

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 49, No 2 (1998)



Identification, confirmation and quantification of sulfonamides in kidney and meat of food-producing animals by HPLC-PDA

A. E. TIRPENOU, A. D. TSIGOURI (Α. Δ. ΤΣΙΓΟΥΡΗ),
E. H. GOUTA (Ε.Η. ΓΟΥΤΑ)

doi: [10.12681/jhvms.15757](https://doi.org/10.12681/jhvms.15757)

Copyright © 2018, AE TIRPENOU, AD TSIGOURI, EH GOUTA



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

TIRPENOU A. E., TSIGOURI (Α. Δ. ΤΣΙΓΟΥΡΗ) A. D., & GOUTA (Ε.Η. ΓΟΥΤΑ) E. H. (2018). Identification, confirmation and quantification of sulfonamides in kidney and meat of food-producing animals by HPLC-PDA. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 49(2), 115–127. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15757>

Ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός σουλφοναμιδών στο νεφρό και το κρέας των παραγωγικών ζώων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή πολλαπλών φωτοδιόδων (HPLC-PDA)

A. E. Τυρπένου¹, A. Δ. Τσιγουρή¹, E. H. Γούτα¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Ο έλεγχος καταλοίπων φαρμακευτικών χημικών ουσιών στα ζώα και τα τρόφιμα βασίζεται στην εφαρμογή ενός Εθνικού Προγράμματος Ελέγχου, σύμφωνα με την υφιστάμενη Κοινοτική και Εθνική Νομοθεσία (Οδηγία 86/469/ΕΟΚ¹, Π.Δ.497/89², Κανονισμός (ΕΟΚ) 2377/90³, Οδηγία 96/23/ΕΕ⁴). Στις υποχρεώσεις μας ως Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς για την ορθή εκτέλεση αυτού του προγράμματος, εκτός από τους ελέγχους διερεύνησης, περιλαμβάνονται και οι επιβεβαιωτικοί έλεγχοι. Με στόχο την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση επιβεβαιωτικών μεθόδων και για τον τομέα των αντιμικροβιακών παραγόντων τυποποιήσαμε μια αναλυτική μέθοδο για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των σουλφοναμιδών, ουσιών οι οποίες χρησιμοποιούνται εκτενέστατα τόσο στην προληπτική όσο και στη θεραπευτική κτηνιατρική. Η μέθοδος των Diserens και σsn. 1991⁵, με δικές μας τροποποιήσεις, χρησιμοποιείται στο εργαστήριό μας για την επιβεβαίωση των υπόπτων, από τη βιολογική Μέθοδο των Τεσσάρων Τρυβλίων (four Plate Test)⁶, δειγμάτων νεφρού και κρέατος που μας αποστέλλονται από τα Περιφερειακά Εργαστήρια του Υπουργείου Γεωργίας. Η μέθοδος περιλαμβάνει την εκχύλιση και παραλαβή των σουλφοναμιδών με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και την ανίχνευση, ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης και ανιχνευτή πολλαπλών φωτοδιόδων (HPLC/UV, PDA detector). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hypersil ODS, 5 μm (250 x 4.6 mm) με πρόγραμμα βαθμιαίας έκλυσης (gradient) 0.01M οξικού αμμωνίου pH 4.6/Με-

θανόλης. Το μήκος κύματος ήταν 266 nm, η ροή κινητής φάσης 1.1 mL.min⁻¹ και ο όγκος έγχυσης 20 μL. 12 σουλφοναμίδες μπορούν να προσδιορισθούν με μια ανάλυση σε συγκεντρώσεις έως και 20 μg/kg, η δε ανάκτηση της μεθόδου κυμάνθηκε από 60 έως 88% για δείγματα επιβαρημένα στο Ανώτατο Επιτρεπτό Όριο (MRL) των 100 μg/kg.

ABSTRACT. Tirpenou A. E, Tsigouri A. D, Gouta E. H. Identification, confirmation and quantification of sulfonamides in kidney and meat of food-producing animals by HPLC-PDA. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society* 1998, 49(2): 115-127. Residue monitoring in animal husbandry and in food of animal origin is based on the implementation of a Surveillance Scheme, according to the legislation (Directive 86/469/EEC¹, N. D. 497/89², Regulation (EEC) 2377/90³, Directive 96/23/EU⁴). Among our obligations as a European Union National Reference Laboratory (EU-NRL), we have to develop screening and confirmatory methods. Towards the development and validation of these confirmatory techniques, als for the group of antimicrobials, a method has been developed for sulfa drug determination. These substances are used extensively in livestock for therapeutic as well as for growth promotin purposes. Diserens et al., 1991⁵, method with our modifications, is used in our laboratory to confirm the Four Plate Test⁶ suspect kidney and meat samples sent from the Regional Field Laboratories (RFLs) of the Ministry of Agriculture. The method's steps are: extraction, concentration and quantitative elution of sulfa drugs using Solid Phase Extraction (SPE) and their identification, confirmation and quantitation by HPLC/UV with a Photo Diode Array detector. The column used was Hypersil ODS, 5 μm (250 x 4.6 mm) and the mobile phase was 0.01M ammonium acetate buffer pH 4.6/MeOH at a gradient mode. The wavelength was monitored at 266 nm, the flow rate of the mobile phase was 1.1 mL.min⁻¹ and the injection volume was 20 μL. 12 sulfonamides can be simultaneously detected in one run at concentrations as low as 20 μg/kg. The recovery ranges from 60 to 88% for spiked samples at the Maximum Residue Limit of 100 μg/kg.

Λέξεις ευρετηρίασης: σουλφοναμίδες, κατάλοιπα, κρέας, χοίρος, HPLC.

¹ Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς (Τμήμα Ελέγχου Καταλοίπων) Ινστιτούτο Υγιεινής Τροφίμων, Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών

² Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας-ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε

³ European Union National Reference Laboratory (Residue Analysis Laboratory)

⁴ Institute of Food Hygiene, Centre of Athens Veterinary Institutions
⁵ National Agricultural Research Foundation - N.Ag. Re. F

Ημερομηνία υποβολής: 27.10..97

Ημερομηνία εγκρίσεως: 16.02.98

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο έλεγχος των καταλοίπων στα ζώα και τα τρόφιμα βασίζεται στην εφαρμογή ενός Εθνικού Προγράμματος Ελέγχου, σύμφωνα με την υφισταμένη Κοινοτική και Εθνική Νομοθεσία (Οδηγία 86/469/ΕΟΚ, Π.Δ. 497/89, κανονισμός (ΕΟΚ) 2377/90, Οδηγία 96/23/ΕΕ κ.λπ.). Στις υποχρεώσεις μας ως Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς για την ορθή εκτέλεση αυτού του προγράμματος, εκτός από τους ελέγχους διερεύνησης, προβλέπονται και οι επιβεβαιωτικοί έλεγχοι. Στα πλαίσια της εφαρμογής του Εθνικού Προγράμματος Ελέγχου Καταλοίπων, σύμφωνα με τη νομοθεσία, όλα τα δείγματα νεφρών και κρέατος, τα οποία αποδεικνύονται ύποπτα για την παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών, αποστέλλονται για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος από τα Περιφερειακά Εργαστήρια του Υπουργείου Γεωργίας στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Αθηνών.

Περίπου 150 σουλφοναμίδες έχουν παραχθεί με στόχο τη βελτίωση της αντιμικροβιακής τους δράσης, της διαλυτότητάς τους στα ούρα και της επιμύκνωσης του χρόνου δράσης τους⁷ και από αυτές η σουλφαδιμιδίνη (σουλφαιμεθαζίνη) είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη στη μαζική θεραπεία των χοίρων για τον έλεγχο της ατροφικής ρινιτίδας (pig flu) και άλλων λοιμώξεων⁸. Συνιστούν μια ομάδα φαρμακευτικών ουσιών, η οποία από το 1940 μέχρι και σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά των μικροβιακών και πρωτοζωϊκών μολύνσεων του ανθρώπου και των ζώων, λόγω του ευρύτατου φάσματος δράσης και των οικονομικών τους πλεονεκτημάτων⁹. Δρουν ανταγωνιστικά προς το παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ, επειδή η χημική τους δομή είναι ανάλογη προς αυτό, αποτελώντας έτσι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ανταγωνιστικής παρεμπόδισης κατά τη σύνθεση του DNA των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την ευκολότερη καταστροφή τους από τις αμυντικές δυνάμεις του οργανισμού^{7,10,11}. Η ενσωμάτωση των σουλφοναμιδών στις ζωοτροφές για την πρόληψη διαφόρων ασθενειών, αλλά και για τη βελτίωση και την αύξηση των αποδόσεων των παραγωγικών ζώων, ταυτόχρονα με την έντονη χρήση τους στην κτηνιατρική θεραπευτική, ύστερα από τη διαπίστωση της μεγαλύτερης αποτελεσματικότητάς τους όταν χορηγούνται σε συνδυασμό με τριμεθοπρίμη, αποτέλεσε την κύρια αιτία της κατάχρησής τους. Επακόλουθο αυτού ήταν η εμφάνιση αυξημένων συγκεντρώσεων των καταλοίπων τους στους ιστούς των παραγωγικών ζώων και στα ζωικά τρόφιμα^{12,13}, αλλά και η σημαντική αύξηση τροφολοιμώξεων από *Salmonella DT104* κατά 10 φορές τα τελευταία 10 χρόνια, γεγονός που έχει συσχετισθεί με την αύξηση της αντίστασης των μικροοργανισμών από την παρουσία των σουλφοναμιδών^{14,15,16}. Επειδή οι μικροβιολογικές μέθοδοι δεν είναι αρκετά ευαίσθητες για να ανιχνεύσουν τις σουλφοναμίδες σε χαμηλά επίπεδα αλλά και δεν έχουν την ικανότητα του προσδιορισμού της ταυτότητάς τους, διάφορες μέθοδοι ενόργανης χημικής ανάλυσης^{17,18,19,20,21} έχουν αναπτυχθεί με ιδιαίτερες δυνατότητες, όπως είναι η υγρή

χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή πολλών φωτοδίοδων (HPLC-PDA detector).

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στη χώρα μας ο διερευνητικός έλεγχος (screening) γίνεται με μικροβιολογικές τεχνικές σε ιστούς. Σε άλλες χώρες όμως, εκτός από τον έλεγχο αυτό, γίνεται και ο ονομαζόμενος μεταδιερευνητικός έλεγχος (post-screening) πριν από τον επιβεβαιωτικό (confirmatory) και αυτό γιατί με το four Plate Test, το οποίο έχει σχεδιασθεί μόνο για το κρέας, το ποσοστό των ψευδώς θετικών δειγμάτων (false positive samples) σε νεφρά χοίρων είναι υψηλό²². Έτσι στην Αμερική και τον Καναδά ο έλεγχος για σουλφοναμίδες γίνεται στα ούρα των σφαζόμενων ζώων με το SOS τεστ²³, στην Ολλανδία εφαρμόζεται το NDKT τεστ²⁴ σε ένα τρυβλίο με τον *Bacillus subtilis*-BGA και με εξέταση του υγρού της νεφρικής πνέλου, στο Βέλγιο επίσης σε ένα τρυβλίο²⁵, στη Δανία σε δώδεκα τρυβλία²⁶, στην Ισπανία σε 7 τρυβλία με 38 αντιβιοτικά και σουλφοναμίδες σύμφωνα με το FSIS-USDA²⁷, στην Αγγλία με την εφαρμογή ενός ειδικού τεστ ELISA του FARAS²⁸, στη Σουηδία με 7 τρυβλία²⁹ και στη Φινλανδία με 19 τρυβλία³⁰.

Στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Αθηνών εξετάστηκαν με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης 112 ύποπτα δείγματα από τα 1360 δείγματα κρέατος και νεφρού χοίρου, τα οποία βρέθηκαν ύποπτα για σουλφοναμίδες με το μικροβιολογικό τεστ (*Bacillus subtilis* pH 7.2) κατά το διερευνητικό έλεγχο στα Περιφερειακά Κτηνιατρικά Εργαστήρια της Κοζάνης, των Ιωαννίνων, της Πάτρας, των Σερρών και της Χαλκίδας. Επίσης αναλύθηκαν και 35 δείγματα κρέατος χοίρου ελληνικής και ξένης παραγωγής από διάφορα σούπερ μάρκετ της Αττικής. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν των Diserens και συν., 1991 με δικές μας τροποποιήσεις.

Αντιδραστήρια

1. άνυδροθειϊκό νάτριο p.a. Merck
2. πυκνό οξικό οξύ HiPerSolv BDH
3. διχλωρομεθάνιο HPLC Lab-Scan
4. πετρελαϊκός αθέρας 40°-60° HPLC Lab-Scan
5. μονόξινο φωσφορικό κάλιο p.a. Merck
6. κανστικό νάτριο 1N, 0.1N p.a. Merck
7. οξικός αιθυλεστέρας HPLC LabScan
8. οξικό αμμώνιο p.a. Merck
9. μεθανόλη HPLC LabScan
10. μίγμα για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων:

Παρασκευάζουμε μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου 0.01M pH 4.6 και μεθανόλης σε αναλογία 35:15.

Όλα τα διαλύματα πριν από τη χρησιμοποίησή τους στη χρωματογραφική ανάλυση διηθούνται από φίλτρο 0.45μm.

11. πρότυπες ουσίες σουλφοναμιδών:

11.1 Σουλφαδιαζίνη- $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ Sigma S-8626	μ.β.	250.3
11.2 Σουλφαναμιδίδη- $C_6H_8N_2O_2S$ Serva 35670	μ.β.	172.2
11.3 Σουλφαγουανιδίνη- $C_7H_{10}N_4O_2S$ Sigma S-8751	μ.β.	214.2
11.4 Σουλφαθειαζόλη- $C_9H_9N_3O_2S_2$ Sigma S-9876	μ.β.	255.3
11.5 Σουλφαπυριδίνη- $C_{11}H_{11}N_3O_2S$ Sigma S-6252	μ.β.	249.3
11.6 Σουλφαμεραζίνη- $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ Sigma S-8876	μ.β.	264.3
11.7 Σουλφαδιμιδίνη- $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ Sigma S-6256	μ.β.	278.3
11.8 Σουλφαχλωροπυριδαζίνη- $C_{10}H_9ClN_4O_2S$ 284.7 Sigma S-9882	μ.β.	
11.9 Σουλφαμεθοξαζόλη- $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ Sigma S-7507	μ.β.	253.3
11.10 Σουλφαδιμεθοξίνη- $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ Sigma S-7007	μ.β.	310.3
11.11 Σουλφακινολοξίνη-άλας $Na-C_{14}H_{11}N_4O_2S$. Na, μ.β. 322.3 Sigma S-7832		
11.12 Σουλφαδοξίνη- $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ CRL Fougères, Γαλλία	μ.β.	310.34

12. πρότυπα διαλύματα

12.1 *πυκνά πρότυπα διαλύματα*: παρασκευάζουμε διαλύματα κάθε μιας σουλφοναμιδής ξεχωριστά σε μεθανόλη και σε συγκέντρωση 1000 μg/mL και τα οποία συντηρούνται στο σκοτάδι στους +4 °C για χρονικό διάστημα 1 μηνός.

12.2 *πρότυπα διαλύματα εργασίας*: παρασκευάζουμε διαλύματα εργασίας μίγματος όλων των σουλφοναμιδών σε συγκεντρώσεις 0,625, 1,25, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 μg/mL διαλύματος 10 κάθε φορά πριν από τη χρησιμοποίησή τους.

Υλικά γυάλινα-πλαστικά

- υποδοχές από πολυπροπυλένιο 200 mL με βιδωτό πώμα
- φυσίγγια γέλης πυριτίου (Silica gel-SiOH), Sep-Pak® 500 mg Waters, ΗΠΑ
- φίλτρα 0.45 μm τύπου SJHVOO4NS, Millipore, ΗΠΑ
- φίλτρα απαέρωσης τύπου HV 0.45 μm, Millipore, ΗΠΑ
- γυάλινες φιάλες erlenmayer 250 mL
- γυάλινα φυγοκεντρικά φιαλίδια των 50 mL με βιδωτό πώμα και κωνικό πυθμένα.
- γυάλινα χωνιά διαμέτρου 7 cm
- φιαλίδια αυτομάτου δειγματολήπτη 1.5 mL, Chromacol Ltd, ΗΠΑ

9. ογκομετρικοί κύλινδροι 100 mL

10. πλαστικές σύριγγες μιας χρήσεως των 5 mL.

11. μικροσύριγγα ακριβείας των 200 μL.

Συσκευές

1. συσκευή ζιμά με διάμετρο πόρων του ηθμού 2 mm, Rotel, Ελβετία

2. ομοιογενοποιητής Ultra turrax T25, Janek & Kunkel IKA Labortechnik, Γερμανία

3. ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος τύπου K-80, Hellenic Labware, Ελλάδα

4. λουτρό υπερήχων Branson ultrasonic bath τύπου 5200, Βέλγιο

5. συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE Sep-Pak® Cartridge Rack) μετά των ειδικών βαλβίδων ρύθμισης της ροής και των ανάλογων υποδοχών εκχυλίσματος Waters, ΗΠΑ

6. πλήρες σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Waters, ΗΠΑ, αποτελούμενο από:

6.1 περιέκτες κινητής φάσης Α και Β μετά αυτομάτου περιοδικής παροχής αερίου ηλίου.

6.2. αντλία χαμηλής πίεσης, μοντέλο 600 E System Controller, Waters ΗΠΑ, με σύστημα έγχυσης Rheodyne 7126 και βρόγχο εισαγωγής του δείγματος (loop) 20 μL, 100 μL

6.3. χρωματογραφική αναλυτική στήλη αντιστρόφου φάσης (RP C18) Hypersil ODS, 5 μm (250 x 4.6 mm) μετά της προστήλης Jones Chromatography, ΗΠΑ.

6.4. φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής ορατού/υπεριώδους πολλαπλών φωτοδίοδων (UV/VIS PDA detector) με μικροκυψελίδα (analytical stainless steel flow cell) καθορισμένου όγκου 8μL (10 mm) και εύρος μήκους κύματος 190-800 nm, μοντέλο 991, Waters ΗΠΑ.

6.5. υπολογιστής Power Mate SX Plus, NEC, με πρόγραμμα PDA, Waters ΗΠΑ

6.6. printer/plotter 5200, Waters ΗΠΑ

7. σύστημα για την ανάμιξη και απαέρωση των διαλυτών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στην HPLC, αποτελούμενο από ένα δοχείο συλλογής, ένα πορώδη ηθμό και δοχείο υποδοχής του μίγματος. Ανάμεσα στον πορώδη ηθμό και το δοχείο υποδοχής του δείγματος τοποθετείται ειδικό φίλτρο του οποίου η σύσταση και η διάμετρος των πόρων μεταβάλλονται ανάλογα με τη σύσταση του μίγματος των διαλυτών που πρόκειται να διηθηθεί. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα 0.45 μm, τα οποία είναι κατάλληλα για όλους τους οργανικούς διαλύτες και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν (Millipore ΗΠΑ).

8. σύστημα το οποίο παράγει νερό υψηλής καθαρότη-

τας (αγωγιμότητα 18 ΜΩ) κατάλληλο για την Παρασκευή του υδατικού συστατικού της κινητής φάσης, *Milli Q, Millipore* ΗΠΑ.

9. αναλογικό πεχάμετρο τύπου *Microcomputer pH meter P207, Consort*, Βέλγιο.

10. σειρά από ρυθμιζόμενα σιφόνια *Pipetman® P200, P1000, P5000, Gilson- Γαλλία*

11. αντλία κενού *Millipore* ΗΠΑ.

ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Προετοιμασία του δείγματος και εκχύλιση

Η ομοιογενοποίηση του αρχικού δείγματος (200 g) γίνεται σε κατάσταση ημικατάψυξης και στη συνέχεια λαμβάνεται δείγμα 10 g ομοιογενοποιημένου ιστού, στο οποίο προσθέτουμε 5 g άνυδρου θειϊκού νατρίου και 50 mL διχλωρομεθανίου και εκχυλίζουμε πρώτα με τη βοήθεια ομοιογενοποιητού *ultra turrax* για 2 min και στη συνέχεια σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm, 10 min⁻¹ και σε θερμοκρασία 10 °C. Η φάση του διχλωρομεθανίου μεταφέρεται δια μέσου διηθητικού χάρτου σε φιάλη *erlenmayer* 250 mL. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με άλλα 50 mL διχλωρομεθανίου και στα συγκεντρωμένα εκχυλίσματα διχλωρομεθανίου προστίθενται 80 mL πετρελαϊκού αιθέρα 40°-60°.

2. Καθαρισμός του δείγματος

Σε συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) ενεργοποιούνται τα φυσίγγια της γέλης πυριτίου (SPE Silica gel 500 mg) με 10 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Ρυθμίζεται η ροή σε 5 mL.min⁻¹ και το όλο εκχύλισμα από το προηγούμενο στάδιο (1) διέρχεται δια του φυσιγγίου SPE, το οποίο στη συνέχεια στεγνώνεται με τη βοήθεια κενού και δίοδο του αέρα για 5 min.

3. Έκλυση των σουλφοναμιδών

Η έκλυση και παραλαβή των σουλφοναμιδών από το φυσίγγιο SPE γίνεται με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος μονόξινου φωσφορικού καλίου pH10. Στο παραλαμβανόμενο έκλυσμα ρυθμίζεται το pH στο 7.0±0.1 με διάλυμα NaOH 0.1N και ακολουθεί η τελική εκχύλιση για την παραλαβή των σουλφοναμιδών με 20 mL οξικού αιθυλεστέρα HPLC. (Συνήθως δεν απαιτείται φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό των φάσεων).

4. Συμπύκνωση του εκχυλίσματος

Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα στεγνώνεται μέχρι ξηρού και το ξηρό υπόλειμμα αναγεννάται σε 1.0 mL του μίγματος παρασκευής των προτύπων διαλυμάτων (35:15) με ταυτόχρονη ανάδευση σε vortex και υπέρηχους για 2 min. Διηθείται από φίλτρο 0.45 μm και σφραγίζεται σε φιαλίδιο 1.5 mL μέχρι την έγχυση στον υγρό χρωματογράφο. Όγκος 20 μL του εκχυλίσματος αυτού, που αντιστοιχεί σε 0.2 g ιστού, εγχέεται στον υγρό χρωματογράφο.

5. Υγρή Χρωματογραφική Ανάλυση

Οι συνθήκες της αναλυτικής διαδικασίας κατά τη χρωματογραφική ανάλυση έχουν ως εξής:

• κινητή φάση: (A): 0,01M οξικό αμμώνιο pH 4.6 (B): μεθανόλη HPLC

Βαθμιαία έκλυση (gradient)	Χρόνος (min)	%A	%B
	έναρξη	85	15
(A) 0.01M οξικό αμμώνιο	8.00	79	21
pH 4.6	12.00	67	33
	16.00	58	42
(B) Μεθανόλη HPLC	20.00	54	46
	25.00	-	100
	30.00	85	15

- ροή κινητής φάσης: 1.1 mL.min⁻¹
- πίεση στην αρχή της στήλης 2700 psi
- θερμοκρασία 21 °C
- παροχή αερίου (ηλίου) απαέρωσης κινητής φάσης 20 mL.min⁻¹
- μήκος κύματος εργασίας 266 nm και εύρος 235-360 nm
- ενίσχυση σήματος -0.002 έως +0.01 AU(0.012 AU/FS) στα δείγματα και -0.007 έως +0.021(0.028 AU/FS) στα πρότυπα, με διαχωριστική ικανότητα 1.3 nm και ευαισθησία υψηλή 7.

• ταχύτητες καταγραφικού χαρτιού 3 και 5 mm.min⁻¹

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των σουλφοναμιδών στα δείγματα που εξετάστηκαν έγινε με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς που αντιστοιχούσε στη σουλφοναμίδα που ανιχνεύθηκε και το τελικό αποτέλεσμα υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\alpha \times 5 \times R\% = \mu\text{g/kg}$$

α = η υπολογισθείσα ποσότητα σε ng που αντιστοιχεί στην επιφάνεια της κορυφής της ουσίας

5 = ο συντελεστής αραίωσης

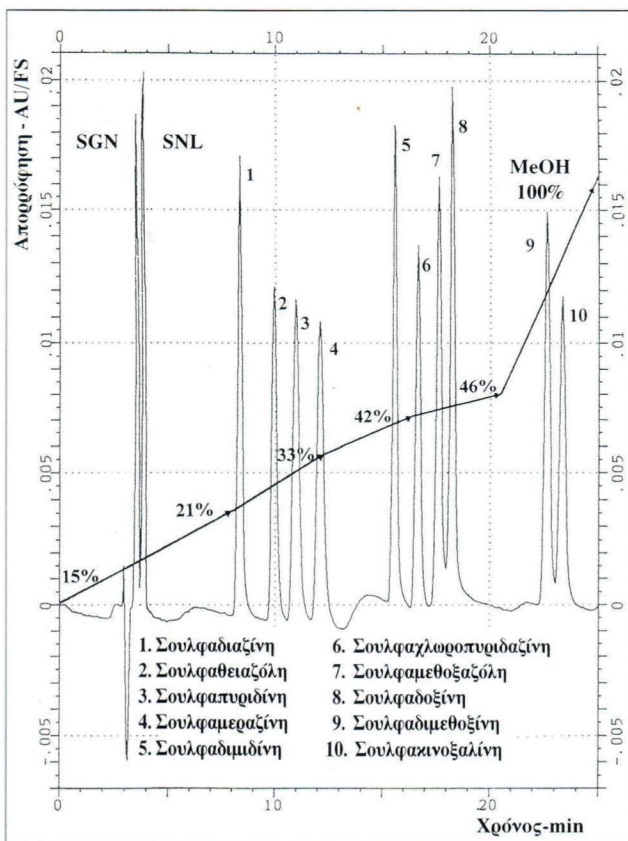
R% = το ποσοστό ανάκτησης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεθοδολογία

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία⁵, χαρακτηριστικό στοιχείο της μεθόδου αυτής είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με εξαιρετικά αποτελέσματα σε διάφορα είδη δειγμάτων, όπως στα αυγά, το ήπαρ, τα νεφρά, το γάλα και το κρέας. Στο εργαστήριό μας εφαρμόστηκε με επιτυχία μόνο στο κρέας και τα νεφρά χοίρου, βοοειδών και αιγοπροβάτων.

• Στην εκχύλιση του δείγματος με διχλωρομεθάνιο προσθέσαμε και άνυδρο θειϊκό νάτριο για να δεσμεύσουμε το νερό του δείγματος και να πετύχουμε καλύτερη ε-



Εικόνα 1. Υγροχρωματογράφημα προτύπου διαλύματος δώδεκα σουλφοναμιδών.

Συνθήκες: στήλη Hypersil ODS, 5 μm (250 x 4.6 mm), κινητή φάση 0.01M οξικό αμμώνιο pH 4.6; μεθανόλη, ροή 1.1 mL.min⁻¹, μήκος κύματος 266 nm, ευαισθησία 0.012 & 0.02 & 0.028 AU/FS, ταχύτητα καταγραφικού 3 & 5 mm.min⁻¹ SGN = σουλφαγουανιδίνη SNL = σουλφαναμιδίδη.

παφή του δείγματος με το εκχυλιστικό μέσο και να περιορίσουμε τις απώλειες των σουλφοναμιδών και τη σπατάλη χρόνου από τη χρήση διαχωριστικών χωνιών.

- Στη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) ολόκληρο το εκχύλισμα (εκχυλίσματα διχλωρομεθανίου και ο πετρελαϊκός αιθέρας) πέρασε ταυτόχρονα από τη φύσιγγα SPE και όχι σε δύο φάσεις. Όλο το τελικό εκχύλισμα (20 mL οξικού αιθυλεστέρα) συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και αναγεννήθηκε με 1 mL αντί 800 μL μίγματος 35:15, ο δε όγκος έγχυσης στον υγρό χρωματογράφο ρυθμίστηκε από 100 μL στα 20 μL , με αποτέλεσμα την καλύτερη ανταπόκριση του ανιχνευτή και τη βελτίωση της εμφάνισης του χρωματογραφήματος.

- Ύστερα από μελέτη των διαφόρων παραμέτρων της χρωματογραφικής ανάλυσης, όπως της σύστασης της κινητής φάσης, του pH του υδατικού μέσου, της ιονικής ισχύος του υδατικού μέσου, της φύσεως του οργανικού τροποποιητή, της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης καταλή-

ξαμε στη χρησιμοποίηση της ίδιας κινητής φάσης (ρυθμιστικό διάλυμα 0.01M οξικού αμμωνίου pH 4.6: Μεθανόλη) με διαφορετικό όμως πρόγραμμα βαθμιαίας έκλυσης που είχε ως αποτέλεσμα το λίαν ικανοποιητικό διαχωρισμό των σουλφοναμιδών (διαχωριστική ικανότητα-Rs από 0.7 έως 1.5). Οι συνθήκες αυτές έχουν εφαρμογή για όλες τις σουλφοναμίδες που χρησιμοποιήσαμε ακόμα και για τη σουλφαναμιδίδη και σουλφαγουανιδίνη, οι οποίες επίσης διαχωρίστηκαν με τις συνθήκες της βαθμιαίας έκλυσης που εφαρμόσαμε, σε αντίθεση με την τεχνική των Deserens και συν., 1991. Όμως, επειδή εκλύονται στην αρχή του χρωματογραφήματος, δεν χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση. Στην εικόνα 1 μπορούμε να δούμε πρότυπο υγροχρωματογράφημα 12 σουλφοναμιδών στα 266 nm καθώς και τη γραμμική απεικόνιση της αυξανόμενης πολικότητας κατά τη διάρκεια του προγράμματος βαθμιαίας έκλυσης (gradient).

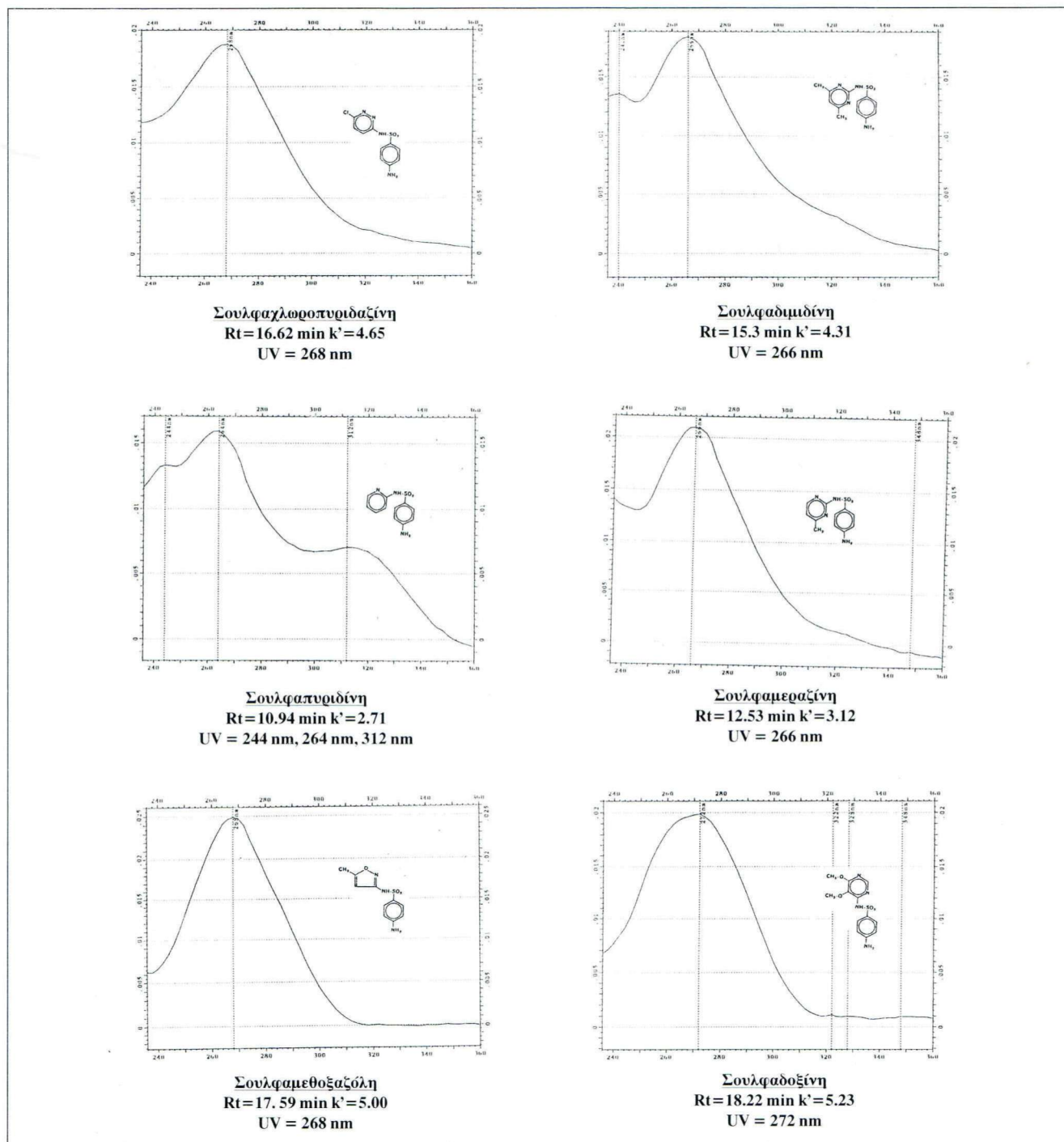
Το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου να τοποθετείται σε διαφανή και όχι σκοτεινόχρωμο περιέκτη γιατί αναπτύσσονται μύκητες.

- Ταυτόχρονα η χρησιμοποίηση του ανιχνευτού πολλαπλών φωτοδίοδων μας παρείχε ανά πάσα στιγμή τη δυνατότητα της παραλαβής του πλήρους φάσματος των ουσιών που εξετάζουμε, την ταυτοποίηση και τη διαφοροποίησή τους από άλλες τυχόν παρεμβαίνουσες ουσίες, οι οποίες, στην περίπτωση των σουλφοναμιδών που συχνότατα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες, τυχαίνει να φέρουν αρωματικές αμινικές ομάδες και να εμφανίζονται κατά τη χρωματογραφική ανάλυση³⁸. Στις εικόνες 2 και 3 μπορούμε να παρατηρήσουμε χαρακτηριστικά στοιχεία των 12 σουλφοναμιδών σύμφωνα με τις χρωματογραφικές συνθήκες που εφαρμόσαμε, όπως το χρόνο κατακράτησης (Rt), τον παράγοντα χωρητικότητας (k') και το φάσμα τους με τα αντίστοιχα μέγιστα απορρόφησης στο υπεριώδες φως.

- Στο τέλος κάθε χρωματογραφικής ανάλυσης (25 min) απαιτείται το πλύσιμο της αναλυτικής στήλης για 5 min με μεθανόλη πριν από την επαναφορά των αρχικών συνθηκών για την αποφυγή της βαθμιαίας απόκλισης της βασικής γραμμής του χρωματογραφήματος (drifting of the detector response). Επίσης, μετά το πέρας μιας ημέρας εργασίας η στήλη διατηρείται μέχρι την επόμενη ημέρα με ροή νερού 0.2 mL.min⁻¹.

- Το μήκος κύματος ήταν 266 nm, η ροή κινητής φάσης 1.1 mL.min⁻¹ και ο όγκος έγχυσης 20 μL . 12 σουλφοναμίδες μπορούν να προσδιορισθούν με μια ανάλυση σε συγκεντρώσεις έως και 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, η δε ανάκτηση της μεθόδου (recovery-R%) κυμάνθηκε από 60 έως 88% για δείγματα επιβαρημένα στο Ανώτατο Επιτρεπτό Όριο (MRL) των 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

- Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων γινόταν με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς 7 σημείων συμπεριλαμβαν-

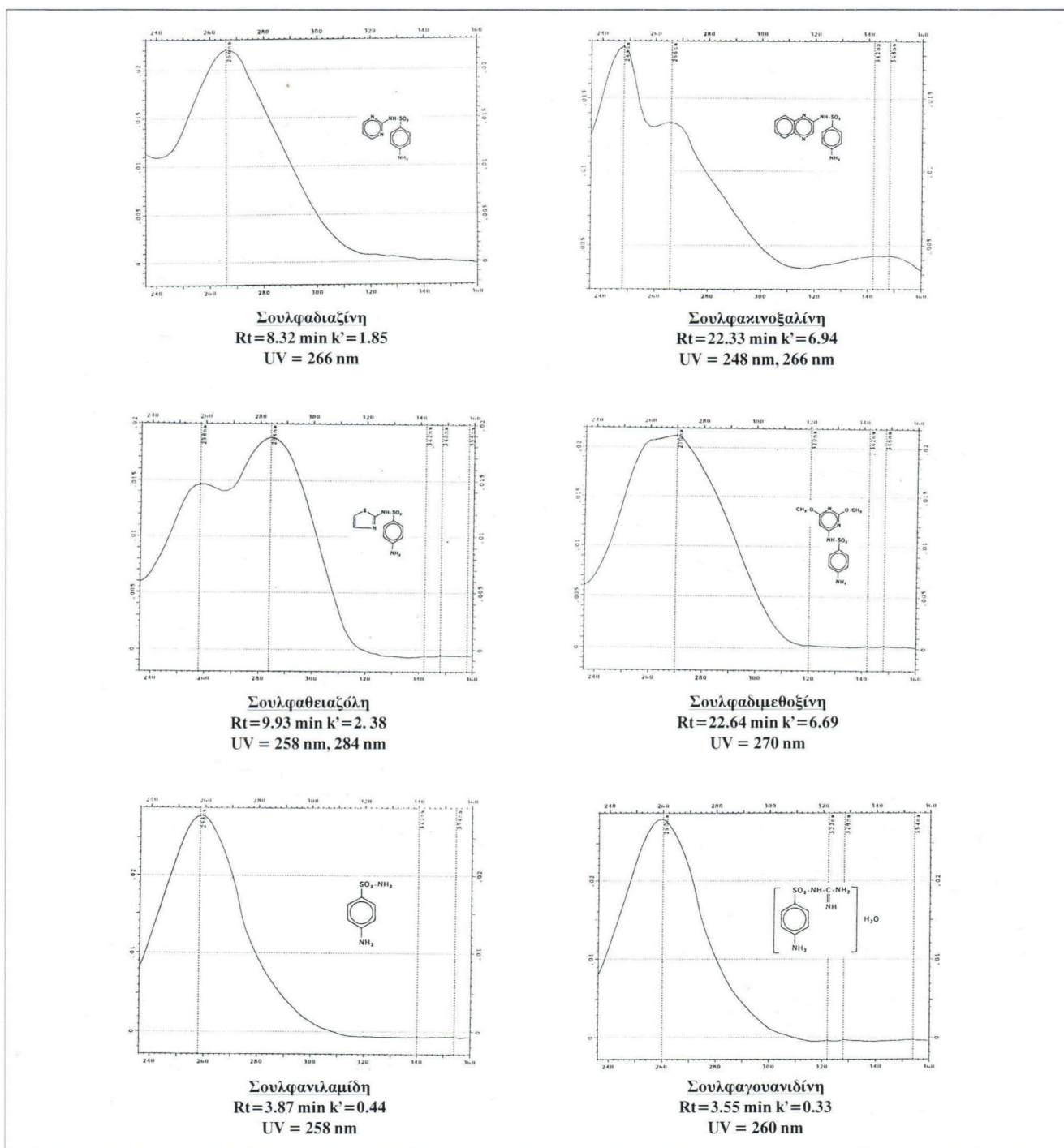


Εικόνα 2. Χαρακτηριστικά στοιχεία των σουλφοναμιδών: χημική δομή, φάσμα στο υπεριώδες (UV), χρόνος κατακράτησης (Rt), παράγοντας χωρητικότητας (k'), κύρια μέγιστα του φάσματος (UV).

νομένου και του μηδενός για τις ουσίες που ανιχνεύθηκαν. Η ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis) έγινε με τη Μέθοδο των Ελαχίστων Τετραγώνων (OLS) για τον προσδιορισμό της κλίσης (slope), της σταθεράς (intercept) και του συντελεστού συσχέτισης (correlation coefficient), σύμφωνα με το υπολογιστικό στατιστικό πρόγραμμα

SPSSPC+. Διαπιστώθηκε άριστη γραμμική συσχέτιση μεταξύ της εγχόμενης ποσότητας και του εμβαδού της κορυφής για ποσότητες από 12.5 έως 400 ng, όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην εικόνα 4.

• Ένας εκπαιδευμένος αναλυτής, με την κατάλληλη υποδομή και εξοπλισμό του εργαστηρίου, μπορεί να προ-



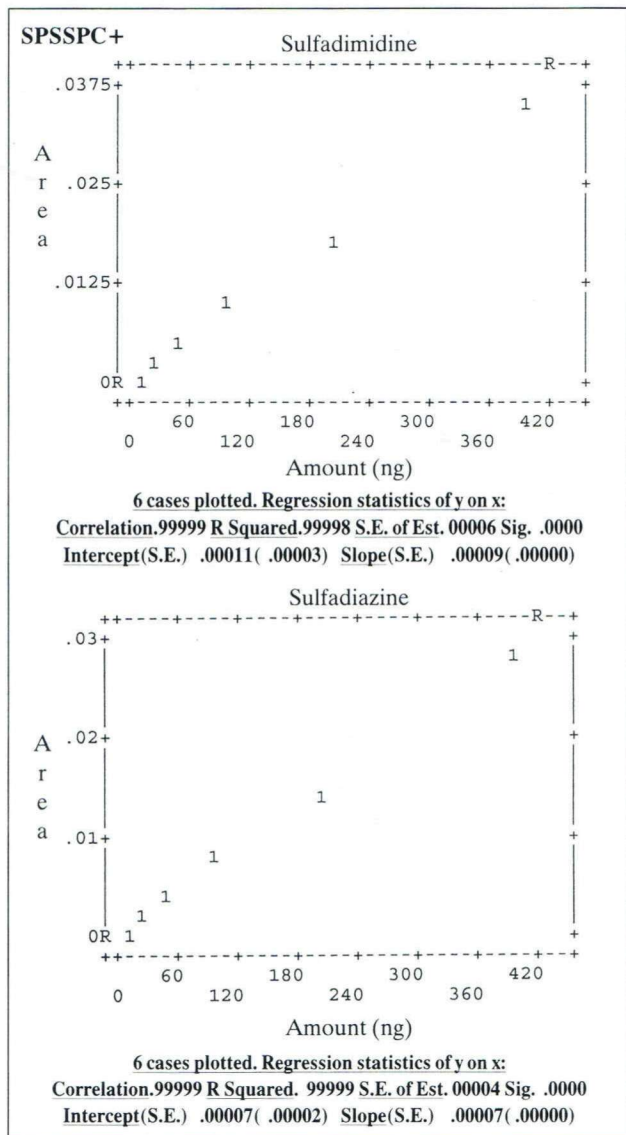
Εικόνα 3. Χαρακτηριστικά στοιχεία των σουλφοναμιδών: χημική δομή, φάσμα στο υπεριώδες (UV), χρόνος κατακράτησης (Rt), παράγοντας χωρητικότητας (k'), κύρια μέγιστα του φάσματος (UV).

ετοιμάσει για χρωματογραφική ανάλυση 20 δείγματα σε μια ημέρα εργασίας (διάρκεια 7 ώρες).

Ανάλυση δειγμάτων

Σύμφωνα με τα στοιχεία των Περιφερειακών Εργαστηρίων του Υπουργείου Γεωργίας, από τα 1360 δείγμα-

τα που εξετάστηκαν για αντιμικροβιακούς παράγοντες με το μικροβιολογικό τεστ, τα 112 βρέθηκαν ύποπτα, καθ' όσον παρουσίασαν άλω αναστολής ανάπτυξης διαμέτρου μεγαλύτερης από 2 mm (*Bacillus subtilis* pH 7.2). Το εργαστήριό μας επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα αυτά, τα οποία έχουν όπως φαίνεται στην εικόνα 5. Τα ποσοστά θε-



Εικόνα 4. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς της σουλφαδιμιδίνης και σουλφαδιαζίνης με τα αντίστοιχα στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων σύμφωνα με το στατιστικό πρόγραμμα SPSSPC+.

τικότητας ήσαν 4,88% (Κοζάνη), 5,77% (Σέρρες), 8,33% (Ιωάννινα), 13,15% (Χαλκίδα) και 10,49% (Πάτρα) και οι ουσίες που προσδιορίστηκαν ήταν η **σουλφαδιμιδίνη** και η **σουλφαδιαζίνη** με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ιδιαίτερα της πρώτης.

Στην εικόνα 6 παρατίθενται χαρακτηριστικά υδροχρωματογραφήματα δειγμάτων αρνητικού κρέατος χοίρου^(Α), πραγματικού θετικού κρέατος χοίρου για σουλφαδιμιδίνη^(Β) και πραγματικού θετικού κρέατος χοίρου για σουλφαδιαζίνη^(Γ). Οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν κυμάνθηκαν από 59 έως 3578 µg/kg SDN (Κοζάνη), από 22 έως 114600 µg/kg SDN (Χαλκίδα), από 333 έως 1511 µg/kg

SDZ (Χαλκίδα), από 10 έως 2469 µg/kg SDN (Πάτρα), από 33366 έως 275500 µg/kg SDN (Ιωάννινα) και από 6 έως 766 µg/kg SDN (Σέρρες). Η επιβεβαίωση των υπόπτων κορυφών των δειγμάτων γινόταν με την παραλαβή του φάσματος αυτών και την ταυτόχρονη παραβολή του με το αντίστοιχο φάσμα της κορυφής της προτύπου ουσίας, ακολουθώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα του αναλυτικού μας συστήματος. Σύμφωνα με αυτό, η ακρίβεια της επιβεβαίωσης για το εύρος φάσματος 235-360 nm, ήταν 99% (match 99%) και ήταν απόλυτα σύμφωνη με τα προβλεπόμενα από την Απόφαση 93/256/ΕΟΚ³¹ κριτήρια (Εικόνα 7).

Για συγκεντρώσεις μικρότερες των 20 µg/kg, όπως είναι οι τιμές 6 και 10 µg/kg στα αποτελέσματα των Σερρών και της Πάτρας, η ανίχνευση και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός είναι μεν δυνατός, αλλά η ταυτοποίηση του φάσματος δεν είναι σε πλήρη συμφωνία με τα κριτήρια της 93/256/ΕΟΚ λόγω παρεμβολών του υποστρώματος (matrix interferences).

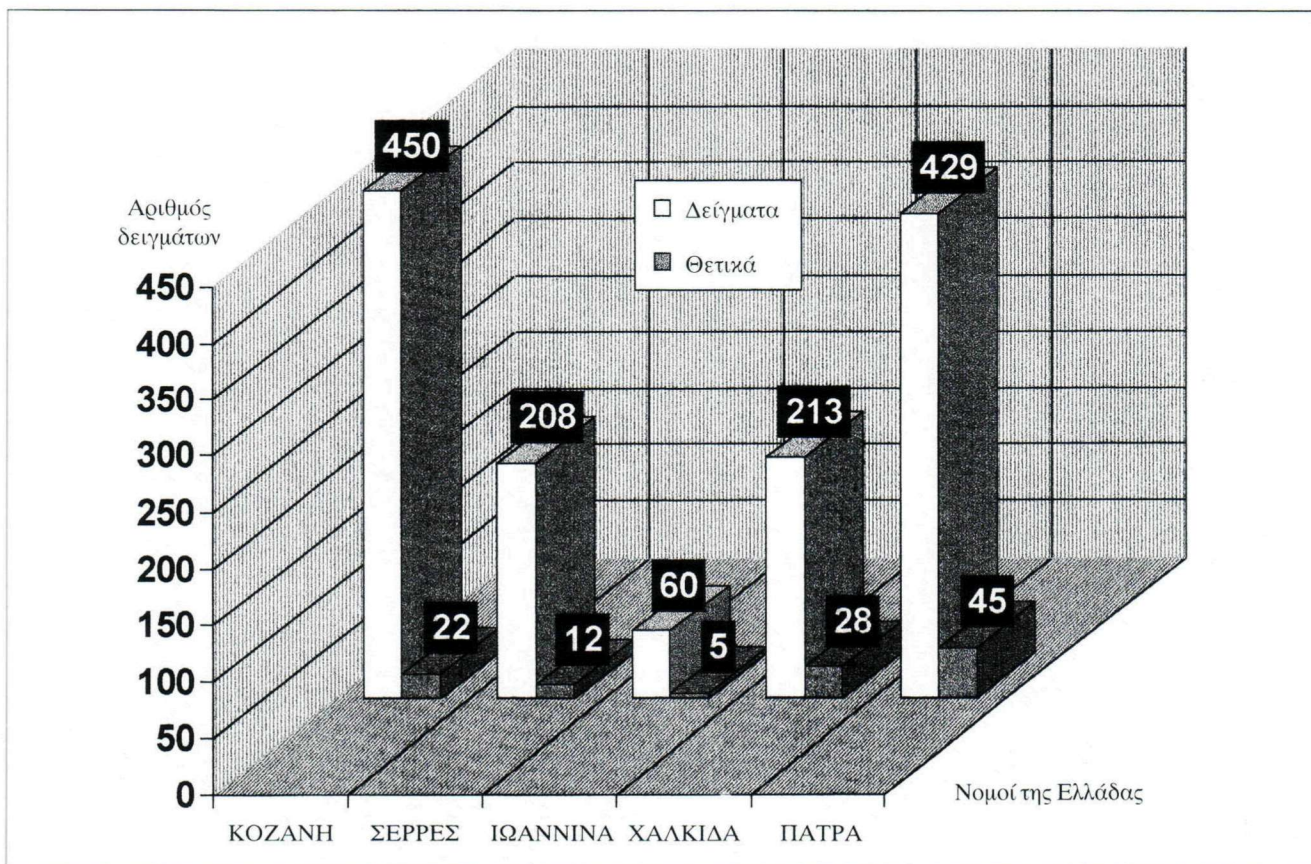
Όσον αφορά στα 35 δείγματα κρέατος χοίρου από τα σούπερ μάρκετ της Αττικής, δεν ανιχνεύθηκαν κατάλοιπα σουλφοναμιδών, γεγονός που αποτελεί μια μικρή ένδειξη, ότι το κρέας στην κατανάλωση είναι ασφαλές για τους καταναλωτές.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε, ότι το Ανώτατο Επιτρεπτό Όριο (MRL) σύμφωνα με τη νομοθεσία είναι 100 µg/kg τόσο για τους ιστούς (μύς, ήπαρ, νεφρά, λιπώδεις ιστούς)³² όσο και για το γάλα³³ για το σύνολο των ανιχνευομένων σουλφοναμιδών.

Από τη βιβλιογραφία διαπιστώθηκε, ότι παρόμοια ήσαν και τα αποτελέσματα της Αγγλίας, όπου το 91% των θετικών για αντιμικροβιακούς παράγοντες δειγμάτων αφορούσαν τα χοιρινά και από όλα τα ζώα που ήσαν θετικά για σουλφοναμίδες το 97% ήταν για σουλφαδιμιδίνη³⁴. Οι αυξημένες αυτές συγκεντρώσεις της σουλφαδιμιδίνης αποδόθηκαν στους παρακάτω λόγους:

1. στη μη τήρηση του μακρού χρόνου αναμονής που είναι τουλάχιστον 10 ημέρες^{8,23}.
2. στο ότι η σουλφαδιμιδίνη έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στα τοιχώματα των μεταλλικών τμημάτων των μηχανημάτων ανάμιξης της ζωοτροφής και επομένως να ρυπαίνεται η κανονική τροφή από το φαρμακευτικό πρόμικμα που προηγήθηκε³⁵, και
3. στο ότι αποτελεί την καλύτερα απορροφούμενη σουλφοναμίδη με τη βραδύτερη αποβολή της από τον οργανισμό, γεγονός που εξηγεί και την επίμονη παραμονή της στους ιστούς για μακρό χρονικό διάστημα⁸.

Στην Ελλάδα, οι σουλφοναμίδες που κυκλοφορούν επίσης είτε σε μορφή ενέσιμου σκευάσματος είτε σε μορφή φαρμακικού προμίγματος, σύμφωνα με τους καταλόγους του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων, είναι οι ακόλουθες: σουλφαδιμεθοξίνη, σουλφαδιμιδίνη, σουλφακιννοξαλίνη, σουλφαχλωροπυριδαζίνη, σουλφαδιαζίνη,



Εικόνα 5. Ιστόγραμμα αποτελεσμάτων του προσδιορισμού των σουλφοναμιδών.

σουλφαθειαζόλη, σουλφαμεραζίνη, σουλφακλοξίνη, σουλφαπυραζόλη.

Στον πίνακα 1 μπορούμε να δούμε τα φαρμακούχα προμίγματα με δραστική ουσία τη σουλφαδιμιδίνη και σουλφαδιαζίνη που κυκλοφορούν επίσημα στη χώρα μας.

Αν και τα ποσοστά θετικότητας είναι υψηλά για τις περιοχές αυτές της χώρας μας, θα πρέπει να σημειωθεί, ότι στην Αγγλία, παραδείγματος χάρη, την αύξηση του ποσοστού θετικότητας από το 2% στο 4.5% τη χαρακτήρισαν ως εποχιακό φαινόμενο εμφανιζόμενο κατά τους ψυχρούς

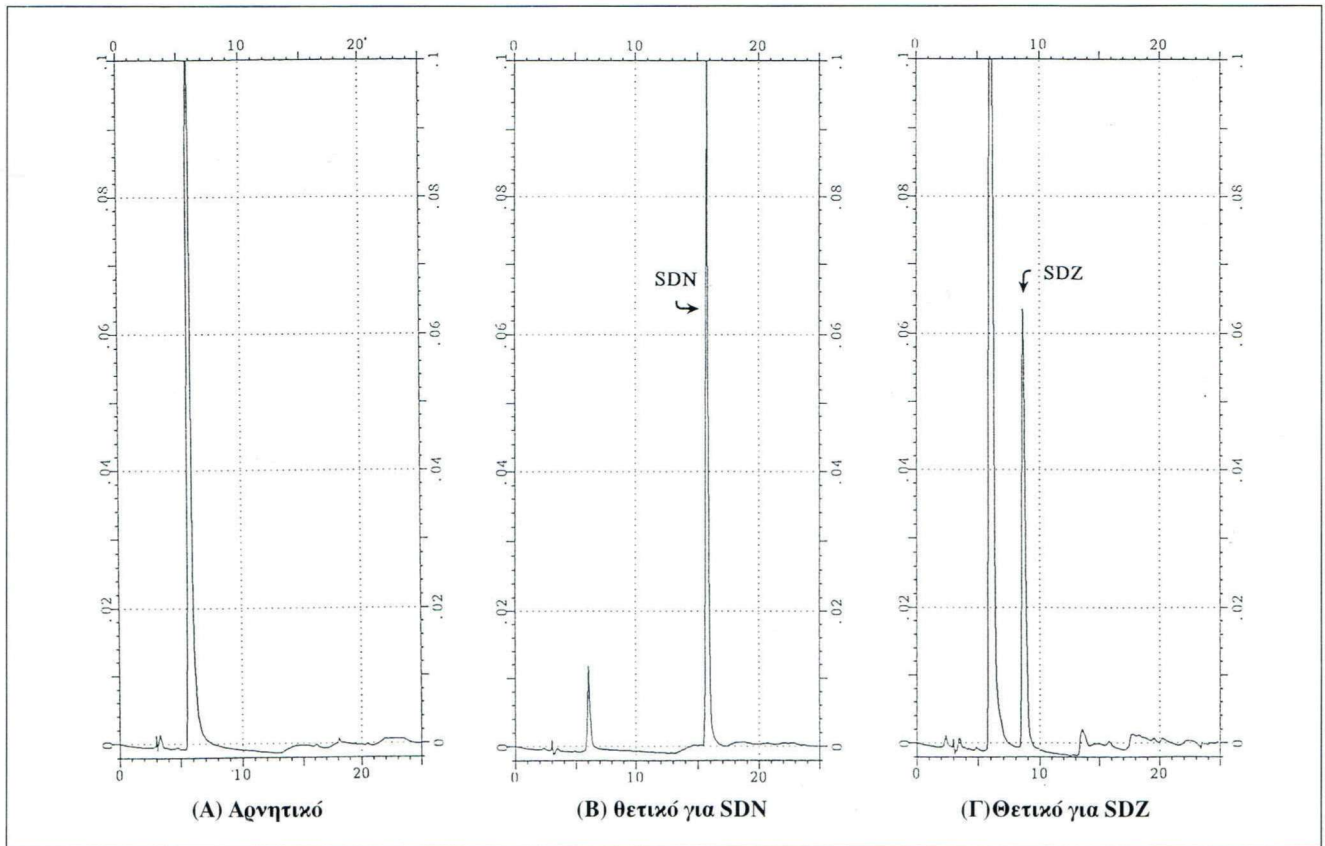
μήνες του χρόνου και συνάμα το απέδωσαν και σε τυχαία γεγονότα, τα οποία φέρνουν το αντίθετο αποτέλεσμα παρά την αυστηρή τήρηση των χρόνων αναμονής, όπως είναι η επίδραση του είδους των ζώων, το ανθρώπινο σφάλμα και άλλα²⁸.

Σε όλα όσα προαναφέρθηκαν για τη σουλφαδιμιδίνη, ουσία η οποία ανιχνεύθηκε σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις στο κρέας του χοίρου, θα πρέπει να προσθέσουμε και να λάβουμε υπόψη μας, ότι η ουσία αυτή δεν επηρεάζεται από τη θέρμανση (μαγειρέυμα). Αντίθετα, η κατά τη συντή-

Πίνακας 1. Φαρμακούχα προμίγματα που κυκλοφορούν στην Ελλάδα.

Φαρμακούχα προμίγματα			
1	AVISULFAN-10	σουλφαδιμιδίνη	AVICO A.E.
2	CYFAC HS	σουλφαδιμιδίνη, CTC, Pen. G	ΛΑΠΑΦΑΡΜ
3	IVASULF	σουλφαδιμιδίνη	VETERIN
4	TYLAN SULPHA	σουλφαδιμιδίνη	ΕΛΑΝΚΟ
5	OPTIPRIME	σουλφαδιαζίνη-τριμεθοπρίμη	VETERIN
6	TRIBRISSEN	σουλφαδιαζίνη-τριμεθοπρίμη	COOPERS
7	TMP-SDZ	σουλφαδιαζίνη-τριμεθοπρίμη	PETER HAND

Κτηνιατρικό Συνταγολόγιο - 1ο Μέρος - Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων - ΕΟΦ, 1995³⁶



Εικόνα 6. Χαρακτηριστικά υδροχρωματογραφήματα δειγμάτων κρέατος χοίρου (Α) αρνητικό, (Β) θετικό για σουλφαδιμιδίνη και (Γ) θετικό για σουλφαδιαζίνη. Συνθήκες: στήλη Hypersil ODS, 5 μm (250 x 4.6 mm), κινητή φάση 0.01 M οξικό αμμώνιο pH 4.6: μεθανόλη, ροή 1.1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ μήκος κύματος 266 nm, ευαισθησία 0.012 & 0.028 AU/FS, ταχύτητα καταγραφικού 3 & 5 mm $\cdot\text{min}^{-1}$.

ρηση (κατάψυξη) του τροφίμου παρατηρούμενη πτώση της συγκέντρωσής της (σχηματισμός μεταβολίτου) διαρκεί μέχρι την κατανάλωσή του, οπότε και επανέρχεται στα αρχικά της επίπεδα (επανασχηματισμός της μητρικής ουσίας) από την επίδραση του όξινου pH του στομάχου³⁷. Επειδή δε η σουλφαδιμιδίνη έχει ενοχοποιηθεί ως καρκινογόνος ουσία (καρκίνος του θυρεοειδούς)²¹ και έχει προταθεί η πλήρης απαγόρευση της, θα πρέπει η χρησιμοποίησή της να ελέγχεται με σχολαστικότητα από τους κτηνιάτρους, ο δε προτεινόμενος χρόνος αναμονής, ο οποίος δεν αναφέρεται πουθενά στο κτηνιατρικό συνταγολόγιο του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων³⁶, θα πρέπει να τηρείται αυστηρά.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα των ελέγχων της ζωϊκής μας παραγωγής συνάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Οι έλεγχοι θα πρέπει να εντατικοποιηθούν σε όλο το μήκος της αλυσίδας, ζωοτροφές-παραγωγικά ζώα-ζωϊκά τρόφιμα-καταναλωτής, για τον εντοπισμό του προβλήματος, που προέκυψε από τη χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων τόσο κατά την προληπτική - θεραπευτική

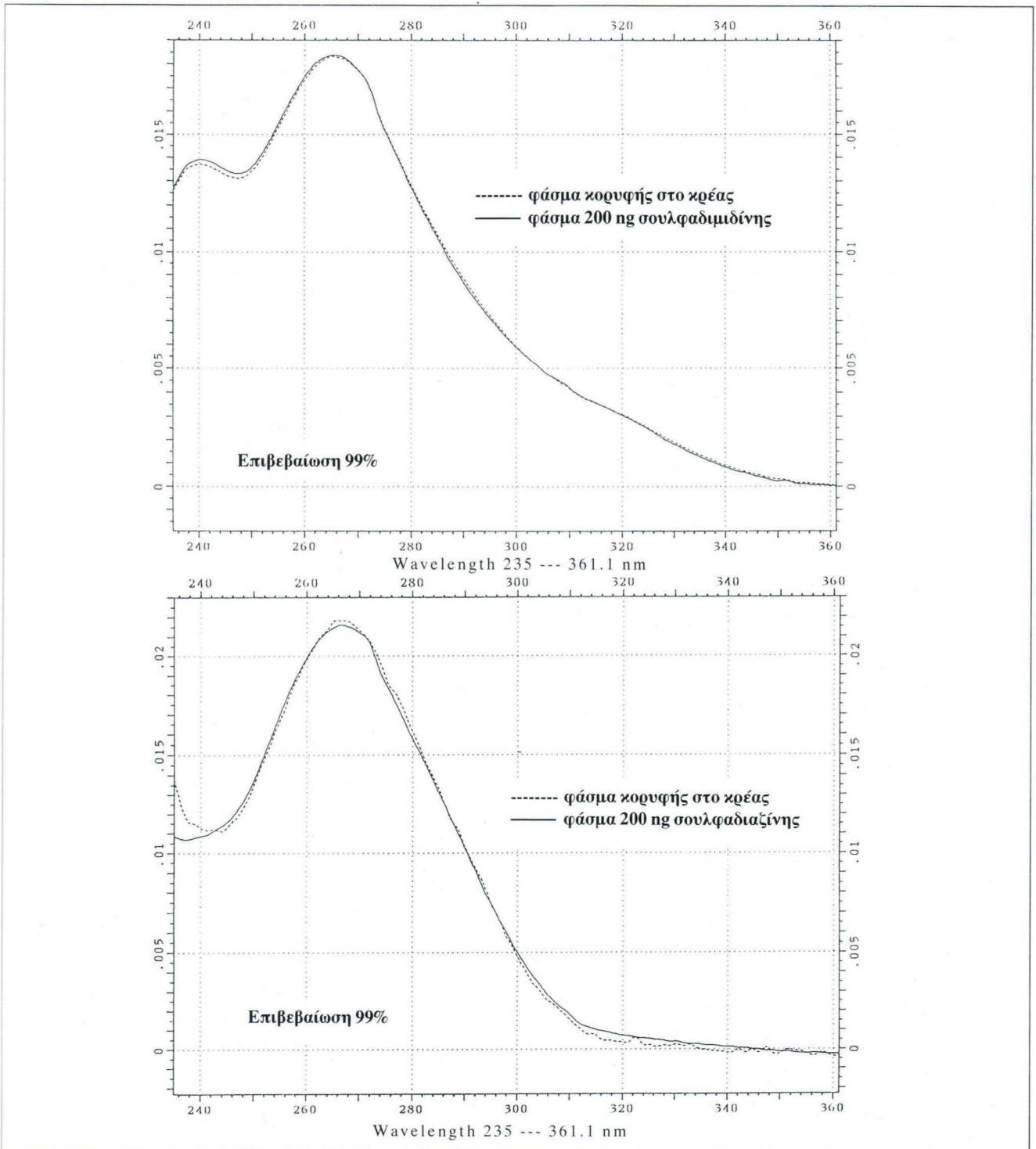
κτηνιατρική όσο και για αναβολικούς σκοπούς.

2. Η εφαρμογή των οδηγιών αυστηρής τήρησης του προβλεπόμενου χρόνου αναμονής πριν από τη σφαγή, ο οποίος θα πρέπει να αναφέρεται σαφώς στις οδηγίες χρήσης των φαρμακευτικών σκευασμάτων και των φαρμακικών προμιγμάτων (Ορθή Κτηνιατρική Πρακτική) και

3. Το Υπουργείο Γεωργίας θα πρέπει να διοργανώσει εξειδικευμένα προγράμματα εκπαίδευσης του προσωπικού των Περιφερειακών Εργαστηρίων Ρουτίνας, στις μικροβιολογικές μεθόδους προσδιορισμού των αντιβιοτικών ή σε άλλες διερευνητικές τεχνικές (screening) όπως, π.χ., η ELISA.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

SPE	Solid Phase Extraction
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ODS	Octadecyl
PDA	Photo Diode Array
SOS test	Sulfa On Site test
NDKT	New Dutch Kidney Test
FSIS	Food Science Inspection Service
USDA	United States Department of Agriculture
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay



Εικόνα 7. Επιβεβαίωση της θετικότητας δειγμάτων κρέατος χοίρου με την παραβολή του φάσματος των προτύπων ουσιών της σουλφαδιμιδίνης και σουλφαδιαζίνης με τα αντίστοιχα φάσματα των υπόπτων κορυφών των θετικών δειγμάτων.

FARAS Food Antibiotic Residue Analysis System
AU/FS Absorbance Units / Full Scale
MeOH Methanol
OLS Ordinary Least Squares
SDN Sulfadimidine

SDZ Sulfadiazine
MRL Maximum Residue Limit
SGN Sulfaguanidine
SNL Sulfanilamide
ΕΟΦ Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Οδηγία 86/469/ΕΟΚ του Συμβουλίου των Υπουργών της ΕΟΚ, σχετικά με την εξέταση των ζώων και του νοπού κρέατος για την παρουσία καταλοίπων. Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L257/36.
2. Προεδρικό Διάταγμα υπ' αριθμ. 497/89, Εφημερίδα της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας, ΦΕΚ 212, τεύχος πρώτο, Αθήνα, 28 Σεπτεμβρίου 1989.
3. Κανονισμός (ΕΟΚ) 2377/90 του Συμβουλίου των Υπουργών της ΕΟΚ, για τη θέσπιση Κοινοτικής Διαδικασίας για τον Καθορισμό Ανωτάτων Ορίων Καταλοίπων Κτηνιατρικών Φαρμάκων στα Τρόφιμα Ζωϊκής Προέλευσης, Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L224/1.
4. Οδηγία 96/23/ΕΕ του Συμβουλίου των Υπουργών της ΕΕ, για μέτρα ελέγχου καταλοίπων ουσιών στα ζώοντα ζώα και ζωϊκά τρόφιμα, σε αντικατάσταση των Οδηγών 85/358/ΕΟΚ, 86/469/ΕΟΚ και των Αποφάσεων 89/187/ΕΟΚ και 91/664/ΕΟΚ, Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων L125/10.
5. Diserens JM, Renaud-Bezot C, Savoy-Perroud MC. Simplified Determination of Sulfonamide Residues in Milk, Meat and Eggs. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 1991, 87:205-211
6. Bogaerts R and Wolf F. A standardise method fro the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft* 1980, 60:672-673
7. Jawetz E. Sulfonamides Ec Trimethoprim. In: *Basic and Clinical Pharmacology*. Sixth ed, Appleton and Lange Paramount Publishing Business and Professional Group, USA, 1995:716-722.
8. Korsrud GO, Papich MG, Fesser ACE, Salisbury CDC, Macneil JD. Residue depletion in tissues and Quids & om swine fed sulphamethazine, chlortetracycline and penicilline 6 in combination. *Food Additives and Contaminants* 1996, 13:287-292
9. Kindred T, Patel B, Walcott J. The FSIS National Residue Program. In: *Proceedings of the Euroresidue III conference*, FECS nr.213, Veldhoven, The Netherlands, 1996:175-184
10. Woodward KN. Antibiotic Use in Animal Production in the European Union-Regulation and Current Methods for Residue Detection (Chapter 3). In: *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*. AOAC International, USA, 1995:47-76
11. Λεγάκης ΝΙ, Περόγαμβρος ΤΗ. Σουλφοναμίδες. Στο: Λεγάκης ΝΙ, Περόγαμβρος (εκδ.) *Αντιβιοτικά* 1990:173-183.
12. Wegener pC and Bager F. Antibiotics for growth promotion - Assessment of health risks for humans and animals. In: *Proceedings of the Scientific conference on growth promotion in meat production*, Brussels 29, 30/1 1-1/12/1995, ECSC - EC-EAEC, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg 1996.
13. de Pozuelo MM, Gomez J, Reuvers Th, Marcos V. Rapid creening and confirmatory method for sulfonamides residues in milk. In: *Proceedings of the Euroresidue III conference*, FECS nr.213, Veldhoven, The Netherlands, 1996:685-689
14. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO-UN). Residues of veterinary drugs in foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition Paper 32, Rome 29 October-5 November 1984:1-17
15. Bond D. ANTIBIOTICS - The hidden threat. *Food Processing Hygiene Supplement* 1995:1
16. Wall PG, Morgan D, Lamden K, Rayan M, Griffin M, Threfall EJ, Ward LR and Rowe B. A case control study of infection with an epidemic strain of multi - resistan Salmonella typhimurium DT104 in England and Wales. *Communicable Disease Report*, 1994, 4, 11R130-R135
17. Wyhowski de Bukanski B, Degrootd J-M, Beernaert H. A two-dimensional high-performance thin-layer chromatographic screening method for sulfonamides in animal tissues. *Z. Lebensm Unters Forsch* 1988, 187:242-245
18. Haagsma N, van de Water C. Rapid determination of five sulfonamides in swine tissue by high- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1985, 333:256-261
19. Takatsgki K and Kikuchi T. Gas chromatographic mass-spectrometric determination. of six sulfonamides residues in egg and animal tissues.. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1990, 73:886-892
20. Bui LV. Liquid chromatographic determination of six sulfonamide residues in animal tissues using post column derivatization. *J Assoc OfAnal Chem* 1993, 76:966-976
21. Kn Tsai C, Condo F, Ueyama Y and Azama J. Determi nation of Sulfamethazine Residue in Chicken Serum and Egg by High-Performance Liquid Cgromatography with Chemiluminescence Detection. *Journal of Chromatographic Science* 1995, 33:365-369
22. Lindsay DG. Monitoring and testing for residues of therapeutics in meat. *The Veterinary Record* 1983:469-471
23. Boison JO, Keng LY. Determination of Sulfadimethoxine and Sulfamethazine Residues in Aumal Tissues by Liquid Chromatography and Thermospray Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* 1995, 78:651-658
24. Nouws JFM, Broex NJG, den Hartog JMP, Driessens F. The Dutch Kidney Test. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* 1988, 39:133-156
25. Koenen-Dierick K, Okerman L, de Zutter L, Degrootd JM, van Hoof J, Srebrnik S. A one- plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat:an alternative to the EEC four plate method? *Food Additives and Contaminants* 1995, 12(1):77-82
26. Lund C. Identification of antibiotic residues in animal tissues under practical conditions. In: *Proceedings from the 2nd World Congress "Foodborne Infections and Intoxications"*, Berlin, 1986:819-824
27. Calderoe V, Gonzalez J, Diez P, Berenguer JA. Evaluation of a multiple bioassay technique for determination of antibiotic residues in meat with standard solutions of antimicrobials. *Food Additives and Contaminants* 1995:715-721
28. Bond D. Taking out antibiotic residues. *Laboratory News* 1995:14
29. Westoo A. Screening and post-screening assays used in Sweden. Report of the National Food Administration, Biology Division, LIVSMEDELS VERKET, Uppsala Sweden 22 May 1996
30. Myllyniemi AL. Test media and bacteria used ih the

- screening test. Report of the National Veterinary and Food Research Institute, EELA Finland, 1996
31. Απόφαση 93/256/ΕΟΚ της Επιτροπής της 14ης Απριλίου 1993, περί θεσπίσεων των μεθόδων ανίχνευσης ουσιών με ορμονική δράση ή θυρεοστατική δράση. Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων L118/64.
 32. Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 2701/94 της Επιτροπής της 14ης Φεβρουαρίου 1996 για τροποποίηση των παραρτημάτων I, II, III και IV του Συμβουλίου για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανωτάτων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων L287/7.
 33. Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 282/96 της Επιτροπής της 14ης Φεβρουαρίου 1996, για τροποποίηση των παραρτημάτων I, II και III του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθμ. 2377/90 του Συμβουλίου, για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανωτάτων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων L37/12.
 34. Patel R. Analysis k Control - Antibiotic Residue Monitoring - National Surveillance and Due Diligence. The European Food & Drink Review 1996:63-67
 35. Bevil R.F. Factors influencing the occurrence of drug residues in animal tissues after the use of antimicrobial agents in animal feeds. Journal of the American Veterinary Medical Association 1984, 185(15):1124-1126
 36. Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ). Κτηνιατρικό Συνταγολόγιο, Πρώτο μέρος, Εκδόσεις ΦΑΡΜΕΤΡΙΚΑ, Αθήνα, 11995:41-47.
 37. Rose MD, Shearer G, Farrington WH. The thermal stability and effect of cooking on veterinary drug residues in food. In: Proceedings of the Euroresidue III conference, Veldhoven, FECS nr.213, The Netherlands, 1996:829-834
 38. Horwitz W. Analytical Methods for Sulfonamides in Foods and Feeds. I. Review of Methodology. J Assoc Off Anal Chemists 1981, 64:104-130