

Journal of Chromatography, 423 (1987) 217-225

Biomedical Applications

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 3884

FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG VON SULFANILAMID- UND SULFAGUANIDINRÜCKSTÄNDEN IN TIERISCHEN MATRICES DURCH IONENAUSTAUSCH-HOCHLEISTUNGSFLÜSSIG-CHROMATOGRAPHIE

MICHAEL PETZ

Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster, Piusallee 7, D-4400 Münster (B.R.D.)

(Eingegangen am 16. Februar 1987; geänderte Fassung eingegangen am 30. Juli 1987)

SUMMARY

Fluorimetric determination of sulphanilamide and sulphaguanidine residues in animal tissues and products by ion-exchange high-performance liquid chromatography

A high-performance liquid chromatographic method is presented for the selective analysis of sulphanilamide (SA) and sulphaguanidine (SG) residues in animal tissues (muscle, liver), egg and milk at the 0.01-0.1 mg/kg level. A 25-g amount of the samples was extracted with 90 ml acetonitrile at pH 8.5 to which 2 ml saturated sodium carbonate had been added. After centrifugation, co-extracted water was separated by saturating the extract with sodium chloride and adding 50 ml dichloromethane. The residue of the dried and evaporated organic layer was partitioned between methanol, *n*-hexane and mobile phase (1 ml each). A 20- μ l volume of the aqueous layer was injected onto a Nucleosil 5 SA column [mobile phase 0.05 M sodium dihydrogenphosphate (adjusted to pH 2.0 with 85% orthophosphoric acid)–methanol, 85:15, v/v]. SA and SG were detected by their native fluorescence (excitation 275 nm, emission 340 nm) at retention times of 7 and 13 min, respectively, without interference of co-extractives. Parallel detection by ultraviolet absorption (275 nm) allowed on-line confirmation of the results. Recovery of spiked samples (0.1 mg/kg) was 80% (coefficient of variation, C.V. = 5%) for SA and 62% (C.V. = 6%) for SG. Concentrations of 0.27 mg/kg for SA and 0.05 mg/kg for SG were analyzed in muscle meat of a swine which received a single intramuscular injection of 2.1 g SA and 0.6 g SG and was slaughtered 24 h later.

EINLEITUNG

Sulfanilamid (SA) und Sulfaguanidin (SG) sind gebräuchliche Komponenten antibakteriell wirksamer, veterinärmedizinischer Präparate. Die Bestimmung ihrer Rückstände in Lebensmitteln, die von behandelten Tieren gewonnen werden, bereitet im Rahmen gängiger Sulfonamid-Untersuchungsverfahren jedoch beträchtliche Schwierigkeiten. Ursache dafür ist der abweichende chemische Aufbau dieser beiden Chemotherapeutika. Das "typische" Sulfonamid trägt am Amidstickstoff (N^1) einen organischen Rest sowie ein relativ acides Wasserstoffatom, das in den meisten Fällen zu pK_a -Werten von 6–7,5 führt. SA ist an

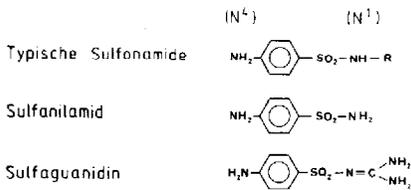


Fig. 1. Strukturformeln ($R \neq H$, sondern z.B. 4,6-Dimethylpyrimidinyl (2) = Sulfamethazin oder thiazolyl (2) = Sulfathiazol).

N^1 nicht substituiert (pK_a 10,5) und SG besitzt dort überhaupt kein Wasserstoffatom mehr (Fig. 1). Entsprechend resultiert für diese Sulfonamide ein stark verändertes Dissoziations- und Löslichkeitsverhalten [1,2].

In der Literatur finden sich für Sulfadimidin (Sulfamethazin) und einige andere Sulfonamide eine Vielzahl quantitativer, rückstandsanalytischer Verfahren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) [3–7], Gaschromatographie (GC), z.T. gekoppelt mit Massenspektrometrie [8–10] oder Dünnschichtchromatographie [11]. Nur wenige Autoren haben sich bisher aber mit SA [6] oder SG [6,7] befasst. Bei den HPLC-Verfahren sind für die chromatographische Trennung derzeit lediglich Umkehr (RP)-Phasen beschrieben. Daran gelingt es aber nicht in ausreichendem Masse SA und SG von der Lösungsmittelfront bzw. der Hauptmenge an Begleitstoffen aus den untersuchten Lebensmitteln abzutrennen. Auch ausgeklügelte Gradientenprogramme [6] bringen dabei nur mässigen Erfolg, insbesondere wenn es sich um schwer zu reinigende Proben, wie z.B. Leber, handelt. Ein möglicher Weg, durch Matrixbestandteile bedingte Interferenzen zu reduzieren, bietet eine Nachsäulenderivatisierung mit Dimethylaminobenzaldehyd. Dieses Prinzip wurde erfolgreich für SG-Rückstände in Hühnereiern angewandt [7]. Zu den Schwierigkeiten bei der Chromatographie kommt hinzu, dass man im Bereich von 0,1 mg/kg meist nur recht schlechte Extraktionsausbeuten von etwa 25–40% erhält, wenn man bei dem für Sulfonamidanalysen üblichen pH-Wert von etwa 5–6 extrahiert.

Bei GC Untersuchungen zeigen die beiden Wirkstoffe ebenso ihre Sonderstellung. SA wird im Gegensatz zu den anderen Sulfonamiden durch Diazomethan nicht methyliert, kann an "fused-silica"-Kapillaren aber als underivatisierte Verbindung tailingfrei erfasst werden [12]. Für SG wurde dagegen bislang überhaupt keine Möglichkeit des GC Nachweises beschrieben.

In der B.R.D. ist im Rahmen fleischbeschaurechtlicher Untersuchungen für Sulfonamide ein Grenzwert ("Beurteilungswert") von 0,1 mg/kg festgesetzt, bei dessen Überschreiten das Schlachtfleisch verworfen werden muss [13]. Um SA und SG in diesem Konzentrationsbereich in Lebensmitteln tierischer Herkunft empfindlich und ungestört bestimmen zu können, wurde eine speziell auf diese beiden Wirkstoffe zugeschnittene Analysenmethodik entwickelt. Dabei blieb das Aufarbeitungsprinzip einer Acetonitrilextraktion mit nachfolgender Aussalzung des Wassers erhalten, das sich bei Analysen auf Rückstände auch andere Tierarzneimittel bewährt hat [6,9,14].

EXPERIMENTELLES

Geräte

Universalzerkleinerer, z.B. Moulinette (Moulinex, Köln, B.R.D.). Laborzentrifuge mit 100–250 ml Zentrifugenbechern. Homogenisierstab, z.B. Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen B.R.D.). Vakuumrotationsverdampfer, Badtemperatur 50°C. Reagensgläser, 8–10 ml, mit Schraubdeckel und PTFE-beschichteter Gummidichtung. Tischzentrifuge, z.B. Piccolo Typ 00701 (Heraeus Christ, Osterode, B.R.D.).

Reagentien

Natriumcarbonatlösung, gesättigt. Acetonitril, destilliert (UV-Durchlässigkeit ≤ 230 nm). Natriumchlorid. Dichlormethan, rein. Natriumsulfat bei 130°C frisch getrocknet. Methanol, reinst. *n*-Hexan, reinst. Mobile Phase: Natriumdi-hydrogenphosphatlösung (0,05 mol/l) mit ortho-Phosphorsäure (85%) eingestellt auf pH 2,0 (für 1 l etwa 7 ml)–Methanol (85:15, v/v).

Standardlösungen

Jeweils 10 mg SG (z.B. Nr. 35640, Serva, Heidelberg, B.R.D.) und Sulfanilamid (z.B. Nr. 35670, Serva) in Methanol zu 10 ml lösen. Für Zusatzversuche je 250 μ l der obigen Stammlösungen auf 10 ml mit Methanol verdünnen (25 μ g/ml). Für eine Konzentration von 0,1 mg/kg dann 100 μ l der verdünnten Standardlösung zu 25 g Untersuchungsmaterial geben.

Hochleistungsflüssigchromatographie

Hochleistungsflüssigchromatograph mit 20 μ l-Probenschleife, z.B. LC 5000 (Varian, Darmstadt, B.R.D.). Vorsäule: 3 \times 0,4 cm trocken gefüllt mit Bio-Beads S-X3, 200–400 mesh (Bio-Rad, München, B.R.D.). Säule: 20 \times 0,4 cm Fertigsäule 5 μ m Nucleosil 5 SA (Macherey und Nagel, Düren, B.R.D.). Mobile Phase: siehe Reagentien. Flussrate: 1 ml/min. Detektoren: Durchflussspektralphotometer, z.B. Typ 87.00 (Knauer, Bad Homburg, B.R.D.), 275 nm; nachgeschaltet Durchflussspektralfluorimeter, z.B. Typ RF-530 (Shimadzu, Düsseldorf, B.R.D.), Anregung: 275 nm, Emission: 340 nm.

Extraktion

Das Untersuchungsmaterial soweit erforderlich von Fettgewebe und Sehnen befreien und in der Moulinette zu einem feinen Brei zerhacken bzw. mit dem Ultra-Turrax homogenisieren. Davon $25,0 \pm 0,2$ g in einen Zentrifugenbecher einwiegen (an dieser Stelle Zusatz, wenn Zusatzversuch durchgeführt wird) und 90 ml Acetonitril sowie 2 ml der gesättigten Natriumcarbonatlösung zugeben. Nach etwa 1 min Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax, 10 min mit etwa 3000 g zentrifugieren und den Überstand in einen Schütteltrichter (250 ml) überführen, in dem 3 g Natriumchlorid (bei Milch 5 g) und 50 ml Dichlormethan vorgelegt sind.

Für 1–2 min schütteln und nach Phasentrennung (etwa 10 min) die untere, wässrige Phase verwerfen. Die organische Phase in einen Erlenmeyerkolben (250 ml), der etwa 5 g Natriumsulfat enthält, umgiessen. Dabei darauf achten, dass restliche Tropfen der wässrigen Phase nicht mitüberführt werden.

Den Kolben kurz schütteln, die Lösung durch einen Trichter mit Wattepfropfen in einen Rundkolben (250 ml) filtrieren und am Rotationsverdampfer bei 50 °C zur Trockene eindampfen (etwa 15 min).

Reinigung

Den Rückstand in dem noch handwarmen Rundkolben mit je 1 ml Methanol und *n*-Hexan sorgfältig aufnehmen, indem das Lösungsmittel bis zum Ablösen des Rückstandes von der Glaswand im Kolben hin- und hergeschwenkt wird. Nach Zugabe von 1 ml mobiler Phase und erneutem Umschwenken wird die Suspension mit einer Pasteurpipette in ein Reagensglas überführt. Man schüttelt 30 s und zentrifugiert 2–3 min mit der Tischzentrifuge. Die wässrig-methanolische Phase wird dann zur HPLC injiziert.

Auswertung und Absicherung

Die quantitative Auswertung von Sulfonamidrückständen über die Peakhöhe im Vergleich mit der Peakhöhe eines äusseren Standards vergleichbarer Konzentration vornehmen. Sowohl für die Standardpeaks wie auch für eventuelle Rückstandpeaks das Höhenverhältnis aus UV- und Fluoreszenzsignal bilden. Unterschiedliche Verhältniszahlen für Standard und Analyse weisen auf den Nachweis eines störenden Begleitstoffes aus dem Lebensmittel bei einer der beiden Detektionsarten hin und erfordern weitere Absicherungen (z.B. durch veränderte HPLC-Bedingungen, durch Dünnschichtchromatographie (DC)/Fluorescamin-Derivatisierung [15] oder auch durch GC an fused silica-Kapillaren [12]).

Anmerkung

Um längere Äquilibrierungszeiten der Austauschersäule zu vermeiden, die Säule auch über Nacht über dem Puffer stehenlassen. Dazu die Pufferflasche ebenfalls am besten am Gerät bei Raumtemperatur belassen und um Mikroorganismenwachstum zu unterbinden, etwa 500 mg Natriumazid je Liter Puffer zugeben.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ionenaustausch-HPLC

Die pK-Werte für die aromatische Aminofunktion von SA und SG betragen 2,36 bzw. 2,75 [1]. Bei pH 2,0 für den HPLC-Puffer liegen die beiden Sulfonamide deshalb bereits überwiegend als Kationen vor. Niedrigere pH-Werte verbieten sich allerdings wegen der dann einsetzenden Hydrolyse des Kationenaustauschmaterials. Die für pH 2,0 üblichen, für Edelstahl allerdings

stark korrosiven salzsäurehaltigen Puffer liessen sich vermeiden, indem eine Lösung von Natriumdihydrogenphosphat (0,05 mol/l) mit Orthophosphorsäure (85%) auf pH 2,0 eingestellt wurde. Der Methanolanteil von 15% im Fliessmittel wurde zugegeben, um ein Tailing der Peaks zu verhindern [16]. Durch einen deutlichen Überschuss an Methanol (80% anstelle 15%) in der mobilen Phase konnte die Analysenzeit für SG verkürzt werden. Löslichkeitsprobleme erforderten es aber, dann die Ionenstärke des Puffers auf 0,01 mol/l herabzusetzen. SG liess sich so aus Lebensmittelextrakten innerhalb von nur 18 min (bis zur Elution des letzten Begleitstoffpeaks) selbst bei UV-Detektion völlig ungestört bestimmen. SA wurde unter diesen Bedingungen allerdings im Bereich der Begleitstoffe aus den Lebensmitteln eluiert.

Mit Nucleosil 5 SA als Kationenaustauschmaterial waren SA und SG als tailingfreie Peaks zu trennen. Um längere Äquilibrierungszeiten zu vermeiden, empfahl es sich, die Säule stets über der mobilen Phase stehen zu lassen. Pilzwachstum liess sich für mindestens vier Wochen zuverlässig durch einen Zusatz von 0,05–0,1 g/100 ml Natriumazid unterdrücken, ohne dass dadurch UV- oder Fluoreszenzdetektion beeinträchtigt wurden.

Zum Schutz der analytischen Säule vor Verschmutzungen hat sich eine trocken mit Bio-Beads S-X 3 (200–400 mesh) gefüllte Vorsäule bewährt. Ein nennenswerter Rückgang der Trennleistung war dadurch nicht zu beobachten.

Aufarbeitung und Detektion

Gegenüber der üblichen Extraktion bei pH 5–6 liessen sich nahezu doppelt so hohe Ausbeuten erzielen, wenn man SA und SG aus alkalischem Milieu extrahierte. Der Zusatz an gesättigter Natriumcarbonatlösung führte in der wässrigen Phase zu pH-Werten von 8,2–8,5. Zusatzversuche mit je 0,1 mg/kg SA und SG zu Muskelfleischproben (Schwein) zeigten im Vergleich zu nicht-dotiertem Kontrollmaterial, dass sich SA durch UV-Detektion bei 275 nm völlig ungestört von Begleitstoffen bestimmen liess. Auch die Analyse von SG wurde durch einen kleinen, einer Konzentration von etwa 0,03 mg/kg entsprechenden Peak aus dem Lebensmittel höchstens geringfügig beeinträchtigt. Nach etwa 30 min waren alle durch UV-Detektion (und auch Fluoreszenzdetektion) angezeigten Begleitstoffe von der Säule eluiert.

Bei der Analyse von Leberproben mit UV-Detektion kam es erwartungsgemäss zu einer Vielzahl von Begleitstoffpeaks im Chromatogramm, die jedoch die Analyse von 0,1 mg/kg SA nicht beeinträchtigten. Ein zur Retentionszeit von SG erscheinender Begleitstoffpeak täuschte jedoch etwa 0,05 mg/kg dieses Sulfonamids vor.

Eine selektive und von Begleitstoffen gänzlich ungestörte Bestimmung wurde durch Verwendung eines Fluoreszenzdetektors möglich, nachdem sich bei der Prüfung der Fluoreszenzeigenschaften von SA und SG gezeigt hatte, dass sie in der mobilen Phase als Lösungsmittel im Gegensatz zu den anderen Sulfonamiden bereits ohne Derivatisierung im UV-Bereich fluoreszierten. Nur Sulfamethoxazol zeigte noch eine vergleichsweise sehr schwache Fluoreszenz. Die Emissionsmaxima lagen einheitlich bei 340 nm, die Anregungsmaxima bei 278 nm für SA und bei 268 nm für SG. Bei gleicher Konzentration ergaben sich für SA dabei

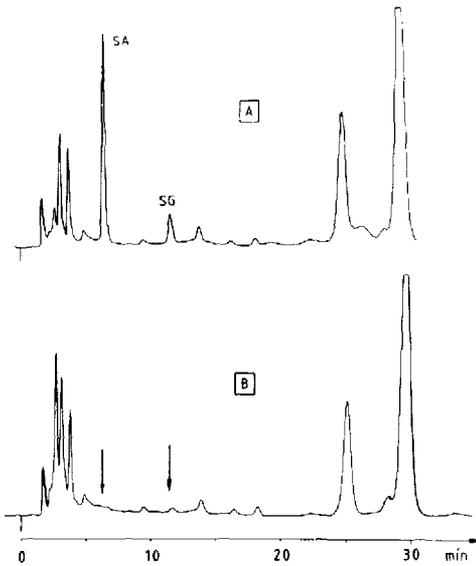


Fig. 2. Analyse von Leber (Schwein) durch Ionenaustausch-HPLC und Fluoreszenzdetektion (Detektorempfindlichkeit: range 16, high). (A) Zusatz von je 0,1 mg/kg SA und SG. (B) Blindwert.

etwa sechsfach höhere Signale als für SG (Fig. 2). Wurden UV- und Fluoreszenzdetektor in Serie geschaltet, war über das Peakhöhenverhältnis der beiden Detektorsignale auch eine sofortige Absicherung positiver Befunde möglich (Fig. 3).

In einer Reihe von Zusatzversuchen mit 0,1 mg/kg SA und SG zu Muskelfleisch, Leber (jeweils vom Schwein), Milch und Ei wurden die Ausbeuten und die Reproduzierbarkeit des Verfahrens ermittelt. Dazu wurden jeweils 2,5 μg SA und SG in 25 g der homogenisierten Lebensmittelprobe verteilt und diese entsprechend der Arbeitsvorschrift untersucht. Die statistische Auswertung der Einzelresultate ergab, dass sich die Wiederfindungsraten in den verschiedenen

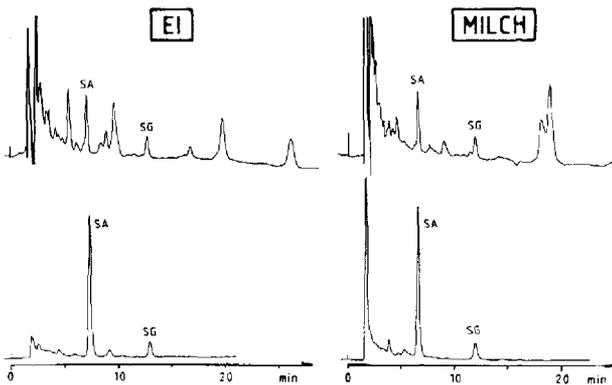


Fig. 3. Analyse von Ei- und Milchproben (Zusatz je 0,1 mg/kg SA und SG) durch Ionenaustausch-HPLC mit UV-Detektion (obere Chromatogramme) und Fluoreszenzdetektion (untere Chromatogramme).

TABELLE I

ERGEBNISSE VON ZUSATZVERSUCHEN MIT JE 0,1 mg/kg SA UND SG ZU MUSKELFLEISCH, LEBER, EI UND MILCH

Sulfonamid	Ausbeute %	Variationskoeffizient (%)	n
SA	80	5	8
SG	62	6	8

Lebensmitteln nicht signifikant unterschieden, so dass summarisch ausgewertet werden konnte (Tabelle I).

Die gute Begleitstoffabtrennung und hohe Selektivität der Fluoreszenzdetektion liess Analysen von SA bis hinunter zu 0,01 mg/kg ohne Schwierigkeiten zu. Dieser Bereich dürfte auch für SG erreichbar sein, denn die Grundlinie bei der Fluoreszenzdetektion der Lebensmittelextrakte ist sehr ruhig, so dass sich das Detektorsignal noch weiter verstärken lässt, ohne vom Rauschen beeinflusst zu werden (vgl. auch Figs. 3 und 4).

Untersuchung authentischen Probenmaterials

Ausser in Zusatzversuchen hat sich das Verfahren auch an authentischem Untersuchungsmaterial bewährt. Vom deutschen Bundesgesundheitsamt (BGA) wurde eine Muskelfleischprobe zur Verfügung gestellt, die von einem 92 kg schweren Schwein stammte, das eine einmalige intramuskuläre Injektion des SA- und SG-haltigen Tierarzneimittels Terpoleucin (Atarost, Twistringem, B.R.D.) in therapeutischer Dosierung erhalten hatte (2,1 g SA und 0,6 g SG) und 24 h danach geschlachtet worden war.

Fig. 4 zeigt das Chromatogramm dieser Muskelfleischanalyse, in der 0,27 mg/kg bzw. 0,05 mg/kg SA und SG ungestört bestimmt werden konnten. Anzumerken ist hierbei, dass sich durch die vorausgegangene, längere Belastung der Kationenaustauschsäule mit Lebensmittelextrakten die Retentionszeiten für SA und

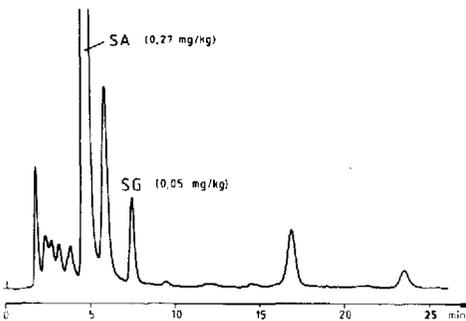


Fig. 4. Analyse der Muskelfleischprobe eines mit SA und SG behandelten Schweines durch Ionenaustausch-HPLC und Fluoreszenzdetektion (Detektorempfindlichkeit: range 8, high; veränderte Retentionszeiten: siehe Text).

TABELLE II

RETENTIONSZEITEN VERSCHIEDENER SULFONAMIDE AN EINER HPLC-KATIONEN-AUSTAUSCH- (NUCLEOSIL 5 SA) UND EINER RP-PHASE (MOS-HYPERSIL)

Sulfonamid	Retentionzeit (min)	
	Nucleosil 5 SA	MOS-Hypersil
Sulfaguanidin	12,4	2,05
Sulfanilamid	7,5	2,25
Sulfathiazol	21,3	2,75
Sulfadiazin	12,8	2,75
Sulfapyridin	20,7	3,0
Sulfamerazin	19,7	3,3
Sulfadimidin	12,6	3,75
Sulfamethoxyimidin	23,0	3,95
Sulfamethoxazol	13,1	5,8
Sulfachinoxalin	46,4	8,5
Sulfadoxin	29,9	9,0
Sulfadimethoxin	29,9	9,0

SG verkürzt hatten. Über das Peakhöhenverhältnis der Signale von Fluoreszenz- und UV-Detektor konnte das Ergebnis abgesichert werden, da für Probe und Standard identische Werte erhalten wurden. Extrahierte man anstelle bei pH 8,5 vergleichsweise bei pH 5–6, dann war nur noch die Hälfte der oben angegebenen Rückstandskonzentrationen zu ermitteln. Bei der heute für Rückstandsanalysen üblichen Untersuchung an Umkehrphasen mit UV-Detektion war SA in dieser Probe zwar auch noch quantitativ zu erfassen, für SG gelang in diesem niedrigen Spurenbereich aber nicht einmal mehr der qualitative Nachweis.

Wenn mit UV-Detektion gearbeitet wird, bietet sich die hier beschriebene Kationenaustausch-HPLC jedoch als Absicherungsverfahren für andere Sulfonamide an, deren Analyse zunächst an RP-Phasen erfolgt ist. Die Mehrzahl der Verbindungen zeigt an den beiden Trennphasen eine erheblich veränderte Elutionsreihenfolge (Tabelle II). Detaillierte Untersuchungen, wieweit Matrixkomponenten aus Lebensmitteln die Auswertung einzelner Sulfonamide beeinträchtigen könnten, stehen aber noch aus. Wie bereits oben beschrieben, ergibt sich allerdings unabhängig davon eine selektive Bestimmung für SA und SG, wenn die Detektion mittels Fluoreszenz erfolgt.

DANK

Frau S. Keck und Herrn S. Stamenitis danke ich für die sorgfältige Durchführung der Analysen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachmittelbeihilfe und dem Bundesgesundheitsamt für Muskelfleischproben arzneimittelbehandelter Schweine.

ZUSAMMENFASSUNG

Rückstände von Sulfanilamid (SA) und Sulfaguanidin (SG) extrahiert man aus Muskelfleisch, Leber, Ei und Milch bei pH 8,5 mit Acetonitril. Mitextra-

hiertes Wasser wird durch Zusatz von Natriumchlorid und Dichlormethan abgeschieden und der Rückstand der getrockneten, organischen Phase zwischen *n*-Hexan, Methanol und mobiler Phase zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) (Phosphatpuffer pH 2-Methanol, 85:15, v/v) verteilt. Nach HPLC-Trennung der wässrigen Phase an einer Kationenaustauschsäule erfolgt die Detektion von SA und SG über ihre native Fluoreszenz (275 nm/ 340 nm) sowie zur Absicherung über ihre UV-Absorption (275 nm). Zusatzversuche mit je 0,1 mg/kg ergaben für alle Substrate eine durchschnittliche Ausbeute von 80% SA (Variationskoeffizient = 5%) und 62% SG (Variationskoeffizient = 6%). Nach einer intramuskulär injizierten Einmaldosis von 2,1 g SA und 0,6 g SG konnten im Muskelfleisch des 24 h später geschlachteten Schweines 0,27 mg/kg SA und 0,05 mg/kg SG nachgewiesen werden.

LITERATUR

- 1 P.H. Bell und R.O. Roblin, Jr., J. Am. Chem. Soc., 64 (1942) 2906.
- 2 M. Windholz (Herausgeber), The Merck Index, Merck, Rahway, NJ, 10. Aufl., 1983.
- 3 A.B. Vilim, L. Larocque und A.I. MacIntosh, J. Liq. Chromatogr., 3 (1980) 1725.
- 4 B.L. Cox und L.F. Krzeminski, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65 (1982) 1311.
- 5 N. Haagsma, R.J. Nootboom, B.G.M. Gortemaker und M.J. Maas, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 181 (1985) 194.
- 6 R. Malisch, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 182 (1986) 385.
- 7 M.M.L. Aerts, W.M.J. Beek, C.A. Kan und J.F.M. Nouws, Arch. Lebensmittelhyg., 37 (1986) 142.
- 8 A.J. Manuel und W.A. Steller, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64 (1981) 794.
- 9 H. Holtmannspötter und H.-P. Thier, Dtsch. Lebensm. Rundsch., 78 (1982) 347.
- 10 R.M. Simpson, F.B. Suhre und J.W. Shafer, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68 (1985) 23.
- 11 M.H. Thomas, R.L. Epstein, R.B. Ashworth und H. Marks, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66 (1983) 884.
- 12 M. Petz, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 180 (1985) 267.
- 13 Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch (Fleischhygiene-Verordnung) vom 30. Oktober 1986, Bundesgesetzblatt I, S. 1678.
- 14 M. Petz, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 176 (1983) 289.
- 15 D. Jonas, G. Knupp und H. Pollmann, Arch. Lebensmittelhyg., 34 (1983) 133.
- 16 V. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Diesterweg/Salle, Frankfurt, 1979, S. 140.