

Rückstandsbestimmung von Sulfonamiden und deren N- Metaboliten in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC = Residue determination of sulfonamides and their N-metabolites in meat, liver and kidney by HPLC

Autor(en): **Rychener, M. / Mooser, A.E. / Koch, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **81 (1990)**

Heft 5

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982625>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Rückstandsbestimmung von Sulfonamiden und deren N⁴- Metaboliten in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC*

Residue Determination of Sulfonamides and their N⁴-Metabolites in Meat, Liver and Kidney by HPLC

M. Rychener, A. E. Mooser und H. Koch
Bundesamt für Veterinärwesen, Liebefeld-Bern

Einleitung

Die Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe vom 27. Februar 1986 (Ergänzung vom 29. Juni 1988) legt für Sulfonamidrückstände in Fleisch und Fleischwaren einen Toleranzwert von 0,1 mg/kg (= 100 ppb, als Summe der Muttersubstanzen und der N⁴-Acetylmotaboliten) als vorläufige Weisung fest. Damit essbare tierische Gewebe auf diesen Toleranzwert hin überprüfbar sind, wurde es nötig, eine Methode zu entwickeln und in die Routine einzuführen, die es erlaubt, bei einer probenbezogenen Nachweisgrenze von höchstens 100 ppb die in der Tiermast am häufigsten eingesetzten Sulfonamide in Fleisch, Leber und Niere quantitativ zu bestimmen. Tabelle 1 führt eine Auswahl von Veröffentlichungen zur Probenaufbereitung und chemischen Analytik von Sulfonamiden in biologischen Proben auf. Bei der Probenaufbereitung geht der Festphasenextraktion (SPE) in der Regel die Extraktion aus der Matrix, die Entfettung mit Hexan sowie eine Verteilung voraus. Das Hauptproblem ist dabei die Isolierung der Sulfonamide aus den mit einer grossen Menge von Begleitstoffen belasteten Gewebeextrakten, mit denen handelsübliche Fertigkartuschen für Festphasenextraktion (chromatographische Reinigung) leicht überladen werden. Dass die verschiedenen Sulfonamide recht unterschiedliche pK_a-Werte und chromatographische Eigenschaften aufweisen, setzt den Reinigungsmöglichkeiten ebenfalls gewisse Grenzen, wenn nicht erhebliche Verluste bestimmter Sulfonamide in Kauf genommen werden wollen. Immerhin liegen bei pH 5,0–5,2 alle gängigen Sulfonamide als ungeladene Molekeln vor (1) und lassen sich aus einer wässrigen in eine mittelpolare organische Phase überführen. Für die Gaschromatographie müssen die schwerflüchtigen Sulfonamide durch Methylierung und Acylierung derivatisiert werden (2, 3), was zusätzliche Aufarbeitungsschritte darstellt, welche die Gesamt-reproduzierbarkeit negativ beeinflussen können.

* Teilweise präsentiert als Poster an der «Euro Residue Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, May, 21–23, 1990, Noordwijkerhout, The Netherlands»

Tabelle 1. Literatur zur Probenaufbereitung und chromatographischen Analytik von Sulfonamiden in biologischen Medien

Lit.	Matrix	Reinigung	Methode
(4)	Fisch	SPE (Alox)	HPLC-UV
(5)	Gewebe, Blut	Ionenpaar-Extraktion	HPLC-UV
(1)	Fleisch, Eier, Milch	Dialyse, Anreicherung	HPLC-UV
(6)	Forellen, Karpfen	SPE (Kieselgel)	HPLC-ELD
(7)	Schweinemuskel, -niere	SPE (SepPak C18)	HPLC-UV
(8)	Schweinemuskel, -leber	SPE (XAD-2)	HPLC-UV
(9)	Schweineleber, gefroren	SPE (Duolite ES-863, Alox)	HPLC-UV
(10)	Humanserum, Urin	SPE (SepPak C18)	HPLC-UV
(11)	H.serum, Synovialfl.	Ionenpaar, Extraktion	HPLC-UV
(12)	Geflügelgewebe	SPE (Alox)	HPLC-ELD
(13)	Milch	Extraktion/Verteilung	HPLC-UV
(14)	Fleisch, Milch, Eier	SPE (Kieselgel)	HPLC-UV GC-TSD
(15)	Gewebe, Milch, Eier	Extraktion/Verteilung	HPLC-FLD
(16)	Plasma, Urin	Extraktion	HPLC-UV TLC
(17)	Eier	Dialyse, SPE (XAD)	HPLC-UV
(18)	Gewebe, Exkremente	SPE (XAD-2)	HPLC-UV
(19)	Gewebe	Extraktion/Verteilung	GC-ECD GC-MS
(2)	Gewebe, Eier	Gelfiltr. (Sephadex LH-20)	GC-TSD
(20)	Schweinegewebe	SPE (XAD-2)/RP-HPLC	GC-MS
(3)	Gewebe	SPE (Florisil)	GC-MS
(21)	Schweineleber	Extraktion/Verteilung	GC-ECD GC-MS
(22)	Honig	Extraktion/Verteilung	TLC
(23)	Gewebe	SPE (Kationentauscher)	TLC
(24)	Geflügelleber	SPE (Alox, neutral)	TLC
(25)	Rattenexkremente	Extraktion/Verteilung	TLC
(26)	Schweineleber	Extraktion/Verteilung	TLC
(27)	Honig	Extraktion/Verteilung	TLC
(28)	Schweineniere	Extraktion	MS-MS

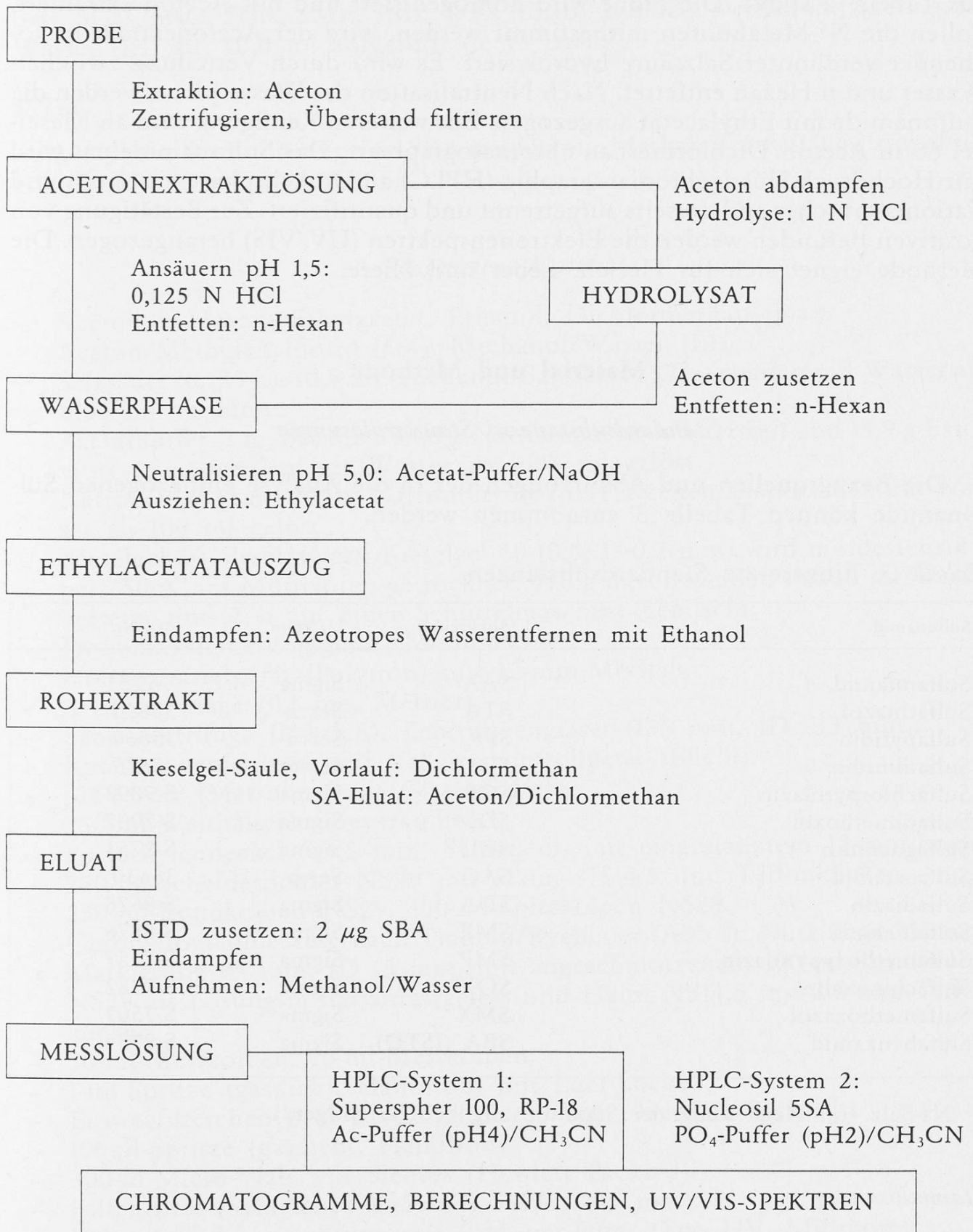
Verschiedene hochdruckflüssigchromatographische Analysenverfahren sind beschrieben worden, wie Tabelle 2 aufführt. Im allgemeinen wird als stationäre Phase ein Umkehrphasenmaterial und als mobile Phase ein Gemisch aus einer Pufferlösung mit pH 4,0–6,8 und einem polaren organischen Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol verwendet. Die Sulfonamide können mittels UV-Absorption bei 254–280 nm oder allenfalls elektrochemisch nachgewiesen werden. SAA (Abkürzungen der Sulfonamide siehe Tabelle 3) und SGU zeigen zudem eine natürliche Fluoreszenz.

Tabelle 2. Literatur zu HPLC-Bedingungen

Lit.	Stationäre Phase	Mobile Phase	Detektion
Sulfonamide, allgemein:			
(4)	Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm)	THF/CH ₃ CN/H ₃ PO ₄ /H ₂ O (29:1:0,06:69,94; 0,6 ml/min)	UV (260 nm)
(1)	LiChrosorb RP-8, 10 μ Cp TM-Spher C18, 7 μ μBondapak C18, 10 μ (250 x 4,6 mm)	NaOAc (0,05 m, pH 4,6)/CH ₃ CN (825:125; 1 ml/min)	UV (280 nm) UV (450 nm) ¹
(8)	Cp TM-Spher C8, 8 μ (250 x 4 mm)	NH ₄ OAc (10 mM, pH 4,6)/CH ₃ CN (7:3; 1,5 ml/min)	UV (254 nm)
(14)	Spherisorb ODS, 5 μ (250 x 4,6 mm)	A: NaOAc (20 mM, pH 4,8) B: CH ₃ CN/H ₂ O (6:4) 100%B → 10%B (40 min, 1,5 ml/min)	UV (275 nm)
SAA, SGU:			
(15)	Nucleosil 5SA (200 x 4 mm)	NaH ₂ PO ₄ (50 mM, pH 2,0)/MeOH (85:15; 1 ml/min)	FLD (275/ 340 nm)
SGU:			
(17)	Hypersil 5 ODS (250 x 4,6 mm)	H ₂ O/CH ₃ CN/HOAc (970:20:10)	UV (450 nm) ¹
SME:			
(16)	LiChrosorb RP-8, 5 μ (150 x 4,6 mm)	KH ₂ PO ₄ (67 mM)/Na ₂ HPO ₄ (67 mM)/ EtOH (500:10:75; 1,6 ml/min)	UV (272 nm)
SDM:			
(5)	μ-Porasil (300 x 3,9 mm)	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O/NH ₄ OH (1000:28:2:0,5; 2 ml/min)	UV (288 nm)
SDD:			
(6)	LiChrosorb RP-18, 5 μ (250 x 4 mm)	34 mM NH ₄ SO ₄ + 5 ml HOAc/MeOH (7:3; 0,7 ml/min)	ELD (1100 mV, 50 nA)
(7)	Hypersil ODS, 5 μ (250 x 4 mm)	NH ₄ OAc (10 mM, pH 6,8)/CH ₃ CN (3:1)	UV (254 nm)
(9)	Supelcosil LC-18 (250 x 4 mm)	H ₂ O/CH ₃ CN/iPrOH (94,5:5:0,5; 1 ml/min)	UV (266 nm)
(18)	Radial Pak-C18	A: MeOH, B: H ₂ O 95%B → 0%B (30 min, 3 ml/min)	UV (280 nm)
SDD, SDM, SQX:			
(13)	Supelco LC-18-DB (250 x 4,6 mm)	KH ₂ PO ₄ (0,1 m)/MeOH (7:3; 1,5 ml/min Spülen: H ₂ O/MeOH (4:6)	UV (265 nm)
SPR:			
(10)	Hypersil ODS, 5 μ (100 x 2,1 mm)	A: H ₂ O/MeOH (3:7) B: Na ₂ HPO ₄ (66,6 mM)/MeOH (7:1) 100%B → 0%B (8 min, 0,2 ml/min)	UV (254 nm)
(11)	MOS-Hypersil, 5 μ (100 x 2,1 mm)	A: MeOH B: KH ₂ PO ₄ (10 mM) 70%B: 0-2 min, 20%B: 2-6,5 min	UV (254, 360 nm)
Sulfanitran:			
(12)	Supelcosil LC-18, 5 μ (250 x 4,6 mm)	KH ₂ PO ₄ (50 mM, pH 6,0, 0 + 1 mM EDTA)/MeOH (57,5:42,5; 1 ml/min)	ELD (-800 mV, 20 nA)

¹ Nachsäulen-Derivatisierung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd

Diagramm 1. Schema der Probenaufbereitung und Analyse von Sulfonamiden



Für unsere Zwecke eignet sich der im Diagramm 1 dargestellte Aufbereitungs- und Analysenprozess, welcher sich im wesentlichen auf die Veröffentlichungen aus Tabelle 2 stützt. Die Probe wird homogenisiert und mit Aceton extrahiert. Sollen die N⁴-Metaboliten mitbestimmt werden, wird der Acetonextrakt in kochender verdünnter Salzsäure hydrolysiert. Es wird durch Verteilung zwischen Wasser und n-Hexan entfettet. Nach Neutralisation der Wasserphase werden die Sulfonamide mit Ethylacetat ausgezogen. Zur weiteren Reinigung wird an Kieselgel 60 in Aceton/Dichlormethan chromatographiert. Das Sulfonamideluat wird mit Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) an Umkehrphase einerseits und Kationentauscher andererseits aufgetrennt und quantifiziert. Zur Bestätigung von positiven Befunden werden die Elektronenspektren (UV/VIS) herangezogen. Die Methode eignet sich für Fleisch, Leber und Niere.

Material und Methode

Standardsubstanzen, Standardlösungen

Die Bezugsquellen und Abkürzungen der in die Analyse einbezogenen Sulfonamide können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3. Eingesetzte Standardsubstanzen

Sulfonamid	Abkürzung	Lieferant	Art.-Nr.
Sulfanilamid	SAA	Sigma	S-9251
Sulfathiazol	STA	Serva	35690
Sulfapyridin	SPR	Serva	35860
Sulfadimidin	SDD	Serva	35635
Sulfachlorpyridazin	SCP	Sigma	S-9892
Sulfadimethoxin	SDM	Sigma	S-7007
Sulfaguanidin	SGU	Sigma	S-8751
Sulfacetamid	SAC	Serva	35630
Sulfadiazin	SDA	Sigma	S-8626
Sulfamerazin	SME	Sigma	S-8876
Sulfamethoxyridazin	SMP	Sigma	S-7257
Sulfachinoxalin	SQX ¹	Sigma	S-7382
Sulfamethoxazol	SMX	Sigma	S-7507
Sulfabenzamid	SBA (ISTD)	Sigma	S-9757

¹ Na-Salz (für Herstellung der Stammlösung berücksichtigen!)

Stammlösungen

50,0 mg Sulfonamid werden mit Methanol zu 50 ml gelöst (1,0 mg/ml).

Standards A und B

100 μl der Stammlösungen von SAA, STA, SPR, SDD, SCP, SDM (für A), bzw. SGU, SAC, SDA, SME, SMP, SQX (für B) und SBA werden mit Methanol/Wasser (1:1) auf 10,0 ml aufgefüllt (je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

ISTD

200 μl der Stammlösung von SBA werden mit Methanol auf 10,0 ml aufgefüllt (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Reagenzien, Material

- Aceton, n-Hexan, Ethylacetat, Ethanol, Dichlormethan (p.a.).
- Aceton/Methylenchlorid (6:4), Methanol/Wasser (1:1).
- Salzsäure (0,125 n): 10,5 ml rauchende Salzsäure (37%) werden mit Wasser auf 1000 ml verdünnt.
- Acetatpuffer (1 m, pH 5,2): 63,0 g Natriumacetat (wasserfrei) und 13,9 g Essigsäure (p.a.) werden mit Wasser zu 1000 ml gelöst.
- Natronlauge (5 n): 20,0 g Natriumhydroxid (Plätzchen, p.a.) werden mit Wasser zu 100 ml gelöst.
- Kieselgel 60, desaktiviert: Kieselgel 60 (0,063–0,2 mm) wird mindestens 8 h bei 250 °C im Muffelofen getrocknet. 490 g davon werden mit 10 ml Wasser versetzt und 2 h auf einer Schüttelmaschine gemischt.
- Probenzerkleinerungsgerät (Moulinex).
- Homogenisiergerät (Polytron) mit 12-mm-Mixstab.
- Analysenwaage (0,1 mg, Mettler).
- Laborzentrifuge (Hettich), Zentrifugengläser (135 mm, ID: 33 mm).
- Rotationsverdampfer mit Vakuumkontrollgerät (Büchi).
- pH-Meter (Metrohm) mit Glaselektrode.
- 250-ml-Weithalslerlenmeyerkolben.
- Polyethylendeckel (33,5 mm, Semadeni) mit eingestanztem 12-mm-Loch.
- 250-ml-Scheidetrichter NS29 mit Hahn NS14,5 und Teflonkücken.
- 250-ml-Rundkolben NS29, 100-ml-Spitzkolben NS29.
- Chromatographiesäule nach Trabold/Rychener (Abb 1): Nutzlänge 250 mm, Markierung 85 mm, ID 15 mm, mit angeschmolzenem 100-ml-Rundkolben NS29 als Lösungsmittelvorratsgefäß und Hahn NS14,5 mit 2,5-mm-Teflonkücken.
- 50-ml-Messkolben, 10-ml-Messkolben.
- 1-ml-Spritze (gasdicht, Hamilton) mit Luer-Lock.
- Einwegfilterchen 0,45 μ (Cellulose, 13 mm, Hewlett Packard).
- 100- μl -Spritze (gasdicht, Hamilton).
- 300- μl -Micro-Vials mit Sleeves (Hewlett Packard).
- Faltenfilter (Schleicher & Schüll 597 $\frac{1}{2}$, 125 mm).
- Vakuumfiltriereinrichtung mit 0,45 μm -Filter (Typ HV, Millipore).



Abb. 1. Chromatographie-Säule nach Trabold/Rychener

Probenaufbereitung

Extraktion der Probe

Das Probengut wird mit der Moulinette S zu einem feinen Brät bzw. Brei zerhackt. 10,0 g der Probe werden in ein Zentrifugenglas eingewogen, 40 ml Aceton zugefügt und 1–2 min mit dem Polytron homogenisiert. Um Spritzer zu vermeiden, wird mit einem gelochten Polyethylendeckel abgedeckt. Die Mischung wird zentrifugiert (5 min/4000 Umin⁻¹ \approx 2800 g) und der Überstand durch ein Faltenfilter in einen 250-ml-Erlenmeyer filtriert. Der Rückstand wird mit einem Spatel etwas zersto­chert, mit 20 ml Aceton versetzt und nochmals 1 min mit dem Polytron bear­beitet. Es wird erneut zentrifugiert und der Überstand zum ersten Filtrat filtriert.

Entfetten

Die vereinten Filtrate werden mit 60 ml Salzsäure (0,125 n) versetzt und in einem 250-ml-Scheidetrichter zweimal mit 50 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die n-Hexanphasen werden verworfen, die Wasserphase mit 10 ml Acetatpuffer (1 m, pH 5,2) versetzt und mit Natronlauge (5 n) auf pH 5,0 bis 5,1 eingestellt.

Rückextraktion

Die Wasserphase wird in zwei Portionen mit 60 ml und 40 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinten Ethylacetatphasen am Rotationsverdampfer (45 °C/180 mbar) eingengt auf etwa 2 ml. Nach Zugabe von ca. 15 ml absolutem Ethanol wird zur Trockene eingedampft (50 °C/40 mbar) und sofort in 5 bis 7 ml Dichlormethan aufgenommen.

Vorbereiten der Kieselgel-Säule

Eine Chromatographiesäule nach Trabold/Rychener (Abb. 1) wird trocken 8,5 cm hoch mit Kieselgel gefüllt, 60 ml Dichlormethan zugegeben und durch Umschwenken der Säule eine gleichmässige Aufschlammung hergestellt. Man lässt das Kieselgel bei geschlossenem Hahn sedimentieren, spült das am Glas anhaftende Kieselgel mit etwas Dichlormethan ab und lässt das Dichlormethan in einen 100-ml-Spitzkolben bis auf 0,5 cm über der Höhe des Kieselgels ab. Leichtes Klopfen an die Säule verbessert die Sedimentation.

Chromatographie an Kieselgel

Die Rohextraktlösung wird sorgfältig auf die Säule aufgetragen und zweimal mit 1 bis 2 ml Dichlormethan nachgespült. Das Dichlormethan aus dem Spitzkolben wird vorsichtig überschichtet und durchlaufen gelassen, bis der Flüssigkeitsspiegel Betthöhe erreicht hat. Es wird mit 40 ml Aceton/Dichlormethan (6:4) überschichtet und weitereluiert, bis sich die Acetonfront etwa 1 cm vor Säulenende befindet, was gegen dunklen Hintergrund sichtbar ist. Danach wird der Rest des spontan ausfliessenden Eluats im Spitzkolben aufgefangen.

Messlösung herstellen

Es wird 100 µl ISTD zugesetzt, das Eluat am Rotationsverdampfer (45 °C/300 mbar) eingedampft, der Rückstand in 300 µl Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen und die Messlösung mit Hilfe einer 1-ml-Spritze mit Luer-Lock durch ein Einwegfilterchen (0,45 µ) in ein Micro-Vial filtriert.

Analyse mit HPLC: Bedingungen, Vorgehen und Auswertung

HPLC-Bedingungen

Apparatur

HP1090 mit Diode Array Detector und ChemStation 9000/300.

Pufferlösungen

Acetatpuffer: In einem 2-l-Becher-Glas werden 3,85 g Ammoniumacetat in ca. 950 ml Wasser (bidest.) gelöst. Es wird mit Essigsäure (p.a.) auf pH 4,00 eingestellt. In einem 1-l-Messkolben wird auf 1000 ml aufgefüllt und die Lösung durch ein 0,45- μ -Filter filtriert.

Phosphat-Puffer/Acetonitril (84:16): In einem 2-l-Becherglas werden 6,90 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat in ca. 950 ml Wasser (bidest.) gelöst. Mit ortho-Phosphorsäure (p. a., 85%) wird auf pH 2,00 eingestellt und mit Wasser in einem 1-l-Messkolben zum Liter aufgefüllt. Es wird durch 0,45- μ -Filter filtriert und 190 ml Acetonitril zugefügt.

System 1 (Umkehrphase)

Säule: Stahlkartusche (LiChroCART, Merck) 125 mm, ID: 4 mm, mit Schnell-Verschraubung (manu-CART «4», Merck).
Vorsäule: Stahlkartusche (LiChroCART, Merck) 4 mm, ID: 4 mm, gefüllt mit LiChrospher 100 RP-18, 5 μ .
Stationäre Phase: Superspher 100 RP-18, 5 μ (Merck).
Mobile Phase: Acetonitril / Acetatpuffer (19:81).
Fluss: 2,00 ml/min.
Ofentemperatur: 40 °C.
Elutionsdauer: 7,00 min.
Einspritzvolumen: 20 μ l.

System 2 (Kationentauscher)

Säule: Stahlsäule (Macherey-Nagel) 200 mm, ID: 4 mm.
Stationäre Phase: Nucleosil 5 SA, 5 μ (Macherey-Nagel).
Mobile Phase: A: Wasser/Acetonitril (82:18)
B: Phosphatpuffer/Acetonitril (84:16),
%B: ca. 50 (optimieren nach Säulenzustand).
Fluss: 1,50 ml/min.
Ofentemperatur: 45 °C.
Elutionsdauer: 12,00 min.
Einspritzvolumen: 20 μ l.

Diode Array Detector Parameter

Signal A:	270 (10) nm	Peakwidth:	0,050 min
Referenz:	590 (10) nm	Thereshold:	0,1 mAU
Bereich:	220–400 nm	Dauer:	gleich wie LC

Spektrenaufnahme peakkontrolliert.

Auswertung

Integration, Chromatogramm

Peakwidth:	0,050	Minimum Area:	5
Thereshold:	-8	Shoulders:	OFF
x-Achse:	7 min auf 0,7 Seiten (System 1)		
	12 min auf 0,6 Seiten (System 2)		
y-Achse:	-4 bis +100 mAU		

Report

Eine Eichung mit den Standards A und B erfolgt zu Beginn und am Ende jeder Serie. Mit beiden Standards wird je ein «Sample Table» in System 1 und 2 erstellt. Die Berechnung der Proben erfolgt nach der Methode ISTD mit einem Peakfenster von 5% für System 1 und einem solchen von 7,5% für System 2. Für beide Systeme werden «Reports» der beiden Sulfonamidgruppen A und B erzeugt, welche das Resultat direkt in ppb anzeigen («ISTD amount» = 200).

Validierung der Methode

Experimentelles

Testlösungen A und B

100 μ l der Stammlösungen von SAA, STA, SPR, SDD, SCP, SMX und SDM (für A) bzw. SGU, SAC, SDA, SME, SMP und SQX (für B) wurden mit Methanol auf 10,0 ml aufgefüllt (je 10 μ g/ml).

Experiment a

Am Beispiel von Schweineleber wurden für jede der beiden Sulfonamidgruppen A und B fünf analoge Ansätze durchgeführt, denen beim Einwiegen 100 μ l der Testlösungen A bzw. B zugesetzt wurden (1,0 μ g, entsprechend 100 ppb).

Experiment b

Schweineleber wurde je in zweifacher Ausführung für die beiden Gruppen A und B, mit 50, 75, 100 und 200 μ l der Testlösungen A bzw. II (entsprechend 50, 75, 100 und 200 ppb Sulfonamide) dotiert. Die Doppelansätze wurden jeweils an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Ebenso wurden zwei Ansätze mit undotierter Schweineleber analysiert (Blindwerte). Eine einfache Bestimmung erfolgte ferner für zugesetzte Mengen von 400 und 800 ppb.

Wiederfindungsrate

Weil gewisse Sulfonamid-Peaks in den Chromatogrammen von Verunreinigungen überlagert werden, ergeben sich für tiefe Gehaltsbereiche teilweise Wiederfindungsraten von über 100%. Immerhin liegen sie im kritischen Bereich um 100 ppb in der Regel mindestens in einem System unterhalb von 95%. SDA kann jedoch mit der beschriebenen Methode erst ab Gehalten von etwa 200 ppb ohne grössere Überschätzung bestimmt werden. Wie Tabelle 4 zeigt, liegen die durchschnittlichen Wiederfindungsraten in den relevanten Gehaltsbereichen praktisch durchwegs über 50% mit Ausnahme von SGU, bei welchem wegen zu starker Absorption an Kieselgel mit Verlusten bei der chromatographischen Reinigung gerechnet werden muss.

Reproduzierbarkeit

Aus sieben analogen Ansätzen mit dem kritischen Gehalt von 100 ppb wurde als Mass für die Genauigkeit für jedes Sulfonamid die Standardabweichung bestimmt, welche in beiden Systemen zwischen 1 und 35 ppb mit einem Durch-

Tabelle 4. Wiederfindungsraten der Probenaufbereitung (W) in %

Sollgehalt [ppb]	W System 1 [%]			W System 2 [%]		
	100 ¹	200 ²	200–800 ³	100 ¹	200 ²	200–800 ³
SAA	80	54	56	106	61	65
STA	138	119	115	70	41	45
SPR	72	55	57	64	54	59
SDD	72	59	61	75	57	64
SCP	96	74	70	77	79	76
SMX	70 ⁴	66	66	123 ⁴	90	90
SDM	120	76	76	98	68	73
SGU	93	52	41	62	36	36
SAC	75	47	54	107	120	104
SDA	174	114	92	115	75	77
SME	71	56	55	68	56	62
SMP	65	50	50	85	59	58
SQX	58	50	54	59	48	61

¹ $n = 7$.

² $n = 2$.

³ Mittelwerte aus den Experimenten mit Sollgehalten von 200, 400 und 800 ppb ($n = 4$).

⁴ $n = 2$.

schnitt von 12 bzw. 14 ppb liegt, wobei offensichtliche Fehlmessungen nicht berücksichtigt wurden (siehe Tabelle 5). Die Standardabweichung der Wiederholbarkeit, berechnet nach der Formel $s_r = \sqrt{(\Sigma d^2/2n)}$, wobei d die Differenz einer Doppelbestimmung und n die Anzahl Doppelbestimmungen bedeutet, wurde aus vier Doppelansätzen mit Gehalten von 50, 75, 100 bzw. 200 ppb bestimmt. Jeder Ansatz wurde mit HPLC zweimal gemessen. Dabei ergaben durchschnittlich sehr niedrige Abweichungen von 1,1 bzw. 1,4 ppb für die Analyse mit HPLC ohne Einbezug der Aufarbeitung («Einspritzfehler»). Die gesamte Methode ist nach Tabelle 5 mit Fehlern zwischen 3 und 33 ppb behaftet.

Tabelle 5. Standardabweichungen (s) und Standardabweichungen der Wiederholbarkeit ($s_r(a)$ und $s_r(m)$) in ppb bei einem Gehalt von 100 ppb

	System 1 (ppb)			System 2 (ppb)		
	s^1	$s_r(a)^2$	$s_r(m)^3$	s^1	$s_r(s)^2$	$s_r(m)^3$
SAA	9	0,8	9	30	0,4	4
STA	69 ⁴	2,4	27 ⁴	16	0,4	3
SPR	18	0,7	33	18	2,1	5
SDD	13	0,8	7	12	1,2	7
SCP	12	2,7	18	10	2,3	3
SMX	1 ⁵	0,9	3	11	0,6	6
SDM	35	0,5	12	16	0,8	6
SGU	11 ⁶	1,3	20	6	2,8	13
SAC	18	0,6	5	26 ⁴	1,4	44 ⁴
SDA	28 ⁴	1,4	32 ⁴	27	0,8	14
SME	6	1,0	9	7	0,9	22
SMP	5	1,0	5	6	2,0	10
SQX	8	0,8	6	6	2,2	10
Sulfonamide	12	1,1	12	14	1,4	9 ⁷

¹ Standardabweichung ($n = 7$).

² Standardabweichung der Wiederholbarkeit ($n = 8$) der Analyse mit HPLC allein.

³ Standardabweichung der Wiederholbarkeit ($n = 4$) der gesamten Bestimmung.

⁴ Zur Berechnung der mittleren Standardabweichung nicht berücksichtigt wegen überhöhter Wiederfindung (Überlagerung).

⁵ Differenz einer Doppelbestimmung.

⁶ Peak in 4 Ansätzen nicht gefunden ($n = 3$).

⁷ Durchschnittliche Standardabweichungen.

Nachweisgrenze

Verglichen mit der qualitativen Beurteilung der Chromatogramme ergibt die dreifache Standardabweichung gemäss Tabelle 5 von Ansätzen mit dem kritischen Gehalt von 100 ppb eine gute Schätzung für die mittleren Nachweisgrenzen, welche ausser bei SDA immer mindestens in einem System unter 50 ppb liegen. Die sicheren Bestimmungsgrenzen hängen davon ab, wie gut sich ein bestimmter Peak im Chromatogramm mit dem zugehörigen UV/VIS-Spektrum charakterisieren lässt und liegen unter Umständen etwas höher.

Beurteilung von Proben

Chromatogramme

Typische Retentionszeiten und Ansprechfaktoren können Tabelle 6 entnommen werden. In System 1 sind die Retentionszeiten über lange Zeit reproduzierbar, während sie in System 2 infolge des Alterns der Säule kürzer werden können. Dies kann bis zu einem gewissen Grad ausgeglichen werden, indem die Ionenstärke der mobilen Phase vor einer neuen Probenserie verkleinert und das System rekali­briert wird, was dank der geschickten Aufteilung der Komponenten des Fließmittels auf die Kanäle A und B des HPLC-Geräts leicht durch Verkleinern des Anteils B erreicht wird, ohne dass sich pH und Acetonitrilanteil stark ändern. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die Chromatogramme von dotierter Schweineleber mit System 1 und 2, aufgeteilt in die Gruppen A und B. STA und SDA, welche in System 1 dieselbe Retentionszeit aufweisen, werden unter diesen Bedingungen von Matrixpeaks überlagert und können nicht quantifiziert werden. In System 2 ist es vor allem schwierig, SAC zu erfassen, welches wegen seiner kurzen Retentionszeit leicht von Matrixpeaks überlagert wird. Zudem zeigen die Chromatogramme in System 2 Unterschiede der Retentionszeiten zwischen Gruppen A und B, was den wechselnden Von-Tag-zu-Tag-Zustand der Kationentauschersäule verdeutlicht.

UV/VIS-Spektren

Für jedes Sulfonamid wurde in System 1 und 2 eine Bibliothek der Referenzspektren angelegt, welche aus Chromatogrammen der Standards stammen. Aus Ansätzen dotierter Schweineleber mit 50, 100 und 200 ppb kann abgeschätzt werden, dass ein tatsächlicher Sulfonamidrückstand von 100 ppb aufgrund seines UV/VIS-Spektrums bestätigt werden kann. Tabelle 6 zeigt die auf diese Weise ermittelten Übereinstimmungszahlen (M), nach Hewlett Packard: Match) für 100 und 200 ppb.

Tabelle 6. Typische Retentionszeiten (t_R) in min, Ansprechfaktoren (R) in ng für eingespritzte Mengen von 200 ng sowie Übereinstimmungszahlen (M) für Gehalte von 100 bzw. 200 ppb

	System 1				System 2			
	t_R	R	M_{100}	M_{200}	t_R	R	M_{100}	M_{200}
SBA (ISTD)	3,24	0,847			3,85	0,677		
Gruppe A:								
SAA	0,74	0,763	497	617 ²	3,05	0,855	780	922
STA	1,04	0,855	110	162 ²	5,32	0,725	774	927
SPR	1,21	0,794	986	997	9,17	0,875	923	959
SDD	1,73	0,755	953	992	7,67	0,926	859	866
SCP	2,50	0,833	705	948	4,14	0,667	926	976
SMX	2,69	0,787	950	979	3,26	0,647	830	935
SDM	5,27	0,781	969	969	5,84	0,639	816	920
Gruppe B:								
SGU ¹	0,71	1,786	990	990 ³	5,34	0,990	748	755 ²
SAC	0,92	0,722	816	995	2,13	0,552	320	100 ²
SDA	1,04	0,690	723	895	3,84	0,662	895	930
SME	1,34	0,755	919	971	4,94	0,847	995	997
SMP	1,65	0,847	983	995	5,97	0,794	990	997
SQX	5,65	1,087	897	985	7,59	0,830	920	979

¹ Verschiedene Ansprechfaktoren in System 1 und 2 wegen unterschiedlicher Absorption bei den beiden pH der mobilen Phasen.

² Ungenügende Übereinstimmung bis 200 ppb.

³ Als Bestätigung unzuverlässig, da auch undotierte Leber eine Substanz mit identischer t_R uns sehr ähnlichem UV/VIS-Spektrum zeigt.

Entscheidungsgrundlagen für Proben

Die Beurteilung von Proben kann nach den folgenden Kriterien erfolgen: Erreicht eine Probe in einem oder beiden Systemen nicht den als Nachweisgrenze festgelegten Wert von 50 ppb, so gilt sie grundsätzlich als negativ. Überschreitet eine Probe diese Nachweisgrenze, so werden die UV/VIS-Spektren überprüft. Bei Übereinstimmungszahlen von über etwa 950 für Werte von >100 ppb und über etwa 900 für Werte von 50 bis 100 ppb in beiden Systemen wird die Probe als positiv bezeichnet. In zweifelhaften Fällen kann mit der Funktion «Peak Purity» noch die Einheitlichkeit eines Peaks überprüft werden. Die Chromatogramme der Systeme 1 und 2 einer Probe von importiertem Kaninchenfleisch mit einem gewachsenen Rückstand von 300 ppb SDM werden in Abbildung 4 gezeigt, während in Abbildung 5 die Chromatogramme einer mit 210 ppb SDD belasteten, inländischen Schweinefleischprobe dargestellt sind. In beiden Fällen charakterisieren die zugehörigen UV/VIS-Spektren die fragliche Substanz zweifelsfrei.

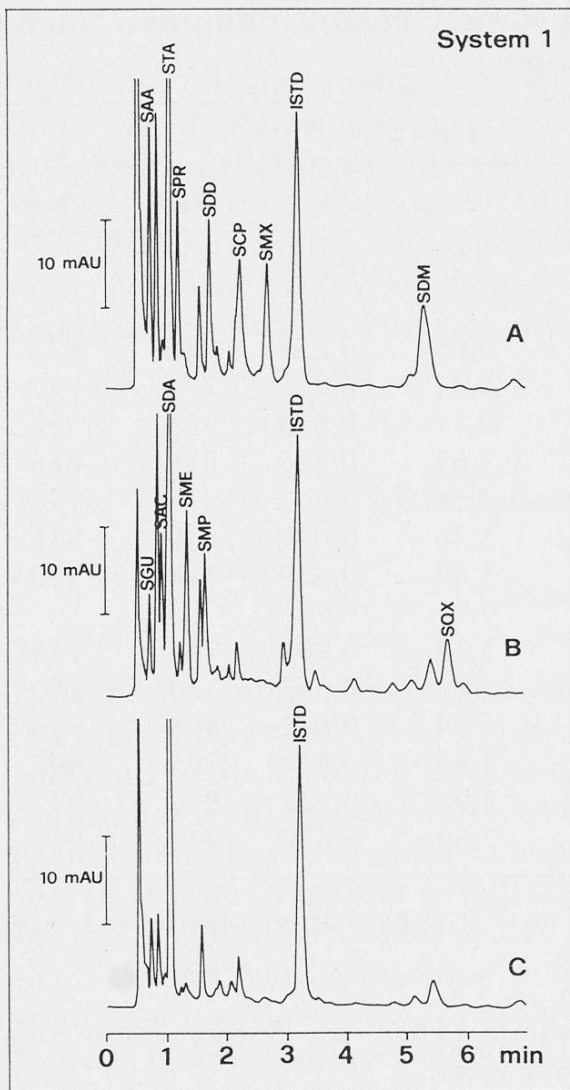


Abb. 2. Chromatogramme von Schweineleber, dotiert mit 100 ppb der entsprechenden Sulfonamide, System 1 (A: Gruppe A, B; Gruppe B, C: undotiert)

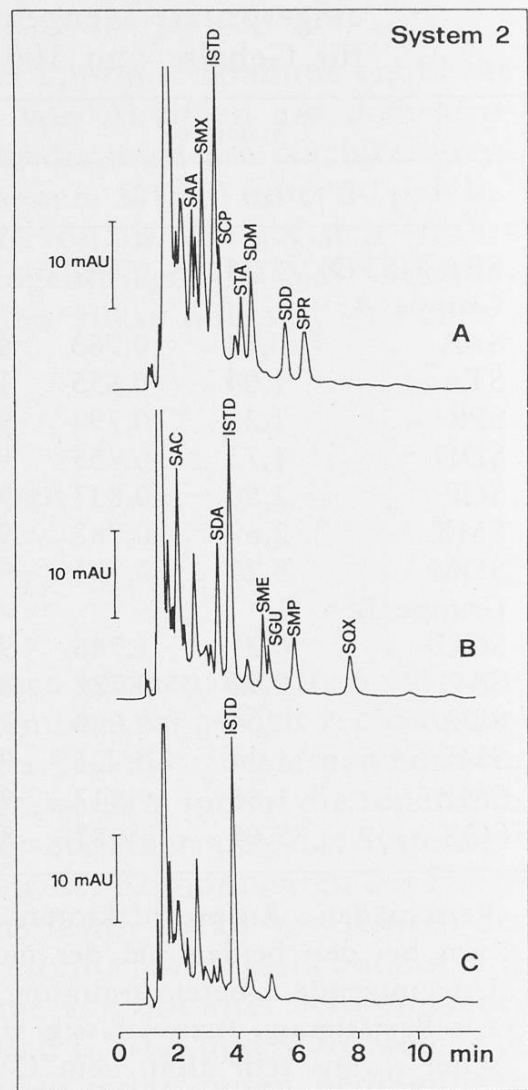


Abb. 3. Chromatogramme von Schweineleber, dotiert mit 100 ppb der entsprechenden Sulfonamide, System 2 (A: Gruppe A, B; Gruppe B, C: undotiert)

Bestimmung der hydrolysierbaren N⁴-Metaboliten

Experimentelles

Zusätzliches Material und Reagenzien für Hydrolyse

- Wasserbad (95 °C), Rückflusskühler NS29.
- Salzsäure (1 n): 83,0 ml rauchende Salzsäure (37%) werden mit Wasser auf 1000 ml verdünnt.
- Natriumacetat-Lösung (2,4 m): 193,9 g Natriumacetat (wasserfrei) werden in Wasser zu 1000 ml gelöst.

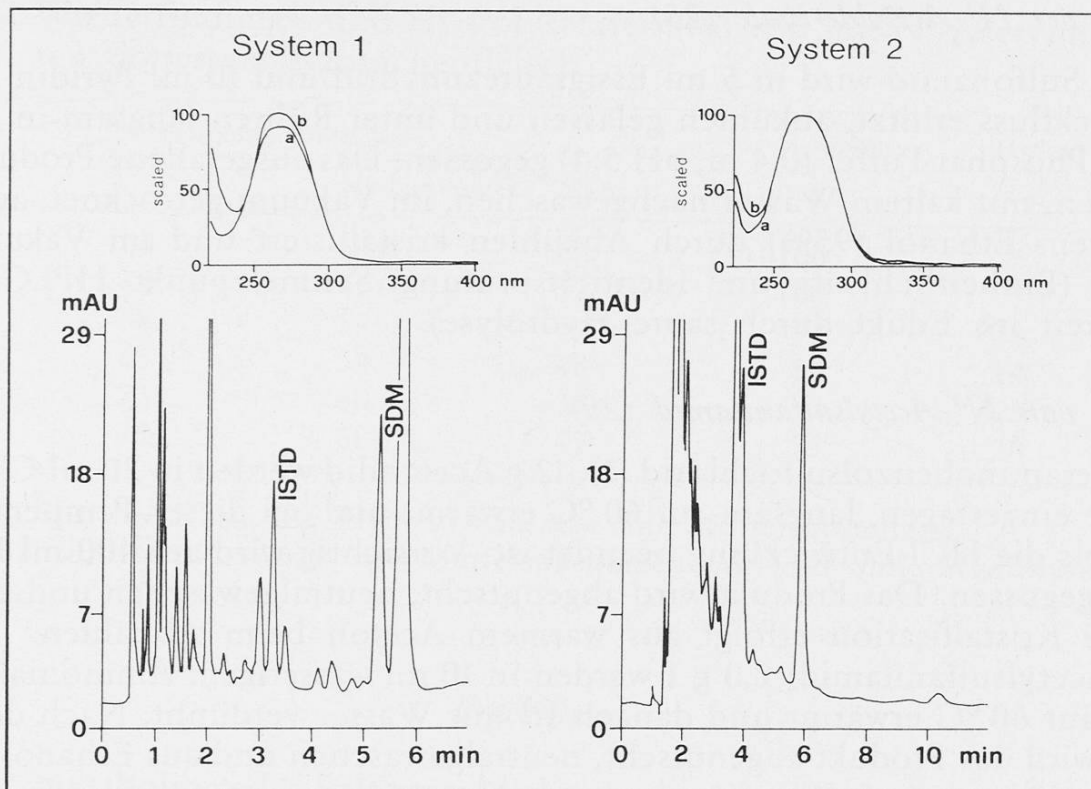


Abb. 4. Chromatogramme von Kaninchenfleisch mit einem gewachsenen Rückstand von 300 ppb SDM mit zugehörigen Proben- (a) und Referenz-Spektren (b)

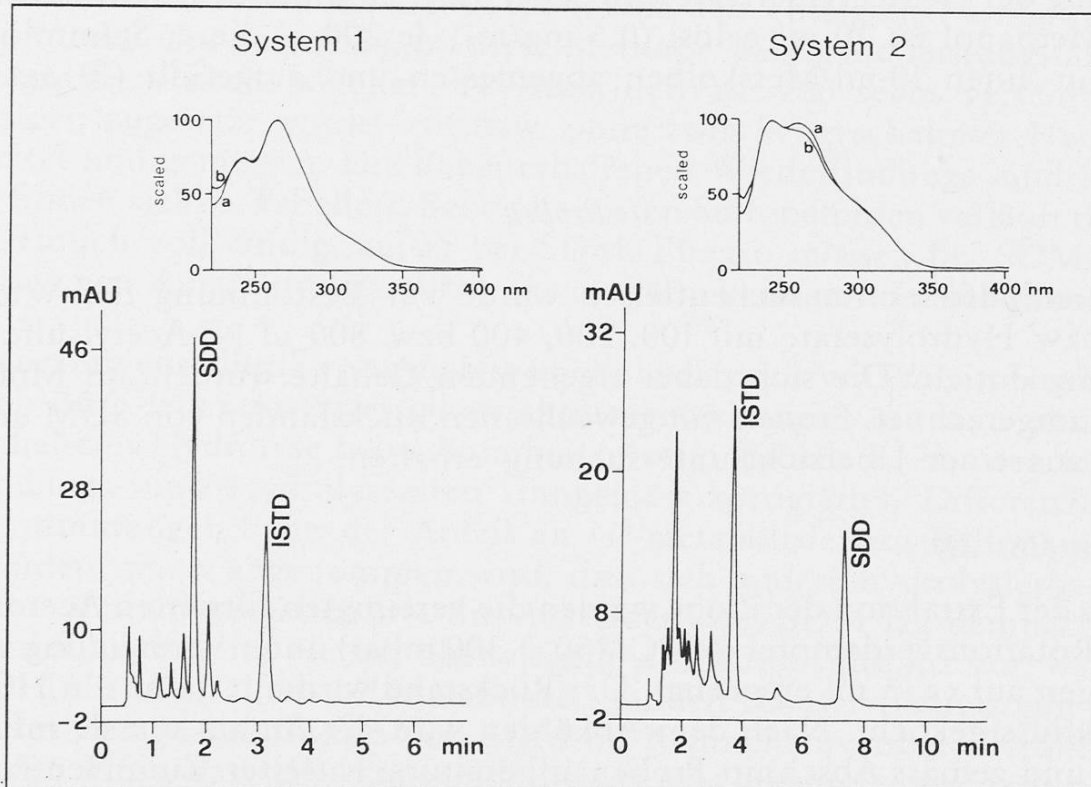


Abb. 5. Chromatogramme von Schweinemuskel mit einem echten Rückstand von 210 ppb SDD mit zugehörigen Proben- (a) und Referenz-Spektren (b)

Synthese der N⁴-Acetylderivate (25)

1,0 g Sulfonamid wird in 5 ml Essigsäureanhydrid und 10 ml Pyridin 30 min zum Rückfluss erhitzt, abkühlen gelassen und unter Rühren langsam in 250 ml Eis und Phosphat-Puffer (0,4 M, pH 5,4) gegossen. Das ausgefallene Produkt wird abgesogen, mit kaltem Wasser nachgewaschen, im Vakuum getrocknet, aus heiss gesättigtem Ethanol (95%) durch Abkühlen kristallisiert und im Vakuum getrocknet (Einheitlichkeits- und Identitätsprüfung: Schmelzpunkt, HPLC, Rückführbarkeit ins Edukt durch saure Hydrolyse).

Synthese von N⁴-Acetylsulfanilamid (29)

p-Acetaminobenzolsulfochlorid (**1**): 12 g Acetanilid werden in 20 ml Chlorsulfonsäure eingetragen, langsam auf 60 °C erwärmt und bei dieser Temperatur belassen, bis die HCl-Entwicklung beendet ist. Vorsichtig wird auf 400 ml Eis und Wasser gegossen. Das Produkt wird abgenutscht, neutralgewaschen und getrocknet. Die Kristallisation erfolgt aus warmem Aceton beim Abkühlen.

N⁴-Acetylsulfanilamid: 2,0 g **1** werden in 10 ml wässrigem Ammoniak (25%) 10 min auf 60 °C erwärmt und danach 1:1 mit Wasser verdünnt. Nach dem Abkühlen wird das Produkt abgenutscht, neutralgewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

N⁴-Acetylsulfonamid-Testlösung

10,0 mg der N⁴-Acetylderivate von SAA, STA, SPR, SCP, SDD und SDM werden in Methanol zu 20 ml gelöst (0,5 mg/ml). Je 200 µl dieser Stammlösungen werden in einen 10-ml-Messkolben abgemessen und aufgefüllt (10 µg/ml).

Proben

Sulfonamidfreies Kaninchenfleisch wurde zur Bestimmung der Wiederfindungs- bzw. Hydrolyserate mit 100, 200, 400 bzw. 800 µl N⁴-Acetylsulfonamid-Testlösung dotiert. Die sich dabei ergebenden Gehalte wurden auf Muttersubstanzen umgerechnet. Proben mit gewachsenen Rückständen von SDM und SAA wurden aus einer Übersichtsuntersuchung erhalten.

Hydrolyse (18, 21)

Nach der Extraktion der Probe werden die vereinigten filtrierten Acetonlösungen am Rotationsverdampfer (45 °C/450 → 300 mbar) unter Vermeidung von Siedeverzügen auf ca. 5 ml eingengt. Der Rückstand wird mit 55 ml 1 N HCl 0,5 h am Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz mit 60 ml Aceton versetzt und gemäss Abschnitt Probenaufbereitung entfettet. Zum Neutralisieren werden 10 ml Natriumacetatlösung und NaOH (5 N) bis zum gewünschten pH von 5,0 bis 5,1 zugegeben.

Tabelle 7. Wiederfindungs- und Hydrolyseraten (%) von mit N⁴-Acetylmetaboliten dotiertem Kaninchenfleisch

	Wiederfindungsrate (%)			Hydrolyse-	Hydrolyse-
	ohne	mit Hydrolyse Muttersubstanz	N ⁴ -Ac	rate (%) ¹	verlust (%) ²
SAA	60	57	62	100	5
STA	45	42	52	100	7
SPR	58	54	51	94	11
SCP	63	54	48	89	14
SDD	73	60	58	97	3
SDM	75	60	45	75	20

¹ Bezogen auf die Werte der Hydrolyseansätze mit Muttersubstanzen.

² Berechnet aus den Ansätzen der Muttersubstanzen mit und ohne Hydrolyse.

Ergebnisse

Da N⁴-Metaboliten der Sulfonamide bei oraler Einnahme im sauren Magenmilieu hydrolysiert werden können, sollten diese als Rückstände mitbestimmt werden können, wie dies die Fremdstoffverordnung auch vorschreibt. Dazu bietet sich die Möglichkeit an, nach saurer Hydrolyse (21) der N⁴-Acetyl-, Glucosyl- und Glucuronylderivate in den Gewebeextrakten den Totalgehalt an Sulfonamiden zu ermitteln. Um zu prüfen, ob diese Methode genügend leistungsfähig sei, wurde Kaninchenfleisch, welchem N⁴-Acetyl-derivate von sechs verschiedenen Sulfonamiden zugesetzt wurde, mit bzw. ohne zwischengeschalteter Hydrolyse aufgearbeitet und gemessen. Die dabei erhaltenen Wiederfindungs- und Hydrolyseraten finden sich in Tabelle 7. Bei den meisten Sulfonamiden verläuft die Hydrolyse ziemlich vollständig, ausser bei SDM. Ebenso müssen bei SDM durch den zusätzlichen Aufarbeitungsschritt am meisten Verluste in Kauf genommen werden.

Eine Zusammenstellung von Analyseergebnissen positiver Proben von Kaninchenfleisch und -leber aus zwei Übersichtsuntersuchungen mit und ohne zwischengeschalteter Hydrolyse beim Aufarbeiten zeigt Tabelle 8. Aus den mit den Wiederfindungs- und Hydrolyseraten sinngemäss korrigierten Differenzen der beiden Bestimmungen kann der Anteil an N⁴-metabolisiertem Sulfonamid geschätzt werden, wenn angenommen wird, dass sich andere hydrolysierbare N⁴-Metaboliten ähnlich verhalten wie die Acetyl-derivate. SDM lag demnach zum Zeitpunkt der Analyse im Fleisch überwiegend als Muttersubstanz vor, während sich in der Leber vor allem N⁴-Metaboliten fanden. Dieser Befund gibt einen Hinweis über den Metabolismus von SDM im Kaninchen, wobei allerdings beachtet werden muss, dass eine Umwandlung ins N⁴-Glucopyranosylderivat auch im gefrorenen Zustand eintreten kann, wie für Schweineleber im Fall von SDD beobachtet wurde (9). Für die Rückstandsanalytik von essbarem Kaninchenfleisch

Tabelle 8. Anteile an N⁴-Metaboliten bzw. Gesamtsulfonamidgehalt

Probe	G (ppb) ohne H. ¹	mit H. ²	d (ppb) netto ³	korr. ⁴	T (ppb) ⁵	% N ⁴ -Met. ⁶
<i>SDM/Fleisch:</i>						
1645/88	1770	1770	0	0	1770	0
3045/88	370	430	60	80	450	18
2265/89	2280	2120	0	0	2280	0
2382/89	110	100	0	0	110	0
1587/88	810	720	0	0	810	0
1589/88	190	320	130	170	360	47
1655/88	1630	2070	440	590	2220	27
<i>SDM/Leber:</i>						
1647/88	510	3300	2790	3720	4230	88
3047/88	170	1000	830	1110	1280	87
2267/89	320	1480	1160	1550	1870	83
2384/89	40	100	60	80	120	67
3006/88	190	480	290	390	580	67
<i>SAA/Fleisch:</i>						
2353/88	420	400	0	0	420	0
2709/88	200	400	200	200	400	50
2551/89	320	490	170	170	490	35
<i>SAA/Leber:</i>						
2553/89	250	350	100	100	350	29

¹ Korrigiert mit Wiederfindungsrate, Mittelwerte aus zwei Bestimmungen in beiden chromatographischen Systemen. Entspricht effektivem Gehalt an Muttersubstanz.

² Korrigiert mit Wiederfindungsrate für Muttersubstanzen inklusive Hydrolyse, Mittelwert aus System 1 und System 2.

³ Differenz der Gehalte mit und ohne Hydrolyse (negative Werte = 0 gesetzt).

⁴ Korrigierte Differenz mit Hydrolyserate. Entspricht effektivem Gehalt an N⁴-Metaboliten.

⁵ Effektiver Totalgehalt (Muttersubstanz + Summe der N⁴-Metaboliten).

⁶ Anteil an N⁴-Metaboliten des Totalgehaltes.

be bedeuten die vorliegenden Befunde, dass Fleisch allenfalls ohne Hydrolyse aufgearbeitet werden kann, dass aber bei Leber die N⁴-Metaboliten unbedingt mitbestimmt werden sollten.

Dank

Frau *Bernadette Gampp* und Herrn *Marco Sievi* sei an dieser Stelle für ihre experimentelle Mitarbeit gedankt.

Zusammenfassung

Eine Methode zur Bestimmung von Sulfonamidrückständen in Fleisch, Leber und Niere wird beschrieben. Die Probe wird homogenisiert, mit Aceton extrahiert und zwischen verdünnter Salzsäure und Hexan verteilt. Nach Neutralisation werden die Sulfonamide mit Ethylacetat rückextrahiert und an Kieselgel in Aceton/Dichlormethan chromatographisch gereinigt. Die Bestimmung erfolgt mit Hochdruck-Flüssigchromatographie an Umkehrphase oder Kationenaustauscher und Detektion bei 270 nm. Positive Befunde werden mittels Ultraviolettpektren bestätigt.

Die Wiederfindungsrate beträgt je nach Sulfonamid 50 bis 80%, die praktische Nachweisgrenze 50 bis 100 ppb, die Standardabweichung als Mass für die Wiederholbarkeit um 20 ppb.

Wie Hydrolyseexperimente von Kaninchengewebeproben mit echten Rückständen von Sulfadimethoxin zeigten, liegt dieses im Muskel hauptsächlich als Muttersubstanz, in der Leber jedoch überwiegend als hydrolysierbare N⁴-Metaboliten vor.

Résumé

Une méthode est décrite pour la détermination des résidus de sulfonamides dans la viande, le foie et le rein. L'échantillon est homogénéisé, extrait avec acétone et acidifié en présence d'hexane. Après la neutralisation les sulfonamides sont réextraits avec de l'acétate d'éthyle et purifiés par chromatographie sur gel de silice avec un mélange d'acétone/dichlorométhane. La détermination est effectuée par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse ou sur colonne échangeuse d'ions (détection à 270 nm). Les résultats positifs sont vérifiés par spectrophotométrie UV.

Le taux de récupération se situe entre 50 et 80% et la limite de détection pratique entre 50 et 100 ppb. La répétabilité, exprimée par la déviation standard est d'environ 20 ppb.

Les hydrolyses effectuées avec des tissus de lapin contenant des vrais résidus de sulfadiméthoxine ont démontré, que celui-ci se trouve essentiellement comme substance d'origine dans le muscle. Par contre, dans le foie il se trouve sous forme de métabolites hydrolysables.

Summary

A method is presented for the determination of sulfonamide residues in meat, liver and kidney. The samples are homogenized, extracted with acetone and partitioned between water and hexane. After neutralisation, the sulfonamides are reextracted with ethyl acetate and purified by chromatography on silica gel in acetone/dichloromethane. The determination is effected by high performance liquid chromatography on reversed or cation exchange phase and detection at 270 nm. Positive results are verified by ultraviolet spectra.

The recovery is 50 to 80%, the practical detection limit 50 to 100 ppb, depending on the particular sulfonamide. The repeatability, expressed as the standard deviation is about 20 ppb.

As shown by hydrolysis experiments of rabbit tissue samples with real residues of sulfadimethoxine, the latter exists mainly as the parent compound in muscle, while in liver the hydrolysable N⁴-metabolites are predominant.

Literatur

1. *Aerts, M. M. L., Beek, W. M. J. and Brinkman, U. A. T.*: Monitoring of veterinary drug residues by a combination of continuous flow techniques and column-switching high performance liquid chromatography. 1. Sulphonamides in egg, meat and milk using post-column derivatisation with dimethylaminobenzaldehyde. *J. Chromatogr.* **435**, 97–112 (1988).
2. *Holtmannspötter, G. und Trier, H. P.*: Analysenmethode für Rückstände von sechs Sulfonamiden und Chloramphenicol durch Gaschromatographie an Glaskapillaren. *Deut. Lebensm. Rundsch.* **78**, 347–350 (1982).
3. *Simpson, R. M., Subre, F. B. and Shafer, J. W.*: Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of five sulfonamide residues in animal tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 23–26 (1985).
4. *Nose, N., Hoshino, Y., Kikuchi, Y., Horie, M., Saitoh, K., Kawachi, T. and Nakazawa, H.*: Simultaneous liquid chromatographic determination of residual antibacterials in cultured fish. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 714–717 (1987).
5. *Weiss, G., Duke, P. D. and Gonzales, L.*: HPLC method for the simultaneous analysis of sulfadimethoxine and ormetoprim in tissue and blood of cattle chicken and catfish. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 905–909 (1987).
6. *Schmidt, T. und Büning-Pfaue, H.*: Rückstandsverhalten von Arzneistoffen in der Intensivhaltung von Nutzfischen. *Deut. Lebensm. Rundsch.* **81**, 239–245 (1985).
7. *Haagsma, N., Nooteboom, R. J., Gortemaker, B. G. M. and Mass, M. J.*: A rapid sample preparation method for the determination of sulfamethazine in swine tissues by high-performance liquid chromatography. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **181**, 194–197 (1985).
8. *Haagsma, N. and VanDeWater, C.*: Rapid determination of five sulfonamides in swine tissue by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **333**, 256–261 (1985).
9. *Parks, O. W.*: Evidence for transformation of sulfamethazine to its N⁴-glucopyranosyl derivative in swine liver during frozen storage. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **67**, 566–569 (1984).
10. *Rona, K., Winkler, V., Riesz, T. and Gachalyi, B.*: An assay of sulfasalazine and its acetylated and hydroxylated metabolites in biological fluids by liquid chromatography. *Chromatographia* **26**, 393–398 (1988).
11. *Rona, K., Winkler, V., Riesz, T. and Gachalyi, B.*: Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of sulfasalazine and its main metabolites in biological fluids. *Chromatographia* **24**, 720–724 (1987).
12. *Parks, O. W.*: Liquid-chromatographic-electrochemical detection screening procedure for six nitro-containing drugs in chicken tissues at low ppb level. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 567–569 (1989).
13. *Weber, J. D. and Smedley, M. D.*: Liquid chromatographic determination of sulfamethazine in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 445–446 (1989).
14. *Malisch, R.*: Multimethode zur Bestimmung der Rückstände von Chemotherapeutica, Antiparasitica und Wachstumsförderern in Lebensmitteln tierischer Herkunft. 1. Mitteilung: Allgemeine Vorschrift und Bestimmung von Sulfonamiden. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **182**, 385–399 (1986).
15. *Petz, M.*: Fluorimetrische Bestimmung von Sulfanilamid- und Sulfaguanidintrückständen in tierischen Matrices durch Ionenaustauschhochleistungsflüssigchromatographie. *J. Chromatogr.* **423**, 217–225 (1987).

16. *Vree, T. B., Tijhuis, M. W., Nouws, J. F. M. and Heekster, Y. A.*: Isolation and identification of 4-hydroxysulfamethazine and preliminary studies on its pharmacokinetics in dogs. *Pharm. Weekblad* **6**, 80–87 (1984).
17. *Aerts, M. M. L., Beek, W. M. J., Kan, C. A. and Nouws, J. F. M.*: Detection of sulfaguani-
dine residues in eggs with a fully automated liquid-chromatographic method using
post-column derivatisation. *Arch. Lebensmittelhyg.* **37**, 142–145 (1986).
18. *Paulson, G. D., Giddings, J. M., Lamoureux, C. H., Mansager, E. R. and Struble, C. B.*: The
isolation and identification of ¹⁴C-sulfamethazine (4-amino-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimi-
diny)[¹⁴C] benzenesulfonamide metabolites in the tissue and excreta of swine. *Drug
Metabol. Dispos.* **9**, 142–146 (1981).
19. *Matusik, J. E., Guyer, C. G., Geleta, J. N. and Barnes, C. J.*: Determination of desaminosul-
famethazine, sulfamethazine and N⁴-acetylsulfamethazine by gas chromatography with
electron capture detection and confirmation by gas chromatography-chemical ionisa-
tion mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 546–553 (1987).
20. *Paulson, G. D., Mitchell, A. D. and Zaylskie, R. G.*: Identification and quantification of
sulfamethazine by liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 1000–1006 (1985).
21. *Matusik, J. E., Barnes, C. J. and Newkirk, D. W.*: Evaluation of three methods for recove-
ry of sulfamethazine metabolites from swine tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*
65, 828–834 (1982).
22. *Neidert, E., Baranial, Z. and Sawvé, A.*: Rapid quantitative thin layer chromatographic
screening procedure for sulfathiazole residues in honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*
69, 641–643 (1986).
23. *Wyhowski de Bukanski, B., Degroodt, J. M. and Beernaert, H.*: A two-dimensional high-per-
formance thin-layer chromatographic screening method for sulphonamides in animal
tissue. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **187**, 242–245 (1988).
24. *Parks, O. W.*: Screening test for sulfa drugs and/or dinitrobenzamide coccidiostats and
their monoamino metabolites in chicken livers. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 20–23
(1985).
25. *Wolley, J. L. jr. and Sigel, C. W.*: Metabolism and disposition by the rat of ³⁵S-sulfadiazi-
ne alone and in the presence of trimethoprim. *Drug Metabol. Dispos.* **7**, 94–99 (1979).
26. *Parks, O. W.*: Screening test for sulfamethazine and sulfathiazole in swine liver. *J. Assoc.
Off. Anal. Chem.* **65**, 632–634 (1982).
27. *Sherma, J., Brettschneider, W., Dittamo, M., DiBiase, N., Hub, D. and Schwartz, D. P.*: Spec-
trometric and thin-layer chromatographic quantification of sulfathiazole residues in
honey. *J. Chromatogr.* **463**, 229–233 (1989).
28. *Finlay, E. H. M. and Games, D. E.*: Screening, confirmation and quantification of sulfon-
amide residues in pig kidney by tandem mass spectrometry of crude extracts. *Biomed.
Environ. Mass Spectrom.* **13**, 633–639 (1986).
29. *Schwetlick, K.*: *Organikum*, 13. Aufl., pp. 338, 610. VEB Deutscher Verlag der Wissen-
schaften, Berlin 1974.

Dr. M. Rychener
 Dr. A. E. Mooser
 Dr. H. Koch
 Bundesamt für Veterinärwesen
 Sektion Chemie
 Schwarzenburgstrasse 161
 CH-3097 Liebefeld-Bern