van de uitscheiding via de melk bij intramusculaire toediening van oxytetracycline zijn weergegeven in tabel 3. De proef had een onverstoord verloop (bijlage 4). De resultaten zijn tevens grafisch weergegeven in figuur 1 bijlage 2. De gegevens zijn gecorrigeerd voor de recovery.

Tabel 3: Gehalte aan oxytetracycline.HCl (μg/kg) in melk na intramusculaire toediening.

tijd na toediening (uur)		gehalte gecorrigeerd voor gem. recovery (μg/kg)		
		dier 7 - 1679 - 1961		
0	inj.	*	*	*
10		1246	879	1121
24	inj.	516	805	927
34		1274	1440	1296
48	inj.	640	788	748
58		1648	1057	1446
72		531	890	914
82		127	336	356
96		55	178	115
106		18	27	82
120		18	70	31
130		12	24	15
144		*	22	16
154		*	*	*
168		*	*	*
178		*	*	*
192		*	*	*
202		*	*	*
216		*	*	*
226		*	*	*
240		*	*	*

* = gehalte lager dan detectiegrens

De hoogste concentraties aan oxytetracycline worden in de melk van het melkmaal volgend op de intramusculaire toediening gevonden. Dit niveau blijkt na iedere injectie bereikt te worden. Het gehalte wordt iets hoger als gevolg van herhaalde behandeling.

Het uitscheidingspatroon is bij de individuele dieren verschillend. Een voorbeeld van een chromatogram staat afgebeeld in bijlage 3.

Na ongeveer 54 uur na de laatste injectie is de concentratie in de melk gedaald tot onder de voorgestelde tolerantiegrens van 100 μg/kg. De gevonden waarden stemmen overeen met de resultaten die reeds eerder door andere onderzoekers zijn gevonden. Door Nouws e.a. (1985) werd de eliminatie van oxytetracycline via de melk onderzocht. Na een eenmalige intramusculaire toediening op een doseringsniveau van 5 mg/kg werd na 50-70 uur de concentratie aan oxytetracycline beneden een niveau van 100 μg/kg gevonden. Hierbij werd een microbiologische bepalingsmethode gebruikt.

3.7 Intraveneuze toediening

De resultaten van de meting van de uitscheiding via de melk bij intraveneuze toediening van doxycycline zijn weergegeven in tabel 4. De proef had een onverstoord verloop (bijlage 4). De resultaten zijn tevens weergegeven in figuur 2 bijlage 2. Hierbij zijn de concentraties gecorrigeerd voor de recovery.

Tabel 4: Gehalte aan doxycycline.HCl (μg/kg) in melk na intraveneuze toediening.

tijd na toediening (uur)		gehalte gecorrigeerd voor gem. recovery (μg/kg)		
		dier 23	1806	1931
0	inj.	*	*	*
10		902	+	444
24	inj.	148	138	154
34		1688	1592	1911
48	inj.	507	308	256
58		815	1837	590
72		141	313	289
82		66	39	52
96		*	*	*
106		*	*	*
120		*	*	*
130		*	*	*
144		*	*	*
154		*	*	*
168		*	*	*
178		*	*	*
192		*	*	*
202		*	*	*
216		*	*	*
226		*	*	*
240		*	*	*

* = gehalte lager dan detectiegrens
+ = geen monster, storing bij bemonstering melkstal

De hoogste concentraties aan doxycycline worden in de melk van het melkmaal volgend op de intraveneuze toediening gevonden. Het uitscheidingspatroon is bij de individuele dieren verschillend. Het tijdstip waarop in de melk niets meer aantoonbaar is, is voor alle dieren gelijk.

Na ongeveer 33 uur na de laatste injectie is de concentratie in de melk gedaald tot onder de voorgestelde tolerantiegrens van 100 μg/kg. Een voorbeeld van een chromatogram staat afgebeeld in bijlage 3. In vergelijking met oxytetracycline is de eliminatietijd na de laatste injectie aanmerkelijk korter. Echter, de dosering, doseerwijze en aard van deze middelen zijn niet met elkaar in overeenstemming, zodat aan dit feit verder geen conclusies kunnen worden verbonden.

3.8 Binding

Tetracyclines metaboliseren nauwelijks maar binden wel sterk aan melkeiwitten. Door Nouws e.a. (1985) en Ellerbroek (1989) werd voor oxytetracycline een binding aan melkeiwitten tussen 70-85% vastgesteld. Op basis van hun proefopzetten kan binding aan andere melkbestanddelen dan eiwit overigens niet worden uitgesloten. De binding in deze experimenten werd bepaald door melk te analyseren voor en na ultrafiltratie.

Voor doxycycline zijn zover bekend weinig recente gegevens aanwezig over de binding aan melkeiwitten (Ziv e.a., 1974).

Met behulp van enkele geselecteerde positieve monsters van de praktijkproef werd oxytetracycline en doxycycline met ultrafiltratie onderzocht. Allereerst werden de gehaltes bepaald volgens de beschreven procedure (2.4). Hierbij wordt een extractie met een McIlvainbuffer/EDTA oplossing toegepast. Aansluitend werd van een ander deel van het melkmonster een ultrafiltraat gemaakt met behulp van een Amicon Centrifree membraanfilter. De aan grote moleculen gebonden componenten geraken hierbij niet door het membraanfilter. In het ultrafiltraat werd de concentratie aan tetracycline direkt bepaald via HPLC. Bij ultrafiltratie van standaardoplossingen, oxytetracycline en doxycycline opgelost in oxaalzuuroplossing, werd in het filtraat 97% teruggevonden (geteste concentraties: 0,1 en 1 mg/kg). Het verlies wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat een klein deel adsorbeert aan het materiaal van het membraanfilter. Voor deze waarde werd niet gecorrigeerd. De resultaten staan weergegeven in tabel 5.

Tabel 5: Eiwitbinding oxytetracycline en doxycycline

tijd na toediening (uur)	dier	gehalte (μg/kg)	gehalte na u.f. (μg/kg)	% binding
Oxytetracycline				
10	1679	879	143	84
34	1961	1296	280	78
34	7	1274	230	82
34	1679	1440	297	79
Doxycycline				
34	1931	1911	374	80
34	23	1688	403	76
34	1806	1592	375	76

u.f. = ultrafiltratie

Uit de gevonden resultaten blijkt dat voor oxytetracycline nagenoeg eenzelfde percentage aan binding wordt gevonden als voorheen beschreven. Er is nagenoeg geen verschil tussen de gevonden resultaten van oxytetracycline en doxycycline. Beide componenten vertonen een binding tussen 76-84%. Er bestaan nagenoeg geen onderlinge verschillen tussen de dieren.

4 CONCLUSIES

Met de beschreven procedure is het mogelijk residuen van oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline in melk in één analysegang te bepalen met behulp van hogedruk vloeistofchromatografie. De bepaalbaarheidsgrens voor oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycyline ligt op resp. 8, 6, 22, en 48 μg/kg. De bepaalbaarheidsgrens ligt lager dan de voorgestelde tolerantiegrens van 100 μg/kg.

De recovery ligt voor oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline op resp. 74, 72, 62 en 61%. De methode heeft een lineair bereik tussen 50 en 1000 μg/kg.De methode werd getest op praktijkmonsters melk. Na intramusculaire injectie van oxytetracycline en intraveneuze injectie van doxycycline konden tot resp. 54 en 33 uur na de laatste toediening de componenten worden aangetoond boven een grens van 100 μg/kg. Via ultrafiltratie werd vastgesteld dat oxytetracycline en doxycycline tussen 76-84% worden gebonden aan grote melkmoleculen.

DANKWOORD

De auteurs danken het DLO - Instituut voor Veevoedingsonderzoek voor de uitvoering van het in dit rapport beschreven dierexperiment.

LITERATUUR

Aerts, M.M.L.
Residues of veterinary drugs in edible products. An analytical approach.
Dissertation, (1990) Free University Amsterdam, The Netherlands.

Brady, M.S. and Katz, S.E.
Antibiotic/Antimicrobial residues in milk.
J. Food Protect., 51 (1988) 8-11.

Ellerbroek, L.
Untersuchungen zum nachweis von oxytetracyclin und chlortetracyclin in kolostrum und milch.
Arch. Lebensmittelhyg., 40 (1989) 1-24.

Fletouris, D.J., Psomas, J.E. and Botsoglou, N.A.
Trace analysis of oxytetracycline and tetracycline in milk by high-performance liquid chromatography.
J. Agric. Food Chem., 38 (1990) 1913-1917.

Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., Short, C.R. and Barker, S.A.
Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatograhic determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73 (1990) 379-384.

Mack, G.D. and Ashworth, R.A.
A high performance liquid chromatographic system for the analysis of tetracycline drug standards, analogs, degradation products and other impurities.
J. Chromatogr. Sci., 16 (1978) 93-101.

Moats, W.A.
Determination of tetracycline antibiotics in tissues and blood serum of cattle and swine by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr., 358 (1986) 253-259.

Mulders, E.J. and van de Lagemaat, D.
Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography.
J. Pharm. Biomed. Anal., 7 (1989) 1829-1835.

Nouws, J.F.M., Breukink, H.J., Brinkhorst, G.J., Lohuis, J., van Lith, P., Mevius, D.J. and Vree, T.B.
Comparative pharmacokinetics and bioavailability of eight parenteral oxytetracycline-10% formulations in dairy cows.
The Vet. Q., 7 (1985) 306-3.

Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M., Harada, K., Uchiyama, M. and Asukab.
Improvement of chemical analysis of antibiotics. X. Determination of eight tetracyclines using thin-layer and high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr., 393 (1987) 285-296.

Oka, H., Matsumoto, H., Uno, K., Harada, K., Kadowaki, S. and Suzuki, M.
Improvement of chemical analysis of antibiotics. VIII. Application of prepacked C18 cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver.
J. Chromatogr., 325 (1985) 265-274.

Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen.
32ste jaargang, nr. L 351 d.d. 2 december 1989 (Richtlijn 89/610/EEG)

Suhren, G. and Heeschen, W.
Detection of antibiotics in milk with a modified microbial receptor assay (Charm test II).
Milchwissenschaft, 42 (1987) 493-496.

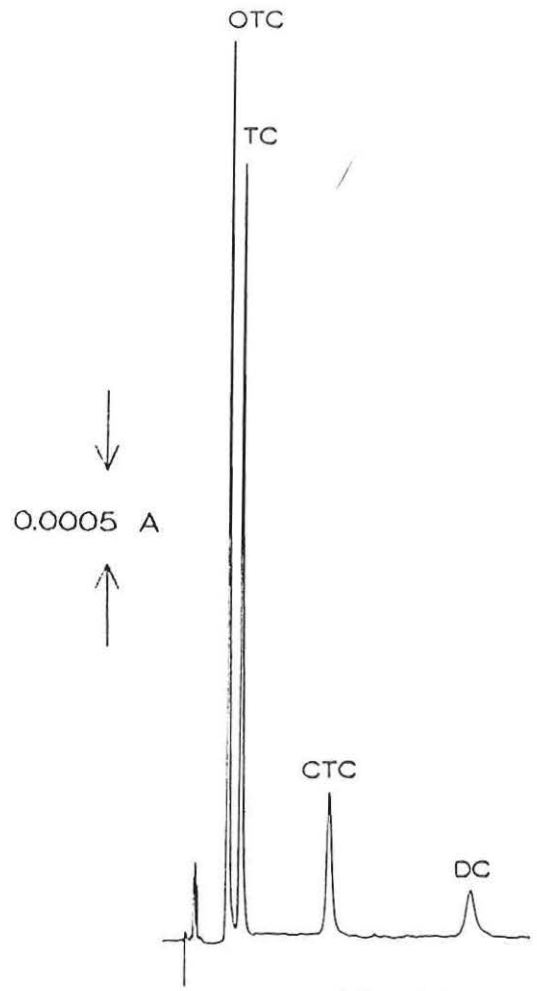
Terada, H., Asanoma, M. and Sakabe, J.
Studies on residual antibacterials in foods (I). Determination of tetracyclines by high-performance liquid chromatography.
Eisei Kagaku, 30 (1984) 138-143.

Thomas, M.H.
Simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72 (1989) 564-567.

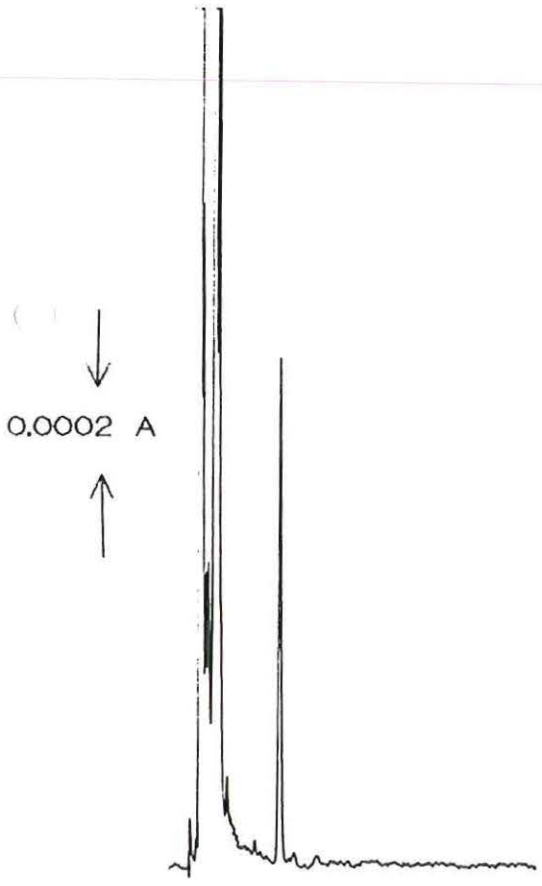
Tomassen, M.J.H.
Residuen van tetracycline antibiotica in dierlijke matrices. Ontwikkeling van een HPLC methode voor ei.
Afstudeerverslag 1990, RIKILT - Wageningen, Hogeschool Interstudie Arnhem.

Traldi, P., Daolio, S., Pelli, B., Maffei Facino, R. and Carini, M.
Rapid, sensitive and specific determination of oxytetracycline residues in bovine milk and meat by CAD MIKES analysis at the 1 ppb level.
Biomedical Mass Spectrometry, 12 (1985) 493-496.

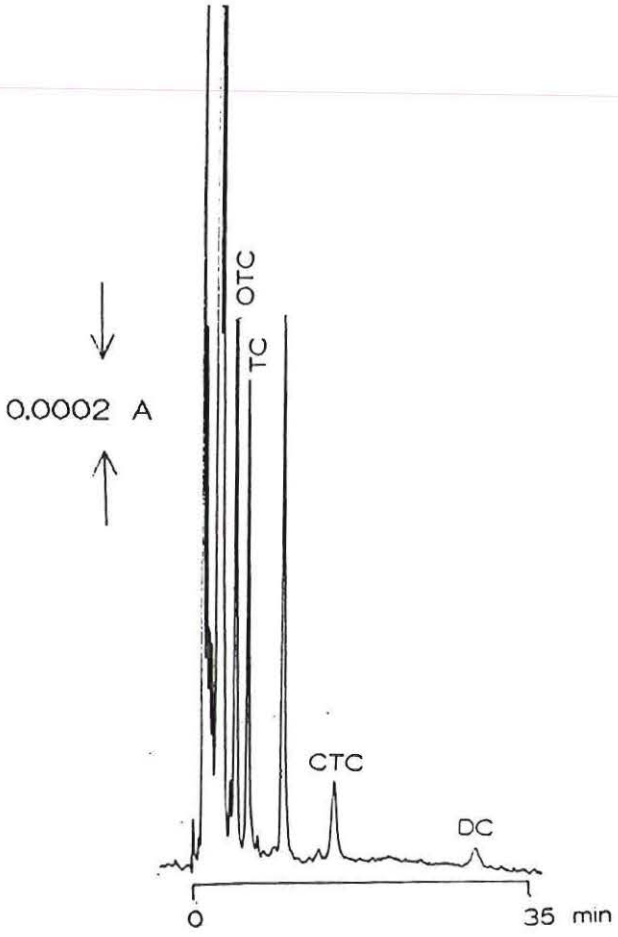
Ziv, G. and Sulman, F.G.
Analysis of pharmacokinetic properties of nine tetracycline analogues in dairy cows and ewes.
Amer. J. Vet. Res., 35 (1974) 9, 1197-1201.



standaard 0.8 ug/ml

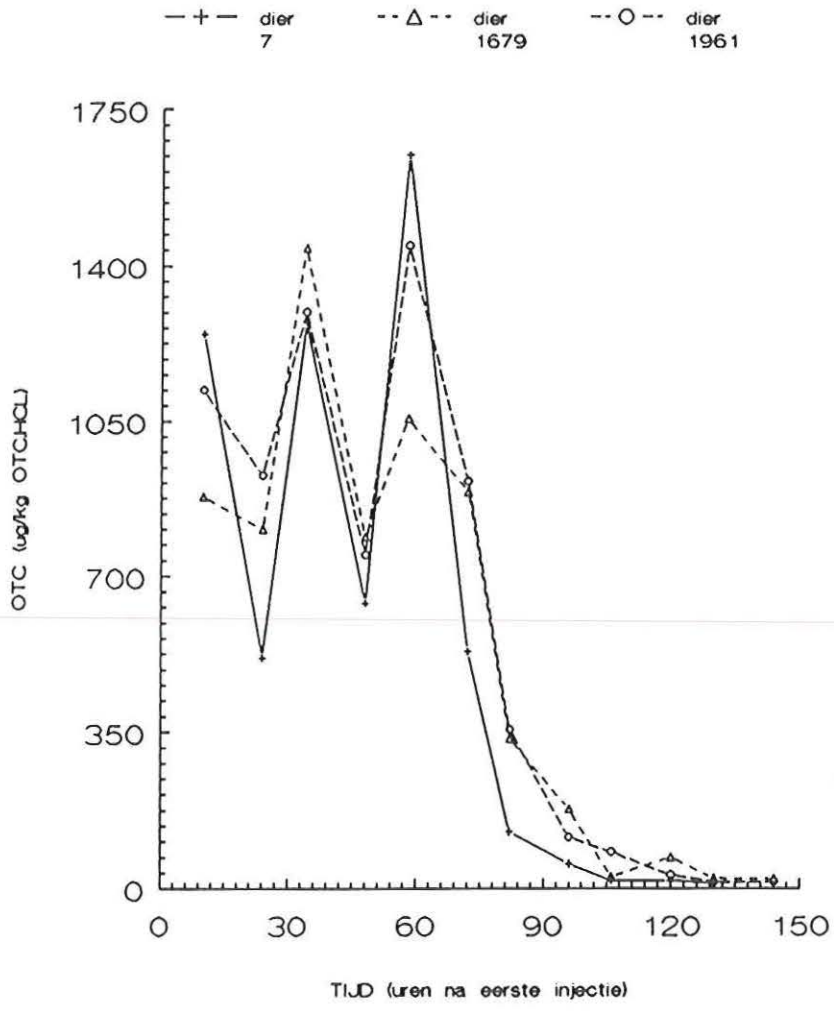


blanco melk



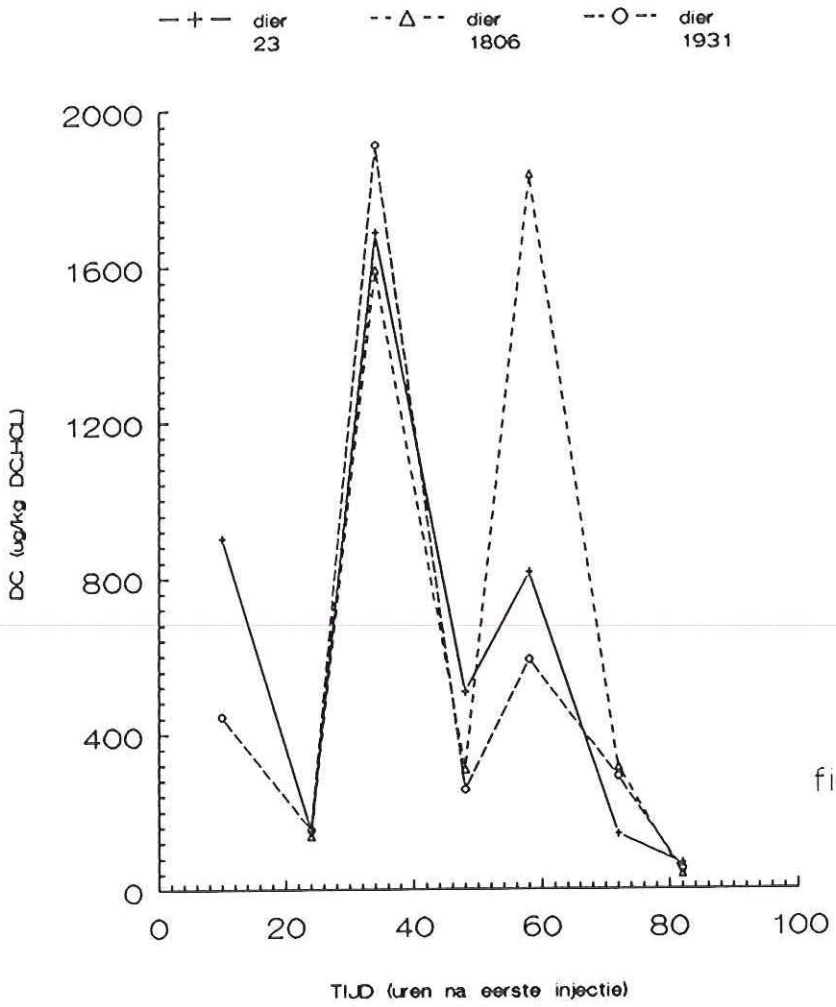
melk 100 ug/kg

ELIMINATIE OXYTETRACYCLINE

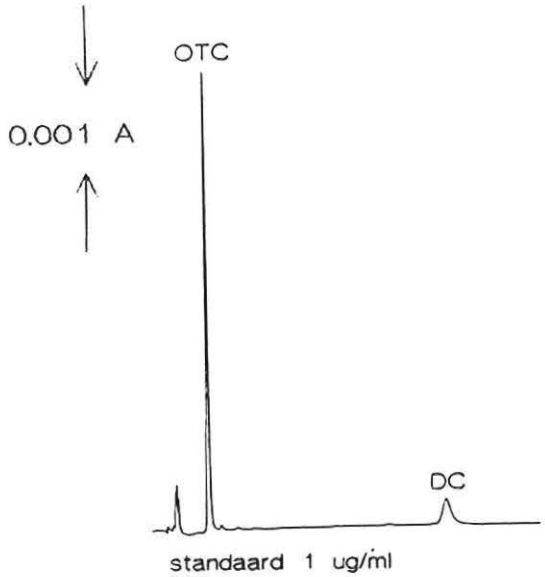


figuur 1

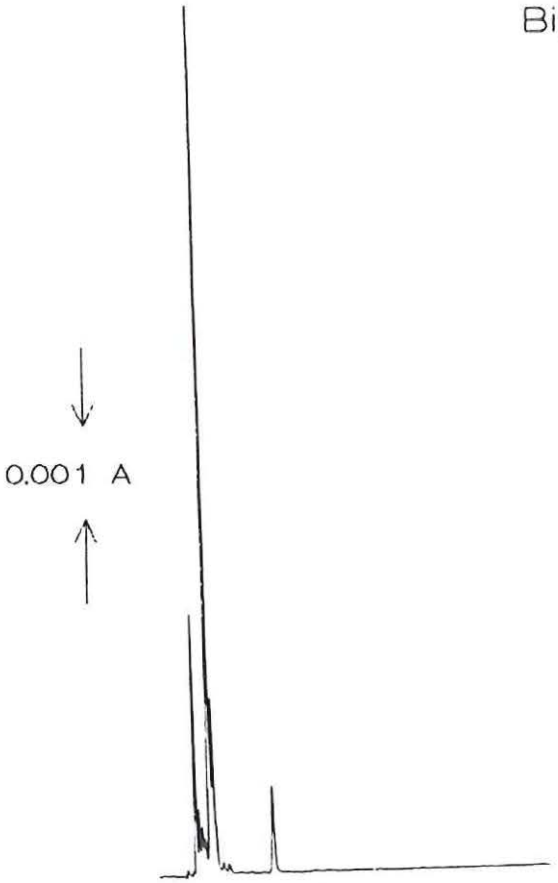
ELIMINATIE DOXYCYCLINE



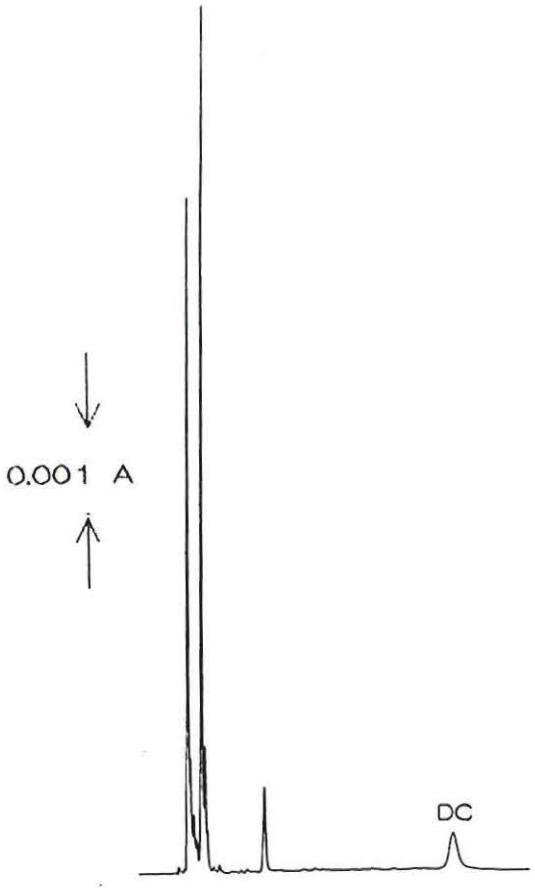
figuur 2



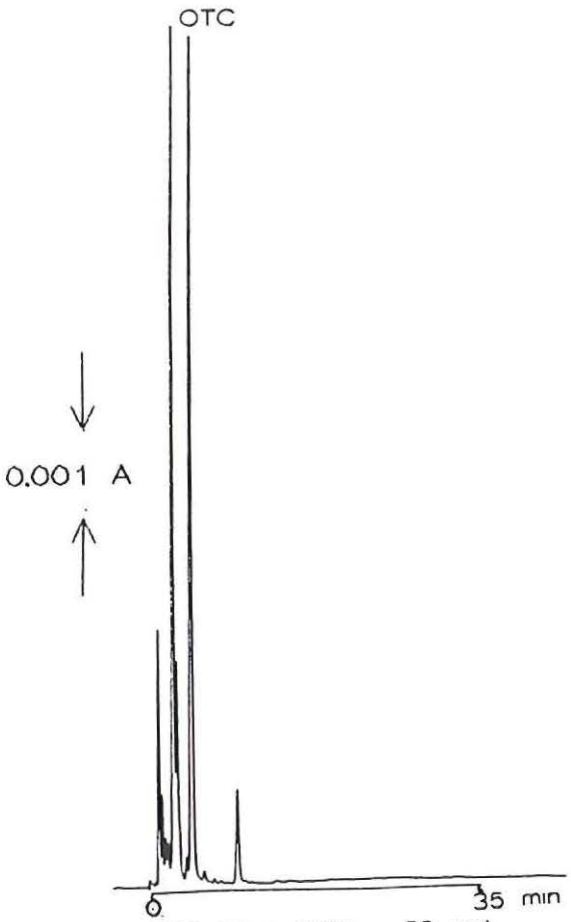
standaard 1 ug/ml



blanco melk



DC (dier 23 - 10 uur)



OTC (dier 1679 - 58 uur)

ZOOTECHNISCH VERSLAG VAN PROEF 454.0019

DOOR

IR. P.L.M. BERENDE

Lelystad, 14 augustus 1991

INLEIDING

Het RIKILT heeft een bepalingsmethode voor oxytetracycline ontwikkeld (een HPLC-methode met U.V.-detectie). Deze bepalingsmethode moet verder nog gevalideerd worden. Voor het testen van deze methode is melk nodig met een van te voren vastgesteld gehalte. Daarom moeten hiervoor melkmonsters worden verzameld waarbij aan de volgende eisen voldaan moet worden:

a. nauwkeurige dosering en juiste wijze van toediening van het antibioticum
b. juiste wijze van monstername en behandeling van de monsters melk
c. vaststellen van hoeveelheid geproduceerde melk per melkmaal
   (Dit laatste mede om de uitscheidingscurve mede te kunnen bepalen)

Voor dit doel werd een proef uitgevoerd met negen melkgevende koeien

Proefopzet

Drie koeien kregen een intra-musculaire injectie (in de halsspier) met 6 mg oxytetracycline per kg lichaamsgewicht en drie koeien kregen deoxytetracycline in een dosering van 10 mg per kg lichaamsgewicht intra-veneus toegediend. De toedieningen werden na 24 en 48 uur herhaald. Op 11/6 en 12/6 werd deoxytetracycline in de uierader gespoten en op 13/3 in de halsader vanwege oedeem rond de uierader. Drie koeien dienden als controle (geen behandeling met een antibioticum).

Preparaten

In deze proef werd Engemycine 10% (LA) van Mycofarm gebruikt. Per ml oplossing bevatte deze 100 mg oxytetracyclinebase (als hydrochloride). Per 100 kg lichaamsgewicht dus 6 ml preparaat. Per injectieplaats werd maximaal 20 ml toegediend (advies fabrikant). Verder werd Doxycycline 10% van Apharmo gebruikt. Per ml oplossing bevatte deze 100 mg deoxytetracyclinebase (als hydrochloride). Per 100 kg lichaamsgewicht dus 10 ml preparaat.

Proefdieren

Voor deze proef werden negen koeien uit de IVVO-veestapel gebruikt. Op het moment dat de proefbehandelingen ingesteld werden waren geen dieren beschikbaar die met een (soortgelijk) antibioticum behandeld moesten worden. De bijzonderheden van de melkkoeien staan in tabel 1 vermeld.

Rantsoen en huisvesting

Volop gras in de weide met bijvoedering van krachtvoer (1,5 - 2 kg) zoals gebruikelijk op het IVVO.

Waarnemingen

- Gewicht van de dieren werd dagelijks vastgesteld vanaf de 1e dag van injectie t/m 10 dagen later;
- Melkproduktie werd per melkmaal per dier gedurende de hele proefperiode vastgesteld;
- Melkmonsters van 250 ml van elk melkmaal vanaf één melkmaal voorafgaand aan het tijdstip van injiceren tot en met 10 dagen later (21 melkmalen) werden genomen;
- De melkmonsters van de avondmelk bleven in de melkstal staan tot de volgende morgen. 's Morgens werden de monsters van de avond- en de morgenmelk in de diepvries bij -20°C geplaatst;
- Voor drs. Groot werd uit deze 250 ml potten één submonster van 50 ml genomen.

Tijdschema

- Injiceren dieren: 11-06, 12-06 en 13-06-1991 's morgens om ca 7.30 uur
- Verzamelen melkmonsters: 11-06 's morgens t/m 21-06 's morgens

Resultaten

De proef had een onverstoord verloop. De gezondheidstoestand van de dieren was goed. Alle melkmonsters zijn op de daarvoor geplande tijdstippen genomen, behalve op 11 juni 's avonds bij dier 1806. Door een mechanische storing liep de melk in de tank in plaats van in de (monster)ketel.
In tabel 2 staan de gewichten van de dieren weergegeven. Omdat de spreiding in de gewichten binnen een dier nogal groot is, is steeds het gemiddelde gewicht van drie opeenvolgende wegingen weergegeven. De schommelingen worden vooral veroorzaakt door de mate van grasopname gedurende de uren voorafgaand aan de weging. Deze grasopname wordt weer beïnvloed o.a. door het droge stofgehalte van het gras dus mede door het weer (nat versus droog). De hier vermelde gewichten wijken niet sterk af van die bepaald ruim een week voor het begin van de proef. De toegediende doseringen

antibiotica kwamen dan ook goed overeen met die hoeveelheden die per kg lichaamsgewicht toegediend moesten worden.
In tabel 3 staat de melkgift per melkmaal vermeld. De morgengift was hoger dan die van de avond omdat 's nachts het tijdsinterval ook langer was. De melktijden waren 's morgens tussen 7.00-7.30 en 's avonds tussen 17.00 en 17.30 uur. De melkgiften zien er verder redelijk regelmatig uit, behalve dier 1931 op 2 juni 's avonds. Mogelijk is zij toen niet volledig leeggemolken (melk niet laten schieten?).
In tabel 4 wordt de melksamenstelling gegeven. Zoals gebruikelijk zijn de spreiding in eiwit- en lactosegehalten minder groot dan die van het vet.

Conclusie

De proef had een onverstoord verloop. De variatie in melkproduktie van deze oudmelkse koeien was niet groot. Wel was de variatie in vetgehalte relatief gezien groot.

Tabel 1. Bijzonderheden van de dieren

Groep	Behandeling	Diernr.	Geboortedatum	Kalfdatum	Gem. melkprod. 30-5 t/m 5-6 (kg/dag)	Gem. gew. 30-5 t/m 5-6 (kg)	Dosering antibioticum (ml per keer)
1	geen	16	14-10-88	01-10-90	20	569	-
		1820	18-10-86	17-10-90	24	624	-
		1954	18-11-87	01-11-90	15	643	-
2	Engemycine	7	06-10-88	13-10-90	19	596	36
		1679	13-10-85	21-11-90	22	662	40
		1961	05-12-87	22-12-90	19	664	40
3	Doxycycline	23	18-10-88	25-10-90	18	572	57
		1806	08-10-86	15-11-90	20	710	71
		1931	01-10-87	17-10-90	21	581	58

Opm. 1) Op 11-06, 12-06 en 13-06 om 7.30 uur geïnjiceerd

Tabel 2. Gewichten (gemiddelde van drie opeenvolgende dagen, in kg)

Groep 1 (controle)

Data	Dier 16	Dier 1820	Dier 1954
11/6	569	623	648
14/6	569	616	649
17/6	568	618	642
20/6	567	619	643
Gem.	568	619	646

Groep 2 (Engemycine)

Data	Dier 7	Dier 1679	Dier 1961
11/6	589	651	666
14/6	591	640	666
17/6	586	643	664
20/6	588	649	667
Gem.	588	646	666

Groep 3 (Doxycycline)

Data	Dier 23	Dier 1806	Dier 1931
11/6	570	710	593
14/6	561	704	591
17/6	565	710	585
20/6	570	705	583
Gem.	566	707	588

Opm. 1) Dosering oxytetracyclinebase voor de dieren 7, 1679 en 1961 resp. 6,1 6,1 en 6,0 mg per kg lichaamsgewicht

2) Dosering deoxytetracyclinebase voor de dieren 23, 1806 en 1931 resp. 10,0, 10,0 en 9,8 mg per kg lichaamsgewicht

Tabel 3. Melkproduktie (in kg)

	avond	morgen	avond	morgen	avond	morgen
			Groep 1 (controle)			
Data	Dier 16		Dier 1820		Dier 1954	
10/6-11/6	-	11,5	-	12,6	-	8,3
11/6-12/6	8,1	11,2	10,5	13,0	6,4	8,4
12/6-13/6	9,5	12,5	11,2	13,9	6,9	9,0
13/6-14/6	8,0	12,5	9,6	12,7	7,0	9,1
14/6-15/6	8,4	12,6	11,1	12,4	6,6	8,8
15/6-16/6	8,9	12,7	9,9	13,1	6,7	9,4
16/6-17/6	8,7	12,1	10,5	14,6	6,5	8,9
17/6-18/6	8,4	11,6	9,6	12,4	6,0	8,6
18/6-19/6	7,4	11,4	9,6	10,5	6,6	7,9
19/6-20/6	8,4	10,8	10,0	10,2	6,7	6,5
20/6-21/6	7,5	11,9	8,4	12,7	6,9	6,0
Gem.	8,3	11,9	10,0	12,6	6,6	8,3

			Groep 2 (Engemycine)			
Data	Dier 7		Dier 1679		Dier 1961	
10/6-11/6	-	13,0	-	12,3	-	8,6
11/6-12/6	9,1	10,7	8,7	11,9	6,5	9,4
12/6-13/6	8,8	13,3	8,8	10,6	7,1	9,6
13/6-14/6	9,3	13,3	7,6	9,9	7,5	9,0
14/6-15/6	9,5	13,5	7,4	12,3	7,5	9,9
15/6-16/6	9,5	13,2	7,8	12,8	7,8	10,5
16/6-17/6	9,3	13,3	9,2	12,7	7,4	10,6
17/6-18/6	8,7	13,6	8,4	13,1	7,2	10,1
18/6-19/6	8,8	12,9	8,2	12,1	7,7	9,1
19/6-20/6	8,7	12,6	8,5	11,5	7,3	7,0
20/6-21/6	8,5	13,3	8,5	13,0	8,4	7,0
Gem.	9,0	13,0	8,3	12,0	7,4	9,2

	avond	morgen	avond	morgen	avond	morgen
			Groep 3 (Doxycycline)			
Data	Dier 23		Dier 1806		Dier 1931	
10/6-11/6	-	10,8	-	10,9	-	11,8
11/6-12/6	8,6	8,0	7,3	10,3	9,6	11,0
12/6-13/6	7,0	10,3	8,5	12,5	9,1	13,0
13/6-14/6	6,4	10,8	8,0	11,5	8,9	12,1
14/6-15/6	7,6	10,1	8,0	11,0	9,7	11,4
15/6-16/6	5,5	10,3	7,6	10,8	9,6	9,9
16/6-17/6	7,8	11,1	9,2	10,5	9,6	11,9
17/6-18/6	7,2	10,8	7,1	10,7	8,2	12,4
18/6-19/6	7,8	11,0	7,2	10,2	8,0	10,6
19/6-20/6	7,1	8,9	8,0	9,9	9,1	9,6
20/6-21/6	7,8	10,1	6,7	10,6	4,4	14,5
Gem.	7,3	10,2	7,8	10,8	8,6	11,7

Tabel 4. Melksamenstelling (in %)

Data	vet	eiwit	laktose	vet	eiwit	laktose	vet	eiwit	laktose
				Groep 1					
		Dier 16			Dier 1820			Dier 1954	
11/6 av	4,77	3,41	4,64	4,71	3,33	4,31	5,16	4,04	4,20
12/6 mo	3,99	3,50	4,64	3,37	3,38	4,48	4,19	4,14	4,24
12/6 av	4,77	3,56	4,71	4,54	3,40	4,46	4,54	4,06	4,29
13/6 mo	4,12	3,47	4,67	3,13	3,45	4,42	3,67	4,17	4,30
18/6 av	5,26	3,41	4,75	4,24	3,38	4,49	4,94	4,03	4,17
19/6 mo	4,10	3,47	4,76	3,33	3,43	4,63	4,41	4,12	4,30
19/6 av	4,78	3,38	4,73	4,49	3,34	4,42	4,70	3,97	4,18
20/6 mo	4,08	3,39	4,77	2,85	3,44	4,58	3,96	4,01	4,25
Gem.*	4,48	3,45	4,71	3,83	3,39	4,47	4,45	4,07	4,24
				Groep 2					
		Dier 7			Dier 1679			Dier 1961	
11/6 av	3,71	3,52	4,45	5,25	3,58	4,53	5,37	3,62	4,03
12/6 mo	3,31	3,50	4,51	4,28	3,35	4,65	3,63	3,59	4,27
12/6 av	3,64	3,54	4,60	5,04	3,30	4,74	4,80	3,52	4,30
13/6 mo	3,45	3,51	4,51	4,66	3,24	4,75	3,53	3,46	4,31
18/6 av	3,88	3,65	4,64	4,66	3,79	4,58	5,05	3,64	4,18
19/6 mo	3,35	3,61	4,60	4,65	3,75	4,62	3,37	3,66	4,23
19/6 av	3,85	3,55	4,61	4,57	3,76	4,54	4,33	3,57	4,14
20/6 mo	3,44	3,59	4,60	4,29	3,69	4,45	2,35	3,66	4,21
Gem.*	3,58	3,56	4,56	4,68	3,56	4,61	4,05	3,59	4,21

Groep 3

	Dier 23			Dier 1806			Dier 1931		
11/6 av	5,97	3,82	4,60	-	-	-	5,58	3,94	4,37
12/6 mo	5,44	3,59	4,71	3,65	3,56	4,46	3,94	4,06	4,49
12/6 av	5,50	3,61	4,76	5,06	3,52	4,46	5,57	3,92	4,51
13/6 mo	5,39	3,58	4,70	3,93	3,57	4,38	4,60	4,03	4,51
18/6 av	5,45	3,91	4,50	5,31	3,79	4,32	5,83	4,07	4,41
19/6 mo	4,90	3,90	4,56	3,71	3,77	4,41	3,54	4,14	4,52
19/6 av	5,69	3,89	4,53	4,64	3,65	4,33	6,37	3,93	4,38
20/6 mo	4,63	4,04	4,57	3,38	3,73	4,43	3,87	4,12	4,43
Gem.*	5,37	3,79	4,62	4,24	3,66	4,40	4,91	4,03	4,45

* is rekenkundig gemiddelde