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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 82 (1991)

Heft: 1

Artikel: Tierarzneimittelrückstände in Fleisch - Möglichkeiten ihrer analytischen Erfassung = Veterinary drug residues in meat-possibilities of their analytical determination

Autor: Petz, Michael

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982401

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 09.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **82**, 7–23 (1991)

M. Petz, Bergische Universität GH, Wuppertal

Tierarzneimittelrückstände in Fleisch – Möglichkeiten ihrer analytischen Erfassung

Veterinary Drug Residues in Meat-Possibilities of their Analytical Determination

Einleitung

Tierarzneimittel sind in der landwirtschaftlichen Praxis für die Krankheitstherapie und -prophylaxe unerlässlich. Daneben dienen spezielle Futtermittelzusatzstoffe einer Leistungssteigerung der tierischen Produktion und einer verbesserten Futterauswertung. Einige Zahlen für die Bundesrepublik Deutschland sollen den Umfang der Anwendung verdeutlichen. Für die rund 330 Millionen in der Bundesrepublik gehaltenen Tiere, von denen mehr als 97% landwirtschaftliche Nutztiere sind (Abb. 1), werden jährlich etwa 700 Millionen DM für Veterinärpräparate und Futtermittelzusatzstoffe ausgegeben (Abb. 2) (1).

Während man über die Notwendigkeit des Einsatzes von Leistungsförderern diskutieren kann, wird auch der kritischste Verbraucher kaum Einwände dagegen haben, dass man Tiere im Krankheitsfall behandeln muss. Dafür werden Arzneimittel benötigt, die nach ihrer Anwendung aber prinzipiell zu Rückständen führen

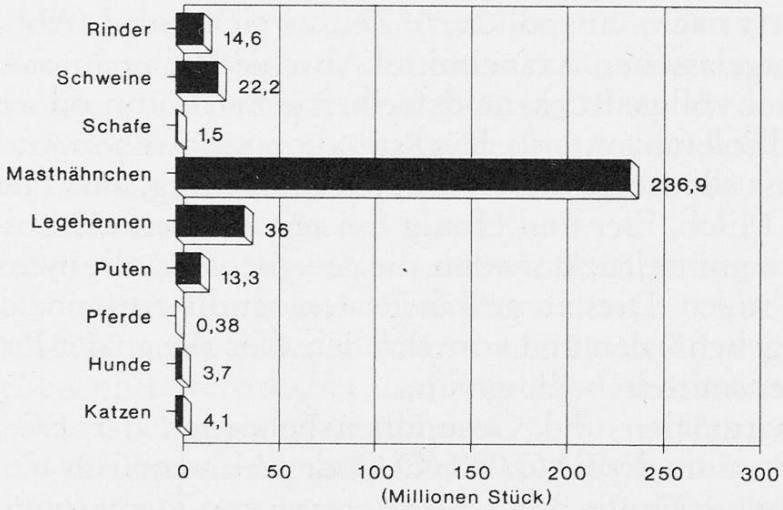

Abb. 1. Tierzahlen für die Bundesrepublik Deutschland (Stand 1989) (1)

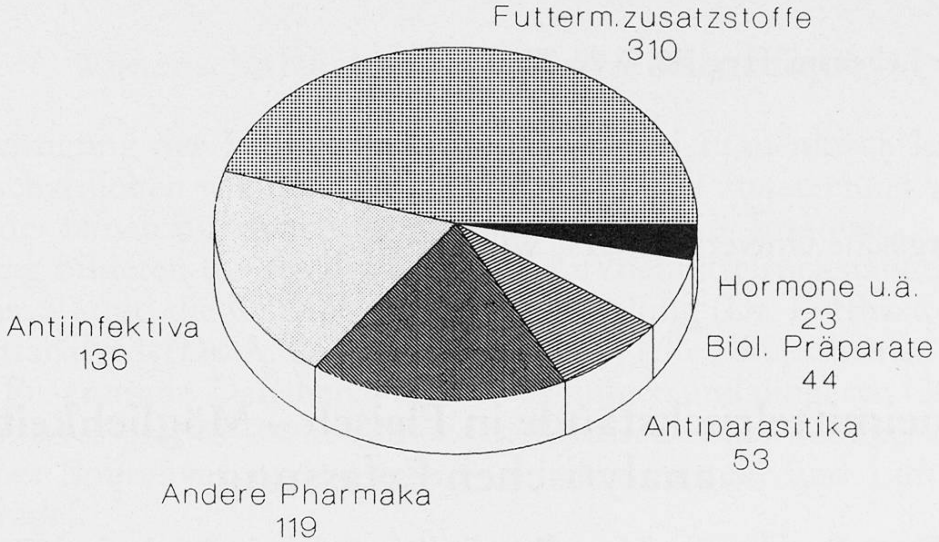

Abb. 2. Westdeutscher Markt für Veterinärpräparate und Futtermittelzusatzstoffe in Millionen DM (Stand 1989) (1)

können. Man kann nun zwar Tierarzneimittel, die aus toxikologischer Sicht besonders kritisch sind, mit einem Anwendungsverbot bei lebensmittelliefernden Tieren belegen. Es müssen aber weiterhin gut wirksame Mittel zur Verfügung stehen, wenn in einem Viehbestand Krankheiten ausbrechen oder ein hoher Infektionsdruck bzw. andere Gesundheitsgefahren für die Tiere bestehen.

Nur bei den mit einem Verbot belegten Arzneimitteln darf man erwarten, dass Lebensmittel tierischer Herkunft davon keine Rückstände enthalten. Bei allen zulässigen Tierarzneimitteln kann man dagegen beim derzeitigen und sich weiterentwickelnden Leistungsstand der Analytik keine vollständige Rückstandsfreiheit verlangen. Denn prinzipiell ist es nur eine Frage der Leistungsfähigkeit der Analytik, ob und wie lange man nach einer Applikation noch Rückstände in den Lebensmitteln finden kann, die von behandelten Tieren stammen. Das typische Ausscheidungsmuster zeigt nach einer ersten raschen Phase der Arzneimittelelimination eine 2. Phase, in der durch den asymptotischen Verlauf der Kurve Rückstandsfreiheit prinzipiell erst nach «unendlicher» Zeit erreicht wird (Abb. 3) (2). Es heisst deshalb für die zugelassenen Arzneimittel Abschied nehmen von dem Wunschgedanken, dass es eine völlige Rückstandsfreiheit geben könne oder dass es einen Sinn macht, sog. «Nulltoleranzen» für Rückstände zugelassener Arzneimittel zu fordern. Berechtigt ist allerdings die Verbraucherforderung, dass Fleisch, verzehrbare Innereien, Fisch, Milch, Eier und Honig frei sein müssen von solchen Konzentrationen an Tierarzneimittelrückständen, die geeignet sind, die menschliche Gesundheit zu beeinträchtigen. Dies zu gewährleisten, ist die Aufgabe des Gesetzgebers, der Überwachungsbehörden und vornehmlich aller, die an der Produktion und am Verkehr mit Lebensmitteln beteiligt sind.

Neben den nationalen und Gesundheitsbehörden der EG befasst sich das internationale Gremium des FAO/WHO Codex Alimentarius Komitees «Residues of Veterinary Drugs in Food» mit der Bewertung von Tierarzneimittelrückständen und der Festlegung von Grenzwerten (MRLVD-Werte – «maximum residue limits

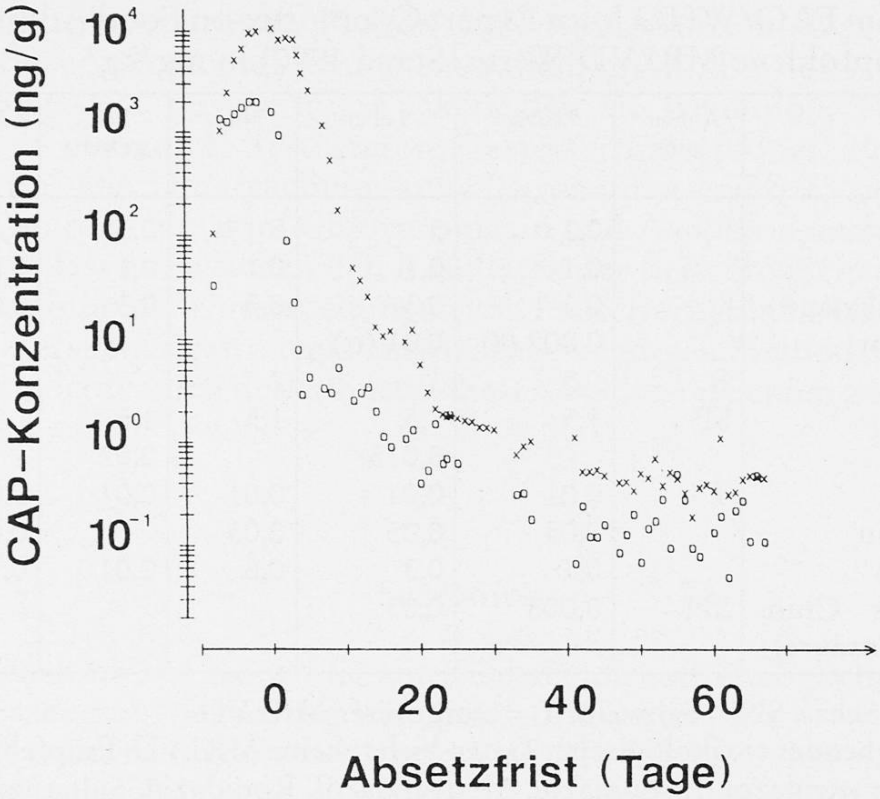

Abb. 3. Rückstandsverlauf von Chloramphenicol in Ei (2)

of veterinary drugs»). Das für dieses Komitee zuständige wissenschaftliche Beratergremium (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives – «JECFA») hat bisher die in Tabelle 1 aufgeführten MRLVD-Werte empfohlen. Weitere Wirkstoffe wurden von JECFA zwar evaluiert, man hat dafür aus verschiedenen Gründen aber keine MRLVD-Werte vorgeschlagen.

Wenn die vorliegenden Werte zugrunde gelegt werden, kann man nach gegenwärtigem Kenntnisstand davon ausgehen, dass die mit dem lebenslangen, täglichen Verzehr von 300 g Fleisch, 100 g Leber, 50 g Niere, 50 g Fettgewebe, 1,5 l Milch und 100 g Ei aufgenommenen Rückstände keinen akuten oder chronischen Einfluss auf die menschliche Gesundheit haben und als sicher und unbedenklich anzusehen sind. Dabei geht man von dem äusserst konservativen und für die Praxis nicht zutreffenden Ansatz aus, dass die genannten Lebensmittel stets die Maximalkonzentration an tolerierbaren Rückständen aufweisen.

Die Zahl der bewerteten Wirkstoffe ist derzeit noch gering in Anbetracht der Tatsache, dass z. B. in der Bundesrepublik Deutschland etwa 300 verschiedene Wirkstoffe in rund 4000 verschiedenen Tierarzneimittelzubereitungen zugelassen sind. Aufgrund lebensmittelrechtlicher und fleischhygienerechtlicher Regelungen sind Rückstandsuntersuchungen vorzunehmen. So sollen z. B. nach dem Fleischhygienerecht der Bundesrepublik Deutschland Rückstände in Fleisch von 71 verschiedenen Wirkstoffen aus 16 verschiedenen Stoffklassen auf das Nichtüberschreiten eines Beurteilungswertes geprüft werden (3).

Tabelle 1. Vom FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) empfohlene MRLVD-Werte (Stand 1990) in mg/kg

	Anmerkung	Muskel	Leber	Niere	Fettgewebe	Milch	Eier
Albendazol		0,1	5	5	0,1	0,1	
Sulfadimidin		0,1	0,1	0,1	0,1	0,025	
(als Gesamtrückstand)		0,3	0,3	0,3	0,3	0,05	
Trenbolonacetat		0,002 (ß)	0,01 (α)				
Closantel	R, T	0,5	1	2			
	SF	1,5	1,5	1,5	1,5		
Ivermectin			0,015		0,02		
Levamisol	T	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
Benzylpenicillin		0,05	0,05	0,05		0,004	
Oxytetracyclin		0,1	0,3	0,6	0,01	0,1	0,2
Carbadox (als Chinoxalin-2-carbonsäure)	SN	0,005	0,03				

R = Rind, SF = Schaf, SN = Schwein, T = temporärer MRLVD
Wegen unzureichender toxikologischer Daten bisher keine MRLVD-Empfehlung für Chloramphenicol, Dimetridazol, Ipronidazol, Metronidazol, Ronidazol, Sulfathiazol, Diminazene, Isometamidium, Olaquindox.
Für Progesteron, Testosteron und Östradiol kein Festsetzungserfordernis, da sie als endogene Verbindungen in weit höherer Konzentration vorkommen als über Rückstände nach ordnungsgemässer Applikation.

Überwachungsresultate

Im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung in Deutschland wurden 1987 nach der Schlachtung von 45 Millionen Stück Vieh (ohne Geflügel) 230 767 Rückstandsuntersuchungen durchgeführt. 11% aller Proben mussten wegen Rückständen als untauglich beurteilt werden, wobei es sich in der weit überwiegenden Zahl der Fälle um Antibiotikarückstände handelte (4). In der Bundesrepublik wurden diese Befunde nicht näher aufgeschlüsselt. Es liegen allerdings Hinweise aus den Einrichtungen der amtlichen Überwachung vor, dass hauptsächlich Tetracycline und Penicilline für positive Hemmstoffbefunde verantwortlich sind. Ergebnisse aus anderen Ländern mit Intensivhaltung von Tieren bekräftigen diese Annahme. In Kanada wurden Proben, die sich im Schlachthof mit raschen Screening-Tests als positiv herausgestellt hatten, mittels Dünnschichtchromatographie/Bioautographie näher untersucht. Dabei ergab sich, dass dort positive Rückstände am häufigsten durch Penicillin G verursacht waren, gefolgt von Tetracyclinen, Streptomycin und Chloramphenicol (5). Die analytischen Kontrollen der baden-württembergischen Chemischen Untersuchungsanstalten bei Fleisch und Fleischerzeugnissen in den Jahren 1984–1987 (Untersuchungen nach dem Lebensmittelrecht) mittels dreier Multimethoden führten zu folgenden Befunden (6): Von 1778 auf Antibiotika und

Chemotherapeutika geprüften Proben waren 66 positiv und enthielten Chloramphenicol oder Sulfonamide (vor allem Sulfadimidin). Bei den Anabolika waren von 675 Proben 121 positiv mit Rückständen an Trenbolon, Trenbolonacetat, Zeranol, 17 ss-Östradiol, Testosteron, Testosteronpropionat, Progesteron und Nortestosteron. Die Untersuchung auf Neuroleptika ergab 13 positive von 599 Proben; hier wurden Xylazin, Chlorpromazin und Azaperon nachgewiesen.

Es fällt auf, dass es zwischen den Resultaten der fleischhygienerechtlichen und lebensmittelrechtlichen Untersuchungen von Fleisch erhebliche Unterschiede gibt, die auf die Untersuchungsstrategie und die angewendeten Methoden zurückzuführen sind. Ich möchte mich deshalb jetzt diesen beiden Aspekten zuwenden.

Screening

Die Probenahme zur Kontrolle auf Rückstände sollte möglichst nahe am Ursprung der Erzeugung liegen, sog. «point-of-origin-sampling».

Prinzipiell kann man von zwei Kategorien von Rückständen sprechen: solche, die von Tierarzneimitteln bzw. pharmakologisch wirksamen Stoffen stammen, die nicht zugelassen sind und illegal angewandt werden, und solche, die zugelassen sind und für die ggf. Wartezeiten und/oder bestimmte Grenzwerte gelten. Danach richtet sich auch die Strategie der Untersuchung. Im ersten Fall genügt zur Überwachung zunächst ein rein qualitatives Verfahren, das sinnvollerweise möglichst bereits beim Tierhalter eingesetzt wird, indem z. B. Urin, Kot oder Blut des noch lebenden Tieres geprüft werden oder auch das im Stall vorgefundene Futter.

Als Beispiel können die beiden β-Sympathomimetika Clenbuterol und Salbutamol dienen, deren umfangreiche illegale Anwendung als Leistungsförderer 1988 bzw. 1989 aufgedeckt wurde. Mit einem Enzymimmunoassay für Clenbuterol lässt sich mit 10%iger Kreuzreaktivität auch Salbutamol erfassen (7). Für beide Substanzen gelingt so der Nachweis in Urin mit einer Empfindlichkeit von etwa 1 µg/kg und damit der Nachweis einer illegalen Verwendung, wenn die Absicherungsuntersuchung durch GC/MS den Befund bestätigt hat. Kommerziell erhältliche enzymimmunologische Kits gibt es derzeit u.a. für Clenbuterol und Chloramphenicol.

Vergleichbar verläuft die Strategie bei der Analyse von hormonell wirksamen Stoffen. Werden natürliche Hormone illegal angewendet, erhöht sich der natürliche physiologische Spiegel im Blut, was sich rasch durch einen Immunoassay ermitteln und dann durch GC/MS absichern lässt. Diese Kombination immunologischer Methoden mit GC/MS zur Bestätigung ist in vielen Fällen die Strategie der Wahl, z. B. auch bei den nicht zulässigen Estern natürlicher Hormone, die sich in einem eleganten Verfahren indirekt nachweisen lassen. Dazu werden Extrakte von Gewebeproben enzymatisch mit Hydrolasen aus Kälberblut behandelt und dabei aus den synthetischen Hormonestern Testosteron, 17β-Östradiol oder Progesteron freigesetzt. Durch unterschiedliche Analysendaten vor und nach der Hydrolyse kann die

Anwesenheit der Ester auf immunologischem Wege erkannt und nachfolgend durch GC/MS bestätigt werden (8).

Bei zugelassenen Wirkstoffen müssen quantitative Verfahren herangezogen werden, die in der Lage sind, im Konzentrationsbereich der Grenzwerte zuverlässige Resultate zu erbringen. Vor der Untersuchung mit quantitativen Verfahren sollte allerdings – damit wirtschaftlich gearbeitet wird – eine Voruntersuchung (Screening) stehen, mit der man positive Proben identifizieren kann. Schnelltests, die ausserhalb eines Labors durchgeführt werden können, erlauben es heute bereits dem Tierhalter, für einige Wirkstoffe den Stand der Elimination und der Gewebskonzentrationen recht zuverlässig zu ermitteln. Dies gilt z. B. für Sulfadimidin, das in der Schweinemast weltweit in grossem Umfang eingesetzt wird. Hier (9) oder auch beim Chloramphenicol (10) gibt es eine recht enge Korrelation zwischen den Gehalten in Urin oder Blut und im Muskelfleisch. Beim Tierhalter durchgeführte Analysen könnten vermeiden helfen, dass das Fleisch von bestimmten Tieren aufgrund der biologischen Variabilität trotz Einhaltens der Wartezeit noch oberhalb festgesetzter Grenzwerte liegt. Eine gezielte Anwendung, um bei Unterschreiten eines bestimmten Blutwertes vor Ablauf der vorgeschriebenen Wartezeit diese dann nicht mehr einzuhalten, wäre natürlich nicht auszuschliessen.

Eine sinnvolle Probenahme berücksichtigt die entsprechenden Zielgewebe: z.B. finden sich Tetracycline nach einer Applikation in höchster Konzentration in Leber und Niere und werden darüber hinaus im Knochengewebe fixiert. Ein aussergewöhnliches Zielgewebe ergibt sich beim β-Sympathomimetikum Clenbuterol, das sich besonders im Auge anreichert (7).

Das Screening auf antimikrobiell wirksame Rückstände kann z. B. durch den traditionellen Hemmstofftest erfolgen. Dieser erfasst ein weites Spektrum antibiotisch wirksamer Stoffe und ist deshalb ausgezeichnet geeignet, um eine JA/NEIN-Aussage hinsichtlich der Anwesenheit von Hemmstoffen zu treffen. In Form des Brillantschwarzreduktionstestes sind über einen Farbvergleich auch halbquantitative Ergebnisse möglich. Allerdings werden mit den mikrobiologischen Tests die einzelnen Antibiotika mit sehr unterschiedlicher Empfindlichkeit erfasst. Die Spanne reicht von etwa 5 µg/kg für Penicillin G bis etwa 7000–10 000 µg/kg für Chloramphenicol. Zudem erhält man kaum Hinweise, aus welcher Stoffklasse ein Hemmstoff stammt. Die mit dem EG-Vierplattentest erreichbaren Nachweisgrenzen für antimikrobielle Wirkstoffe galten inoffiziell als Toleranzgrenzen für Rückstände dieser Stoffe in Muskelfleisch mit Ausnahme von Nitrofuranen, Sulfonamiden und Chloramphenicol. Mit diesem Test werden jedoch häufig falsch-positive Ergebnisse erhalten, wenn das für viele Wirkstoffe geeignete Zielorgan Niere untersucht wird (11). Nähere qualitative Informationen über die Art des Rückstandes geben auch Methoden, bei denen vor der Überprüfung auf Hemmung eines mikrobiellen Wachstums noch eine elektrophoretische, z. B. (12), oder wie bei der sog. Bioautographie noch eine dünnschichtchromatographische Trennung vorangeschaltet ist, z. B. (5).

Beim sog. Charm-Test (13) erhält man für antibiotisch wirksame Stoffe dagegen sowohl eine qualitative wie auch eine quantitative Aussage über die vorhandenen Hemmstoffe. Man benötigt für diesen Rezeptor-Test zwei verschiedene Mikroor-

ganismen, die die Rezeptoren für 7 antibiotische Wirkstoff-Familien zur Verfügung stellen. Zu der zu untersuchenden Probe werden dann diese Mikroorganismen und die entsprechenden radioaktiv markierten Wirkstoffe in bekannter Menge zugegeben. Nun kommt es zu einer Konkurrenzreaktion: Je mehr Rückstände eines Antibiotikums sich in der Probe befinden, desto weniger wird von dem entsprechenden radioaktiv markierten Wirkstoff an die Rezeptoren gebunden und umgekehrt. Dies lässt sich zu einer exakten Quantifizierung durch Szintillationsmessung nutzen. Gegenüber den Hemmstofftests ist die Nachweisempfindlichkeit für die meisten der erfassten Antibiotika deutlich verbessert. Der zunächst für Milch entwickelte Charm-Test wurde inzwischen für andere Substrate erweitert und lässt sich nun auch auf Gewebe, biologische Flüssigkeiten oder Futtermittel anwenden. Für Gewebe werden 5 Antibiotika-Familien erfasst: Penicilline, Chloramphenicol, Makrolide, Aminoglycoside und Sulfonamide. Das System ist automatisierbar und erlaubt bis zu 600 Untersuchungen je Tag (14, 15).

Ein sehr rasches, empfindliches Screening, das völlig ohne instrumentelle Ausrüstung auskommt und deshalb auch ausserhalb rückstandsanalytischer Labors möglich wird, steht mit Schnelltests auf der Basis von Enzymimmunoassays zur Verfügung, die in immer grösserem Umfang auf den Markt gebracht werden. Diese erlauben innerhalb von wenigen Minuten durch einen visuellen Farbvergleich eine Aussage darüber, ob ein bestimmter Wirkstoff oberhalb einer bestimmten Konzentration in einer Testmatrix vorhanden ist. Nachteilig daran ist aber, dass es sich um Einzelstoffanalysen handelt. Milch lässt sich wie Urin ggf. nach Deproteinierung oder Entfettung meist direkt einsetzen. Für Gewebeproben ist zumindest die Herstellung eines Pufferextraktes erforderlich, was aufgrund des Verdünnungseffektes die Nachweisempfindlichkeit verschlechtert. Solche Schnelltests stehen kommerziell bereits von mehreren Firmen z. B. für β-Lactame, Sulfadimidin, Sulfathiazol, Sulfadimethoxin, Chloramphenicol, Tylosin und Gentamicin zur Verfügung.

Auch physikalisch-chemische Methoden eignen sich als Screeningverfahren. Sie sind aber aufwendiger, da eine intensivere Probenaufarbeitung erforderlich wird. Als Beispiel können die Tetracycline dienen: Unter alkalischen Bedingungen fluoresziert nicht nur Chlortetracyclin, sondern auch Tetracyclin und Oxytetracyclin. Dies kann zum empfindlichen Screening von Schweinefleisch und -leber genutzt werden, ohne dass dem Nachweis eine chromatographische Trennung vorausgehen muss (16). Dazu wird die Probe mit Essigester extrahiert, Tetracyclinrückstände an einer Kationenaustauschersäule angereichert und nach Alkalisieren mit Ammoniakgas mit einem Triethylamin-Methanol-Gemisch eluiert. Das Eluat wird dann in einer Küvette bei 4 verschiedenen Wellenlängen fluorimetrisch gemessen, die spezifisch für die drei Tetracycline und iso-Chlortetracyclin sind.

Auch dünnschichtchromatographische Methoden können für ein Screening erfolgreich sein: z. B. Sulfonamide nach Umsetzung mit Fluorescamin (17), Makrolidantibiotika wie Erythromycin oder Tylosin mit Xanthydrol (18); Neuroleptica und Thyreostatica über die UV-Löschung auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator (19, 20).

Ein äusserst leistungsfähiges, apparativ aber sehr aufwendiges Screening-Verfahren ist die Tandem-Massenspektrometrie, bei der ein Rohextrakt, z. B. lediglich

ein Ethanolextrakt aus Fleisch, eingesetzt wird, um beispielsweise im µg/kg-Bereich auf Anwesenheit von 6 Anthelmintica zu prüfen und den einzelnen Wirkstoff zu identifizieren (21). Im Prinzip ersetzt dabei die Fokussierung im ersten Massenspektrometer die chromatographische Trennung, wobei eine sanfte Ionisierungsmethode unter möglichst ausschliesslicher Bildung des Molekülions wünschenswert ist. Dann erfolgt in einem Interface eine Fragmentierung der ausgesonderten Masse (Molekülion), z. B. durch Kollision mit einem Edelgas, und im zweiten Massenspektrometer die Fokussierung der Fragmente, was ein übliches Massenspektrum für die Identifizierung eines Wirkstoffes liefert.

Verfügbarkeit von Methoden und Kriterien

Bevor man nun eine Methode auswählt oder entwickelt, wird man gewisse Kriterien berücksichtigen, zu denen zunächst einmal gehören: Laborausstattung, Erfahrung, beabsichtigtes Untersuchungsspektrum, voraussichtliche Probenzahl, Zeitaufwand, Kosten. Diesen mehr praktischen Kriterien stehen Qualitätsanforderungen gegenüber, wenn quantitativ auf die Einhaltung von Grenzwerten geprüft werden soll. Innerhalb der EG sind die Anforderungen für die Frischfleisch- und Schlachttieruntersuchungen auf Stoffe mit hormonaler Wirkung und Thyreostatica bei Routineuntersuchungen vorgegeben (22). Eine für 1991 vorgesehene Novellierung wird diese Parameter wie bei den Referenzmethoden auf alle Rückstandsnachweisverfahren für organische Stoffe ausdehnen. Die wichtigsten Kriterien sind hier: Spezifität, Genauigkeit, Präzision und Nachweisgrenze (Tabelle 2). Die Charakterisierung einer Methode als Screening-Verfahren, als quantitatives Verfahren oder als Absicherungsverfahren gibt zunächst nur den Verwendungszweck an. Die oben genannten Qualitätskriterien dienen dagegen der objektiven Beurteilung von Rückstandsnachweisverfahren hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit.

Die Spezifität ist dabei die Fähigkeit einer Methode, zwischen dem gesuchten Analyten und anderen Stoffen zu unterscheiden. Dies können Bestandteile aus der

Tabelle 2. Allgemeine Kriterien zur Leistungsfähigkeit analytischer Methoden für Rückstände von Thyreostatica und Stoffe mit hormonaler Wirkung (22)

Zusammenfassung wichtiger Kriterien für Analysenmethoden (87/410/EWG)		
Wirkstoffkonzentration in der Analyse	Genauigkeit als Wiederfindung	Wiederholbarkeit als Variationskoeffizient
< 1 µg/kg	50–120%	30%
1–10 µg/kg	70–110%	20%
> 10 µg/kg	80–110%	15%
Nachweisgrenze: $\bar{x}_{\text{Blindwertsignal (n >20)}}$ + 3 s, Spezifität, Empfindlichkeit u. a.		

Matrix sein, aber auch Stoffwechselprodukte des Analyten oder Homologe und Analoge. Alle immunologischen Tests müssen hinsichtlich ihrer Spezifität als problematisch angesehen werden, denn neben unspezifischen Reaktionen von Matrixbestandteilen mit dem Antikörper können auch sehr hohe Konzentrationen verwandter Wirkstoffe ein falsch-positives Resultat für den eigentlich zu analysierenden Wirkstoff ergeben. Referenzmethoden müssen deshalb den Rückschluss auf die molekulare Struktur des Rückstandes erlauben. Dies ist zwischenzeitlich in einer Entscheidung der EG-Kommission (23) auch niedergelegt. Die Genauigkeit ist die Güte der Übereinstimmung zwischen dem wahren Wert und dem aus Mehrfachuntersuchungen erhaltenen Mittelwert.

Die Wiederholbarkeit ist als Angabe für die Präzision das Streuungsmass der Resultate innerhalb eines Labors. Die Nachweisgrenze errechnet sich aus dem Mittelwert der Blindwertsignale von mindestens 20 Blankproben ($\bar{x} + 3\ s$).

Wenn man physikalisch-chemische Methoden einsetzt, hat man den Vorteil, dass diese durch Einbeziehen von Chromatographie und Spektrometrie so entwickelt werden können, dass man mit ihnen als sog. Multimethoden simultan auf eine grössere Zahl von Wirkstoffen prüfen und diese in einem Arbeitsgang identifizieren und quantifizieren kann. Nur über derartige Multimethoden ist es möglich, über Veränderungen gegenüber dem bekannten chromatographischen Muster rückstandsfreier Proben auch unbekannte Kontaminationen zu erfassen. Bei näherer Betrachtungsweise muss man sogar feststellen, dass unter gewissen Bedingungen GC/MS oder andere physikalisch-chemische Verfahren preislich durchaus gegenüber immunologischen Verfahren konkurrenzfähig sein können (24).

Entscheidend für die Entwicklung einer Multimethode ist, dass die Gruppe von Wirkstoffen, aus denen man einzelne Verbindungen identifizieren will, ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist wie Löslichkeitsverhalten, pK-Werte usw. Dies gilt z. B. für Nitrofurane, wenn bei definiertem pH-Wert extrahiert wird und die allen Nitrofuranen eigene intensive UV-Absorption bei 360 nm zur Detektion nach vorausgegangener HPLC-Trennung genutzt wird. Ein anderes Beispiel: die meisten Neuroleptica sind unzersetzt verdampfbar, besitzen Stickstoff im Molekül und eignen sich deshalb besonders für eine gaschromatographische Analyse mit Detektion durch einen stickstoffspezifischen, thermionischen Detektor.

Ein typischer Ablauf physikalisch-chemischer Methoden beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

- Fleisch homogenisieren
- Rückstände mit organischem Lösungsmittel extrahieren
- Verteilungschromatographie
- Reinigung des Extraktes an Festphasen
- Ggf. weitere Verteilungschromatographie
- Einengschritte / evtl. Derivatisierung
- Chromatographische Trennung und Detektion

Ein geeignetes Detektionsverfahren zu finden ist aber meist das geringere Problem gegenüber der Isolierung und Anreicherung aus der Matrix. Viele Wirk-

stoffe sind in der Matrix auch unter haushaltsüblichen Erhitzungsvorgängen recht stabil, nicht aber, wenn sie in isolierter Form vorliegen. Neben thermischem Abbau sind dann besonders Probleme mit Adsorptionen und pH-Empfindlichkeiten zu beobachten. Hinzu kommen ggf. Abbaureaktionen durch Lichteinfluss. Nichtamphotere Penicilline wie Penicillin G sollten als Carbonsäuren mit pK-Werten um 2,5 am günstigsten bei niedrigen pH-Werten extrahiert werden. Wie die kapillargaschromatographische Analyse (als Methylester) jedoch zeigt (Abb. 4), bleiben bei pH 2,6 weder Penicillin G, Methicillin noch Nafcillin stabil. Erst wenn bei pH 4,2 extrahiert wird, lassen sich diese Verbindungen erfassen, die zudem auch noch stark von den Oberflächen nichtsilylierter Glasgeräte adsorbiert werden können (25). Ein weiteres Problem ist die oft nur mangelhafte Extrahierbarkeit von adsorptiv oder gar kovalent an die Matrix gebundenen Wirkstoffen. Aus solchen Bindungen können sie jedoch häufig durch Behandlung mit einer Proteinase, z. B. Subtilisin, freigesetzt werden, wie dies beispielsweise bei Clenbuterol-Analysen aus Nieren, Leber oder Muskelfleisch gelingt. Da hierbei aber meist auch viele interferierende Matrixkomponenten freigesetzt werden, muss nachfolgend entweder sehr effektiv aufgereinigt werden oder ein sehr selektives Detektionsprinzip verwendet werden. Im Fall des Clenbuterol wird dazu ein HPLC-Verfahren beschrieben, bei dem in einer sequentiellen Nachsäulenderivatisierung Clenbuterol zunächst mit Nitrit diazotiert, dann der Überschuss an Nitrit zerstört und schliesslich mit einem Naphthylamin ein Diazofarbstoff gebildet wird (26).

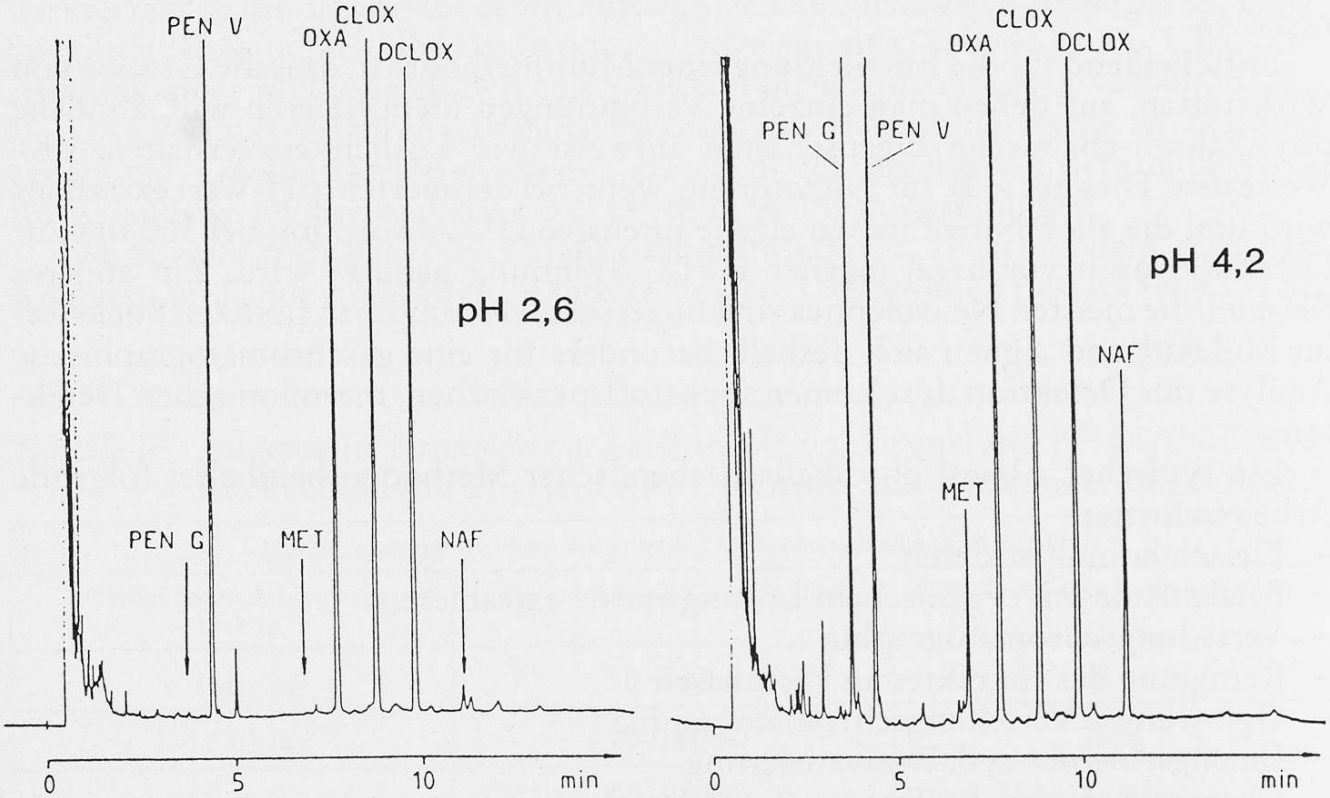

Abb. 4. Säureempfindlichkeit von Penicillinen bei der Aufarbeitung zur kapillargaschromatographischen Rückstandsanalyse (als Methylester) (25)

Neue Ansätze zum Clean-up bei Tierarzneimittelrückständen sind in einem aktuellen Übersichtsbericht behandelt (27). Ein für viele Wirkstoffe und Matrices beschriebenes Verfahren ist die MSPD-Technik («matrix solid phase dispersion»), bei der 0,5 g Probe (Fleisch, Leber, Niere, Milch, Ei) mit 2 g C-18-Kieselgel (40 µm) in einem Achatmörser verrieben werden. Mit diesem Material wird dann eine Extraktionssäule gefüllt. Da die Probe feinzerrieben auf eine grosse Oberfläche verteilt ist, ergeben sich bei geeigneter Elution der Wirkstoffe gute Ausbeuten bei gleichzeitig geringen Matrixinterferenzen (28). Das C-18-Material scheint aber nicht durchgängig vorteilhaft zu sein. Nach einer jüngeren Publikation aus diesem Arbeitskreis wird für die Analyse von Benzimidazolen und deren Metaboliten in Leber Kieselgur für das Aufziehen der Probe verwendet (29).

Als derzeit leistungsfähigstes Clean-up-Verfahren darf die Immunaffinitätschromatographie angesehen werden, bei der Antikörper gegen die gesuchten Wirkstoffe in einer mehrfach verwendbaren Säule an geeigneten Trägermaterialen immobilisiert werden (z. B. 30, 31). Die Anwendung dieser Technik führt zu einer solch effektiven Aufreinigung, dass nicht wie meist üblich interferierende Matrixkomponenten die Nachweisgrenze bestimmen, sondern nur die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanz. Das Chromatogramm eines dotierten Probenextraktes unterscheidet sich praktisch kaum noch von demjenigen einer Standardlösung. Wählt man die Probenmenge bei der Immunaffinitätschromatographie entsprechend hoch, kommt man zu bisher unerreichten Nachweisgrenzen, z. B. bei Einsatz von 1 l Milch bis in den unteren ng/kg-Bereich (30). Hier machen sich dann auch instrumentelle Verbesserungen sofort bemerkbar, da nur noch das gesuchte Signal, nicht aber Wirkstoff plus Interferenzen empfindlicher angezeigt werden. Z. B. hat die aktuelle Generation von Fluoreszenzdetektoren eine um den Faktor von rund 20 verbesserte Nachweisempfindlichkeit gegenüber 8–10 Jahre alten Modellen.

Nach der mir zugänglichen Literatur sind in den letzten 5 Jahren 111 instrumentelle Verfahren zur Erfassung von Tierarzneimittelrückständen in Fleisch und Organen von Rind, Schwein und Geflügel publiziert worden. Methoden für natürliche und synthetische Hormone sind dabei nicht berücksichtigt. Es dominieren mit mehr als 70% die HPLC-Verfahren vor den GC-Verfahren (Abb. 5).

Diese Bevorzugung der HPLC bei der Methodenentwicklung ist aufgrund der nachstehenden Gründe nicht verwunderlich:

1. Es lassen sich Wirkstoffe jeglicher Polarität erfassen, da stationäre und mobile Phasen massgeschneidert anzupassen sind.
2. Es ist ein für thermisch empfindliche Stoffe sehr schonendes Verfahren, da man bei Raumtemperatur arbeiten kann.
3. Es stehen mit UV-, Fluoreszenz- und elektrochemischem Detektor empfindliche Nachweisgeräte zur Verfügung, die sich für eine erhöhte Aussagekraft des Resultates auch in Serie anwenden lassen. Über Photodiodenarraydetektoren und die jüngsten HPLC/MS-Kopplungen können molekularspektroskopische Daten zur Befundabsicherung erhalten werden.
4. Störungen durch Matrixkomponenten lassen sich durch automatisierbare Säulenschaltungen oder auch on-line Cleanup-Systeme umgehen, z. B. (32–34).

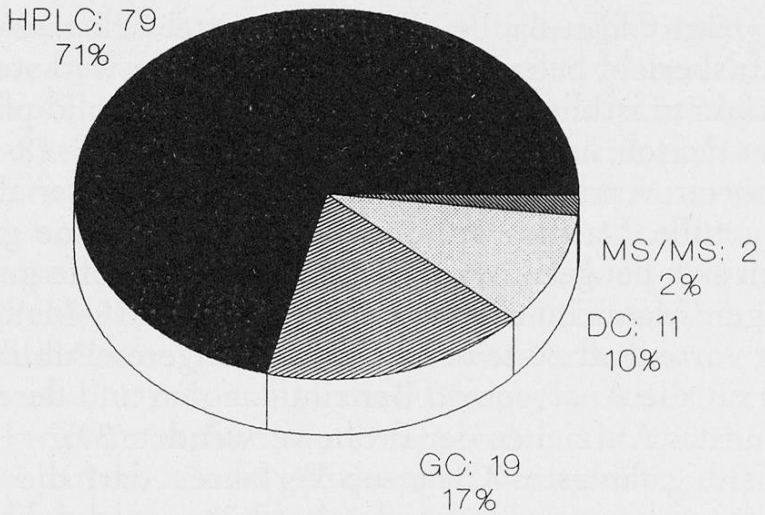

Abb. 5. Publikationen (1986–1989/90) zu physikalisch-chemischen Verfahren für Tierarzneimittelrückstände in Fleisch und Innereien

5. Bei ungenügender Nachweisempfindlichkeit lassen sich on-line Derivatisierungen durchführen.
6. Der Betrieb einer HPLC-Anlage ist unkompliziert, robust gegenüber schlecht gereinigten Extrakten, völlig automatisierbar und rasch auf andere Bedingungen umzustellen.

Ein Übersichtsbericht informiert über verschiedene Ansätze, Antibiotikarückstände mittels HPLC zu analysieren (35).

In-vivo- und In-vitro-Metabolismus

Bei Rückständen in Fleisch hat man es nicht nur mit der Passage oder Ablagerung der eingesetzten Wirkstoffe in den Geweben zu tun, denn die Wirkstoffe werden häufig im Organismus metabolisiert. Als Beispiel sollen die als Wurmmittel eingesetzten Benzimidazole betrachtet werden. Ein wichtiger Vertreter aus dieser Gruppe ist das Fenbendazol, das im Organismus u. a. zum Sulfoxid und Sulfon metabolisiert wird. In den einzelnen Geweben kommt es zu unterschiedlichen Konzentrationen. So dominiert nach der Untersuchung einer Schweizer Arbeitsgruppe in Leber und Niere die Muttersubstanz, während in Muskelfleisch das Sulfoxid überwiegt. Aus der Höhe der Rückstände ergibt sich, dass man hier Leber als Zielorgan mit der Muttersubstanz als «Markermetaboliten» ansehen muss (36). In der Studie einer amerikanischen Gruppe überwiegt dagegen in Leber bei weitem der Sulfoxidmetabolit als Hauptkomponente der Rückstände (33).

Generell ist bei alkoholischen Gruppen mit einer Glucuronidierung zu rechnen. Sollen diese Konjugate bei der Analyse miterfasst werden, ist der Extraktion eine Glucuronidase-Behandlung voranzuschalten. Schwefelhaltige Wirkstoffe werden häufig in Sulfone und Sulfoxide überführt und Amine acetyliert. Genaue Auskünfte über das qualitative und quantitative Ausmass einer Metabolisierung und die daraus

resultierenden Konsequenzen für die Rückstandsanalytik sind nur über die entsprechenden Ausscheidungsversuche medikamentierter Tiere zu erhalten. Bei der Entscheidung, ob die Muttersubstanz oder ein Metabolit als Markerrückstand für die Rückstandsuntersuchung heranzuziehen ist, muss deren Pharmakokinetik beachtet werden. So gilt z. B. für Sulfonamide oder auch für Cephalosporine, dass deren wesentliche Metaboliten schneller als die Muttersubstanz aus dem tierischen Organismus eliminiert werden und die Konzentration eines bestimmten Metaboliten auch nie die der Muttersubstanz übersteigt (37).

Neben Metabolisierungen im lebenden Organismus kann es auch zu In-vitro-Veränderungen kommen und selbst bei Lagerung in gefrorenem Zustand sind z.T. erhebliche Konzentrationsabnahmen festzustellen. Besonders deutlich wird dies bei Nitrofuranen. Bei Rinderleber und einer Lagerung bei 4 °C sind Furazolidon und Nitrofurantoin nach etwa 12 Stunden zu 50%, nach 24 Stunden fast vollständig abgebaut. Der Abbau von Nitrofurazon und Furaltadon verläuft etwas langsamer (38). Über die dabei entstehenden Metaboliten hat man bisher allerdings nur recht ungenaue Vorstellungen. Vor kurzem ist es allerdings gelungen, einen vom Furazolidon abstammenden Metaboliten chromatographisch zu erfassen, der sowohl in der Leber und im Muskelfleisch von behandelten Masthähnchen auftritt als auch in vitro aus dem Abbau von Furazolidon zu beobachten ist. Dieser Metabolit ist relativ stabil. Nimmt man die Peakhöhe als Massstab, so präsentiert der Metabolit aber nur etwa 2% der abgebauten Muttersubstanz (39).

Um einem In-vitro-Metabolismus vorzubeugen, wird der Einsatz von Enzymblockern vorgeschlagen. So liess sich der In-vitro-Abbau von Nitrofurantoin, Nitrofurazon, Furazolidon und Furaltadon in Fleisch und Leber von Schwein, Rind und Huhn dadurch verhindern, indem die Proben in Phosphatpuffer mit 0,2% Natriumazid homogenisiert, zum Lichtschutz mit Aluminiumfolie eingehüllt und bei –20 °C bis zur Analyse aufbewahrt wurden (38). Auch eine wenige Minuten dauernde Mikrowellenerhitzung war erfolgreich, die Rückstände von Nitrofuranen zu stabilisieren. Nach dieser Behandlung und mehrwöchiger Lagerung bei –30 °C war dann kein Abbau mehr festzustellen (40). In-vitro-Veränderungen von Chloramphenicolrückständen in Leber waren durch einen Zusatz von Piperonylbutoxid zurückzudrängen (41).

Über einen anderen Ansatz, Nitrofuranrückstände in Fleisch zu erfassen, die als sog. «gebundene Rückstände» vorliegen, wurde kürzlich berichtet (42). Untersuchungen an Lebermikrosomen belegen, dass Furazolidon zu erheblichen Anteilen proteingebundene Metaboliten ergibt, die sich den üblichen Extraktionsverfahren entziehen. Durch Säurehydrolyse lässt sich allerdings das für Furazolidon charakteristische 3-Amino-2-oxazolidon abspalten und nach Umsetzung mit 2-Nitrobenzaldehyd empfindlich per HPLC und UV-Detektion erfassen.

Abschliessend lässt sich für die Analytik von Tierarzneimittelrückständen festhalten, dass sie ein recht komplexes Gebiet ist und der Kreativität eines Analytikers noch viel Freiraum lässt.

Zusammenfassung

Tierarzneimittel werden weltweit in grossem Umfang zur Krankheitsbekämpfung und Leistungsförderung eingesetzt. Die Festsetzung von Grenzwerten für Rückstände in Lebensmitteln, die vom Tier gewonnen werden, und die zugehörige amtliche Überwachung dient dem Gesundheitsschutz des Verbrauchers. Zur Analytik von Rückständen in Fleisch wird anhand ausgewählter Beispiele auf Untersuchungsbefunde, Strategien der Überwachung, mikrobiologische, immunologische und physikalisch-chemische Untersuchungsmethoden, Qualitätskriterien sowie auf die Bedeutung von Metabolisierungen eingegangen.

Résumé

Les médicaments vétérinaires sont utilisés à grande échelle dans le monde entier pour la prévention de maladies et l'accélération de la croissance. La fixation de valeurs-limites pour les résidus dans la viande et le contrôle officiel sont nécessaires en vue de la protection de la santé du consommateur. Dans le contexte de l'analyse des résidus dans la viande et par quelques exemples, les résultats d'analyse, stratégies de contrôle, méthodes microbiologiques, immunologiques et physico-chimiques, critères de qualité et l'importance du métabolisme des médicaments sont discutés.

Summary

Veterinary drugs are intensively used world-wide to prevent and treat animal diseases and also as growth promoters. Limits for residues in foodstuffs derived from treated animals and a corresponding food inspection scheme are measures to protect the consumer from health hazards. The analysis of residues in meat is discussed with the emphasis on results of inspection and surveillance, analytical strategies, microbiological, immunological and physico-chemical methods, quality criteria and the metabolism of drugs.

Literatur

1. Animal Pharm, Nr. 209, S. 4 (1990).
2. *Somogyi, A.:* Rückstände von Tierarzneimitteln. In: Grossklaus, D. (Hrsg.), Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln. Verlag P. Parey, Berlin 1989.
3. Fleischhygiene-Verordnung i.d.F. der ÄndV vom 11. März 1988. Bundesgesetzblatt I, S. 303.
4. *Borowka, J.:* Bundesrepublik Deutschland – Die Ergebnisse der Schlachttier- und Fleischuntersuchung 1987. Fleischwirtschaft **69**, 560 (1989).
5. *Salisbury, C. D. C., Rigby, C. E.* and *Chan, W.:* Determination of antibiotic residues in Canadian slaughter animals by thin-layer chromatography-bioautography. J. Agric. Food Chem. **37**, 105–108 (1989).
6. *Bergner-Lang, B., Edelhäuser, M., Klein, E., Maixner, S., Malisch, R.* und *Pletscher, D.:* Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln. Fleischwirtschaft **69**, 524–528 (1989).

7. *Meyer, H. H. D.* and *Rinke, L.:* Separation of beta-agonists by HPLC and simultaneous determination by enzyme immunoassay. 2nd Intern. Symp. Analysis of anabolizing and doping agents in biosamples, Gent, May, 15–18, 1990.
8. *Bettin, C.* und *Fürst, P.:* Hormonester im Bereich der Injektionsstelle. Radioimmunologischer Screeningtest und Identifizierung durch kombinierte Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie. Fleischwirtschaft **69**, 1033–1036 (1989).
9. *Randecker, V.W., Reagan, J.A., Engel, R.E., Soderberg, D. L.* and *McNeal, J. E.:* Serum and urine as predictors of sulfamethazine levels in swine muscle, liver and kidney. J. Food Prot. **50**, 115–122 (1987).
10. *Balisz, G.* und *Arnold, D.:* Reference standards for residue analysis of chloramphenicol in meat and milk: a critical study. Chromatographia **27**, 489–493 (1989).
11. *Nouws, J. F. M., Broex, N. J. G., den Hartog, J. M. P.* and *Driessens, F.:* The new Dutch kidney test. Arch. Lebensmittelhyg. **39**, 135–138 (1988).
12. *Koenen-Dierick, K., Zutter, L. de* and *Hoof, J. van:* Screening method for identifying antibiotic residues in slaughter animals. Arch. Lebensmittelhyg. **38**, 128–132 (1987).
13. *Charm, S. E.* and *Chi, R.:* Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 304–316 (1988).
14. *Lawton, J., Charm, S., Faulkner, B.* and *Zomer, E.:* Monitoring antibiotic residues in livestock by a rapid receptor assay. Workshop on screening methods for veterinary drugs and natural contaminants in food animal production, October 18–20, 1989, Washington.
15. Penicillin Assays Inc. Malden Massachusetts 02148, USA: Informationsbroschüren zum Charm II-Test.
16. *Haagsma, N.* and *Mengelers, M. J. B.:* A rapid fluorimetric screening method for chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline in pig meat and kidney tissues. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **188**, 227–231 (1989).
17. *Wyhowski de Bukanski, B., Degroodt, J.-M.* and *Beernaert, H.:* A two-dimensional high-performance thin-layer chromatographic screening method for sulphonamides in animal tissues. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **187**, 242–245 (1988).
18. *Petz, M., Solly, R., Lymburn, M.* and *Clear, M. H.:* Thin-layer chromatographic determination of erythromycin and other macrolide antibiotics in livestock products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**, 691–697 (1987).
19. *Haagsma, N., Bathelt, E.R.* and *Engelsma, J.W.:* Thin-layer chromatographic screening method for the tranquillizers azaperone, propiopromazine and carazolol in pig tissues. J. Chromatogr. **436**, 73–79 (1988).
20. Bundesgesundhbl. **26**, Sonderheft November 1983, S. II–IV: Thyreostatica in Fleisch, Blutserum und Futtermitteln (DC).
21. *Maffei Facino R.* e *Carini, M.:* Un metodo rapido, specifico e sensible di identificazione dei residui di farmaci antielmintici nel latte e carne mediante spettrometria di massa MS/MS. Ann. Ist. Super. Sanità **22**, 19–30 (1986).
22. Entscheidung der Kommission (87/410/EWG) zur Festlegung der Analyseverfahren zum Nachweis von Rückständen von Stoffen mit hormonaler Wirkung und von Stoffen mit thyreostatischer Wirkung vom 14. Juli 1987. Amtsbl. Europ. Gemeinsch. L 223/18–26.
23. Entscheidung der Kommission (89/610/EWG) zur Festlegung der Referenzmethoden und des Verzeichnisses der einzelstaatlichen Referenzlaboratorien für Rückstandsuntersuchungen. Amtsbl. Europ. Gemeinsch. L 351/39–50.
24. *Stephany, R.W.:* Molecular spectroscopy in forensic residue analysis: A general overview of reliability, applicability and cost effectiveness. J. Chromatogr. **489**, 3–9 (1989).

25. *Meetschen, U.:* Gaschromatographische Analysenmethode für Rückstände von sieben Penicillinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Diss. Universität Münster, 1990.
26. *Degroodt, J. M., Wyhowski de Bukanski, B., Beernaert, H.* and *Courtheyn, D.:* Clenbuterol residue analysis by HPLC-HPTLC in urine and animal tissues. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **189**, 128–131 (1989).
27. *Haagsma, N.:* Sample pretreatment in drug residue analysis. In: (43).
28. *Barker S. A., Long, A. R.* and *Short, C. R.:* Isolation of drug residues from tissues by solid-phase dispersion. J. Chromatogr. **475**, 353–361 (1989).
29. *Barker, S. A., McDowell, T., Charkhian, B., Hsieh, L. C.* and *Short, C. R.:* Methodology for the analysis of benzimidazole anthelmintics as drug residues in animal tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73**, 22–25 (1990).
30. *Van de Water, C., Tebbal, D.* and *Haagsma, N.:* Monoclonal antibody-mediated clean-up procedure for the high-performance liquid chromatographic analysis of chloramphenicol in milk and eggs. J. Chromatogr. **478**, 205–215 (1989).
31. *Van Ginkel, L. A., Stephany, R. W., van Rossum, H. J., Steinbuch, H. M., Zomer, G., van de Heeft, E.* and *de Jong, A. P. J. M.:* Multi-immunoaffinity chromatography: A simple and highly selective clean-up method for multi-anabolic residue analysis of meat. J. Chromatogr. **489**, 111–120 (1989).
32. *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. I. Sulphonamides in egg, meat and milk using post-column derivatization with dimethylaminobenzaldehyde. J. Chromatogr. **435**, 97–112 (1988).
33. *Aerts, M. M. L., Beek, W. M. J., Keukens H. J.* and *Brinkman, U. A. T.:* Determination of residues of carbadox and some of its metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography using on-line pre-column enrichment and post-column derivatization with UV-VIS detection. J. Chromatogr. **456**, 105–119 (1988).
34. *Tjaden, U. R., Stegehuis, D. S., Reeuwijk, B. J. E. M., Lingeman, H.* and *van der Greef, J.:* Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in kidney tissue homogenates using valve-switching techniques. Analyst **113**, 171–174 (1988).
35. *Moats, W. A.:* Liquid chromatographic approaches to antibiotic residue analysis. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73**, 343–346 (1990).
36. *Marti, A. M., Mooser, A. E.* and *Koch, H.:* Determination of benzimidazole anthelmintics in meat samples. J. Chromatogr. **498**, 145–157 (1990).
37. *Ludwig, B.:* Use of pharmacokinetics when dealing with the drug residue problem in food-producing animals. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **96**, 243–248 (1989).
38. *Laurensen, J. J.* and *Nouws, J. F. M.:* Simultaneous determination of nitrofuran derivatives in various animal substrates by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **472**, 321–326 (1989).
39. *Parks, O. W.* and *Kubena, L. F.:* Liquid Chromatography-Electrochemical Detection of Furazolidone and Metabolite in Extracts of Incurred Tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73**, 526–528 (1990).
40. *Carignan, G., MacIntosh, A. I.* and *Sved, S.:* An assay for furazolidone residues by liquid chromatography with electrochemical detection applicable to depletion studies in pigs. J. Agric. Food Chem. **38**, 716–720 (1990).
41. *Parker, R. M.* and *Shaw, I. C.:* Determination of chloramphenicol in tissues – problems with in vitro metabolism. Analyst **113**, 1875–1876 (1988).

42. *Hoogenboom, L. A. P., Kammen, M. van, Berghmans, M. C. J.* and *Kuiper, H. A.:* Detection of protein bound metabolites of furazolidone. In: (43).
43. *Haagsma, N., Ruiter, A., Czedik-Eysenberg, P. B.* (eds.): Residues of veterinary drugs in food. Proceedings of the EuroResidue conference Noordwijkerhout, The Netherlands, May 21–23, 1990 (ISBN 90-6159-011-6).

Prof. Dr. Michael Petz
Bergische Universität GH
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie
D-5600 Wuppertal