

Antibióticos em alimentos: determinação e quantificação por HPLC com detecção fluorimétrica

Antibiotics in foods: Determination and quantification by HPLC with fluorescence detection

PENA, A. L. S. *; SILVEIRA, M. I. N. * y CASTILLO, B. **

- * Laboratório de Bromatologia. Faculdade de Farmácia. Universidade de Coimbra. 3000 Coimbra. Portugal.
- ** Laboratório de Técnicas Instrumentales (Sección Departamental de Química Analítica). Facultad de Farmácia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

RESUMO

A monitorização de resíduos de antibióticos em alimentos, é uma área de preocupação crescente e muito importante devido ao seu potencial impacto na saúde humana.

Os antibióticos são administrados nos animais produtores de alimento, não só no tratamento de doenças mas também subterapeuticamente para manter a saúde e promover o crescimento.

O uso de antibióticos não autorizados, ou o não cumprimento das orientações de administração dos antibióticos autorizados, pode resultar na presença de níveis elevados de resíduos de antibióticos nos produtos alimentares. Por este motivo, a monitorização de resíduos de antibióticos em alimentos deve constituir um programa de vigilância.

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) constitui o método de eleição mais extensamente utilizado na identificação e quantificação de resíduos de antibióticos em alimentos. A detecção fluorimétrica constitui um poderoso modo de detecção de resíduos de antibióticos, principalmente quando há a necessidade de reduzir ou mesmo eliminar as interferências alimentares, devido à sua maior sensibilidade e especificidade. **Palavras chave:** Antibióticos. Tetraciclinas. Penicilinas. Aminoglicosídeos. Sulfonamidas. HPLC detecção fluorimétrica.

ABSTRACT

The monitoring of food materials for antibiotic residues is an area of increasing concern and importance due to the potential impact on human health.

Antibiotics are used in food-producing animals not only for treatment of disease, but also subtherapeutically to maintain health and promote growth.

The use of unauthorized antibiotics or the failure to follow label directions for approved antibiotics, could result in unsafe antibiotic residues in food products. Therefore, monitoring antibiotic residues in food forms part of a general policy to prevent unapproved uses of antibiotics.

Liquid chromatography has become the analytical method of choice for the identification and quantification of antibiotic residues in food. Fluorescence detection has been proved to be a valuable tool for antibiotic residue analysis, where interferences from food components must be reduced or eliminated, due of the higher specificity and sensitivity.

Key words: Antibiotics. Tetracyclines. Penicillins. Aminoglycosides. Sulphonamides. HPLC. Fluorescence detection.

Recibido: 18-11-96

Aceptado: 19-12-96

BIBLID [0004-2927(1997) 38:1; 27-37]

INTRODUÇÃO

Um elevado número de compostos orgânicos são fluorescentes, e por isso, os métodos fluorimétricos têm uma grande aplicação tanto em biofísica, como em bioquímica molecular, em análise química e química farmacêutica, e em química clínica (1).

Os agentes antimicrobianos, que possuam propriedades fluorescentes podem ser efectivamente detectados por fluorimetria, uma vez que, a intensidade da emissão de fluorescência é directamente proporcional ao poder da radiação de excitação.

A detecção fluorimétrica é um poderoso meio analítico na análise de resíduos, principalmente quando há a necessidade de reduzir ou mesmo eliminar as interferências alimentares, uma vez que existem poucos compostos naturais que possuam fluorescência nativa. A principal desvantagem deste sistema de detecção é que apenas poucos compostos exibem fluorescência nativa. Contudo, podem ser preparados derivados fluorescentes (2).

A derivatização química dos antibióticos em fluoróforos, quer antes ou após a análise cromatográfica, é realizada no sentido de melhorar a sensibilidade e especificidade do procedimento analítico (3).

No caso da derivatização pré-coluna a resolução cromatográfica pode ser posta em risco, dado que a reacção de derivatização pode dominar as propriedades cromatográficas do derivado. Variações subtis nas propriedades cromatográficas dentro de um grupo de compostos relacionados, podem ser eliminadas através de um procedimento de derivatização (4).

A derivatização pós-coluna não afecta directamente as propriedades dos antibióticos. Tem a vantagem de não ser necessário um passo de derivatização dos compostos em separado, sendo os analitos primeiramente separados cromatograficamente das interferências, antes de serem derivatizados. Contudo, a reacção química deve ser rápida, dentro do tempo de análise cromatográfico, no sentido de conservar a informação cromatográfica. Além disso, a química

da reacção cromatográfica pode ser afectada pelas condições cromatográficas, limitando o tipo de fases móveis que podem ser usadas (4).

Podem ser utilizados vários reagentes de derivatização, como a fluorescamina, cloreto de dansilo, o-ftalaldeído e outros, de acordo com a natureza do grupo funcional característico do composto a analisar.

TETRACICLINAS

As propriedades fluorescentes das tetraciclina e seus derivados foram largamente exploradas para fins analíticos (5) (6) (7) (8) (9) (10).

Alguns dos mais recentes métodos são baseados na fluorescência nativa dos compostos, mas é frequente utilizar produtos de degradação ácida ou alcalina (iso ou anidro tetraciclina), ou os seus complexos com iões metálicos, que apresentam uma fluorescência mais intensa (9).

Durante uma recente investigação (11) de um destes produtos de degradação, a isoclorotetraciclina, observou-se que a dependência da intensidade da fluorescência *versus* pH pode ser explicada assumindo um esquema de microionização para o composto.

As tetraciclina apresentam três valores absolutos de pK_a a aproximadamente 3, 7 e 9 (Fig. 1) (12).

A tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), e dimetilclorotetraciclina exibem fluorescência em solução alcalina, tendo uma intensidade máxima a pH= 10-11. Os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) obtidos para estas tetraciclina, foram muito semelhantes com um máximo de excitação a 390 nm, e um máximo de emissão a 510 nm. Observou-se que os valores

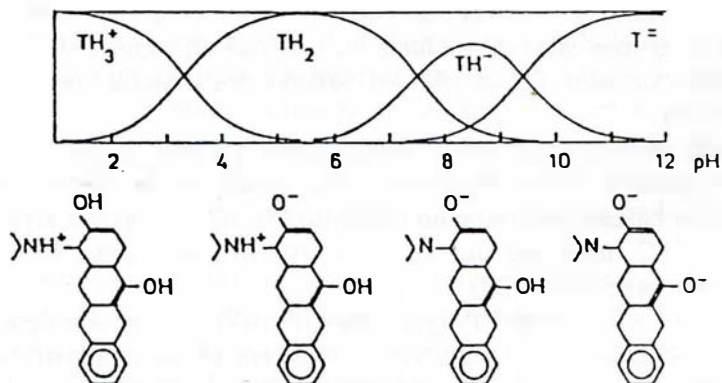


Fig. 1.—Estádios de ionização e proporção das diferentes formas das tetraciclina em função do pH (12).

exactos são quase independentes do pH, o que sugere que apenas um fluoróforo está envolvido. A absorção acima dos 300 nm está associada ao local do grupo fenólico-b-dicetona, podendo deste modo, o fluoróforo ser atribuído a este local. Além disso, o comprimento de onda de excitação corresponde aproximadamente ao comprimento de onda máximo de absorção observado na solução alcalina, o que indica que a espécie fluorescente é a forma ionizada do grupo fenólico-b-dicetona (13).

Com base na propriedade de fluorescência, é possível a aplicação de um método por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detecção fluorimétrica para a determinação sensível e específica das tetraciclinas.

No entanto, observam-se alguns problemas das tetraciclinas nas colunas de fase inversa. O problema reside numa diminuição das percentagens de recuperação, devido à quelação das tetraciclinas com os iões metálicos do material de enchimento e da superfície da coluna. Ocorrem também interacções entre as tetraciclinas e os grupos silanol residuais presentes no enchimento originando uma fraca sensibilidade.

No sentido de resolver estes problemas deve ser usada uma fase móvel acídica, mas este facto resulta na extinção da fluorescência (14). As dificuldades resultantes da quelação com iões metálicos presentes no material de enchimento, podem ser controladas através do uso de agentes quelantes ou pela complexação intencional das tetraciclinas com um metal, de modo a reduzir a competição a tal ligação. Como já foi referido, esta quelação pode ser usada como uma vantagem pelo o analista uma vez que aumenta subsequentemente a detecção por fluorescência (15). O ião trimetilamónio (TMA) é usado como agente bloqueador dos grupos silanol de modo a melhorar a recuperação das tetraciclinas, e a sua resolução cromatográfica (16). Sharma e Bevill (17) descrevem um demorado procedimento de condicionamento da coluna cromatográfica com etilenodiaminatetracetato (EDTA) e excesso de clorotetraciclina (CTC).

Knox e Jurand (18) mostraram que se pode obter um melhoramento removendo os grupos silanol residuais do material de suporte da sílica. Posteriores melhoramentos foram obtidos usando um material de enchimento polimérico (19).

O método fluorimétrico para a determinação das tetraciclinas de Kohn (5) de 1961, é baseado na formação de um complexo barbital de cálcio-tetraciclina. A investigação baseada no trabalho de Kohn (5), não permite a separação da OTC, TC e CTC, uma vez que os seus espectros de excitação e emissão diferem apenas levemente (20).

Os métodos descritos por Poiger e Schlatter (9) permitem a detecção das tetraciclinas, no músculo, fígado, rim e leite em pó após a extracção com acetato de etilo, com a formação de pares iónicos tricloroacetato de cálcio-tetraciclina, a partir das soluções aquosas. A fluorescência é então induzida pela adição de iões magnésio e uma base.

Hayes e Du Buy (20) procederam à conversão da OTC no derivado anidro, por aquecimento com ácido seguida da medida da intensidade da fluorescência a um pH alcalino.

Blanchflower et al (21) desenvolveram um método por HPLC para a determinação da CTC a níveis residuais em músculo de suínos, que se baseia na conversão da CTC no seu derivado iso-CTC altamente fluorescente sob condições alcalinas. A detecção fluorimétrica do derivado isoclorotetraciclina ($\lambda_{exc} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm) foi realizada em tampão glicina a pH=12, de modo a melhorar a sensibilidade e especificidade do método. A OTC e TC não interferem no ensaio. A CTC é a única tetraciclina que forma um derivado fluorescente nas condições alcalinas descritas. As outras tetraciclinas requerem a quelação com íons metálicos, como por exemplo, alumínio ou magnésio.

Derivatização similar foi aplicada à análise da OTC e CTC em tecidos animais (22), e OTC em músculo de salmão (23). Agasoster e Rasmussen (23) descrevem um método sensível automatizado para o controlo de resíduos de OTC em músculo de salmão. Neste é utilizado um sistema HPLC com derivatização pós-coluna e detecção fluorimétrica. O derivado fluorescente é obtido através da irradiação da OTC em solução alcalina. Os espectros de excitação e de emissão do derivado apresenta máximos a 358 e 460 nm para a excitação e emissão, respectivamente.

Iwaki et al (14) apresentaram um método muito sensível para a determinação da OTC, TC e CTC por HPLC com detecção fluorimétrica ($\lambda_{exc} = 390$ nm, $\lambda_{em} = 512$ nm), aplicada a amostras de músculo de salmão prateado fortificadas. Este método baseia-se na adição à fase móvel de etilenodiaminatetracetato dissódico (EDTA) e cloreto de cálcio (CaCl_2) no sentido de aumentar a fluorescência. Os autores observaram um máximo de fluorescência para concentrações de EDTA e CaCl_2 de 25 e 35 mM respectivamente, e para um pH da fase móvel de 6,5.

Haagsma e Scherpenisse (24) referem um método por HPLC com detecção fluorimétrica para a determinação da OTC, TC, CTC e doxiciclina (DC) em tecidos animais incluindo, peixe e ovos a um nível inferior a 10 mg/kg. A detecção fluorimétrica foi efectuada após a adição pós-coluna de acetato de magnésio, no tampão de ácido bórico a pH=9, a um comprimento de onda de excitação de 385 nm e a um comprimento de onda de emissão de 500 nm.

Em 1995, foi descrito um método para a determinação simultânea da OTC, TC e CTC em amostras de fígado, rim e músculo, por HPLC utilizando derivatização pós-coluna com íons alumínio a 60°C. Formam-se, deste modo, complexos tetraciclina-alumínio, altamente fluorescentes, que são detectados por fluorescência. O detector é estabelecido a um $\lambda_{exc} = 390$ nm e a um $\lambda_{em} = 490$ nm (25).

PENICILINAS

Obtemos uma maior sensibilidade e especificidade na detecção das penicilinas através da sua derivatização e detecção fluorimétrica. A detecção no U.V. a 200-300 nm está sujeita a interferências endógenas do leite e carnes, que absorvem no mesmo comprimento de onda (26).

Um dos processos de derivatização, envolve no seu primeiro passo a hidrólise do anel β -lactâmico pela penicilase em hidróxido de sódio, devido à degradação da penicilina. O ácido penicilóico reage com o cloreto de mercúrio formando o penilaldeído, que pode reagir com a dansilhidrazina dando origem a produtos fluorescentes (26).

Este método foi aplicado a 8 penicilinas neutras no leite. Munns et al (27) submeteram uma amostra de leite a uma hidrólise enzimática inicial, de modo a facilitar a diferenciação do material interferente através da formação de um peniciloato a partir da cadeia β -lactâmica da penicilina correspondente. As espécies aldeídicas terminais são formadas subsequentemente com cloreto de mercúrio II, e depois o peniciloaldeído é extraído com diclorometano. A determinação é feita por HPLC de fase inversa, sendo a detecção melhorada através da derivatização com dansilhidrazina, de modo a tornar o peniciloato fluorescente ($\lambda_{exc} = 254$ nm, $\lambda_{em} = 500$ nm). A aplicação deste método é limitada para o grupo isoxazolilo (oxaciclina, cloxaciclina e dicloxaciclina), uma vez que estas são só parcialmente hidrolizadas pela penicilase, mesmo a temperaturas elevadas.

Tsuji et al (28) descreveram um método fluorimétrico sensível para a análise simultânea da penicilina e do produto de biotransformação, o ácido penicilóico. Este método é baseado na formação de uma base de Schiff fluorescente, resultante da reacção entre a dansilhidrazina e o penilaldeído, os quais podem ser produzidos a partir da reacção do ácido penicilóico e o cloreto de mercúrio em meio ácido ($\lambda_{exc} = 320$ nm, $\lambda_{em} = 510$ nm).

Existem vários métodos de determinação fluorimétrica das aminopenicilinas (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36).

Penicilinas com um grupo amino primário na cadeia lateral podem ser derivatizadas com fluorescamina (37) e são determinadas fluorimetricamente após oxidação electroquímica pós-coluna "on-line" (38).

Para a detecção por fluorescência, outras penicilinas foram derivatizadas com a 9-fluorenilmetil- cloroformato (39), com o-ftalaldeído (40) ou com o 7-fluoro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazole (NBD) (41).

Kusnir et al (42) prepararam e purificaram um derivado fluorescente da ampicilina por reacção com a fluorescamina.

Rogers et al (40) verificaram que a reacção de derivatização pós-coluna com o orto-ftalaldeído pode ser aplicada a antibióticos β -lactâmicos contendo uma função amina primária. A detecção foi efectuada a um $\lambda_{exc} = 350$ nm e a um $\lambda_{em} = 450$ nm.

A utilização do 4-bromometil-7-metoxicumarina (BrMMC) como reagente de fluorescência permite a detecção e quantificação das penicilinas a um nível de concentração da ordem dos picogramas (46). A selectividade e sensibilidade deste tipo de derivatização é demonstrada pela análise de amostras de leite fortificadas a 10 mg/Kg. Uma vantagem posterior é que os derivados possuem melhor retenção nas colunas C_{18} , sendo possível a separação das penicilinas sem a necessidade de recorrer a um sistema de gradiente e a um pH óptimo para a sua estabilidade.

Posteriormente, Labelle et al (43) mostraram que a estrutura dos produtos de degradação fluorescentes utilizados em alguns procedimentos fluorimétricos, possuía um anel pirazina como unidade estrutural comum.

Em 1974, Miyazaki et al (30) referem a determinação quantitativa da amoxicilina e do seu metabolito o ácido penicilóico. O ácido penicilóico da amoxicilina forma um produto fluorescente intenso e reprodutível, em soluções contendo cloreto de mercúrico ($\lambda_{exc} = 345 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$).

Em 1983, Miyazaki et al (44) desenvolveram um método sensível e reprodutível de determinação da amoxicilina e da ampicilina por HPLC, baseado na estrutura comum dos produtos de degradação. A determinação fluorimétrica para a ampicilina foi efectuada a um $\lambda_{exc} = 345 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$, e para amoxicilina a um $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$ e a um $\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$.

A ampicilina foi também determinada fluorimetricamente após a sua degradação com hipoclorito de sódio (45).

A ampicilina forma um produto de cor amarela que apresenta fluorescência intensa em solução ácida, após a hidrólise a temperaturas elevadas, como foi referido por Jusko em 1971 (19). A adição de formaldeído aumenta a reacção por redução das propriedades básicas do grupo amino. Em solução alcalina, o composto fluorescente apresenta máximos incorrectos de excitação e de emissão a 346 nm e 422 nm respectivamente. O autor sugere um procedimento baseado nestas observações, podendo ser detectadas concentrações inferiores a 0,005 mg/mL de ampicilina e/ou ácido a-aminobenzilpeniciloico. De acordo com o autor, o grupo aminobenzilo e a clivagem do anel b-lactâmico são necessários para a formação do produto fluorescente.

Os métodos fluorimétricos desenvolvidos para a ampicilina (30) e amoxicilina (33) são essencialmente sensíveis para as a-aminopenicilinas, e não são aplicáveis a muitas outras penicilinas.

AMINOGLICÓSIDOS

Nos últimos anos, a cromatografia líquida tem sido extensamente utilizada como método de eleição para a determinação de resíduos de antibióticos aminoglicósidos em leites e tecidos animais (47).

Os antibióticos aminoglicósidos foram determinados por HPLC com detecção fluorimétrica após derivatização com fluorescamina (48).

Shaik (49) desenvolveu um método exacto, sensível e rápido para a detecção fluorimétrica da neomicina no leite. As condições cromatográficas reportadas anteriormente para a determinação da neomicina em tecidos animais (50), foram aplicadas à determinação da neomicina no leite. Este método apresenta excelentes limites de detecção e percentagens de recuperação. A neomicina foi determinada por HPLC com detecção fluorimétrica ($\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$) após derivatização pós-coluna com orto-ftalaldeído. Obteve-se uma percentagem de recuperação da neomicina de 94% para o leite fortificado a 0,15-5 mg/L. O método foi utilizado para detectar a neomicina em leite de vacas doseadas por via intramuscular com neomicina (10 mg/Kg). As concentrações da neomicina foram de 0,2 mg/mL respectivamente.

Agarwall efectuou uma derivatização pré-coluna com orto-ftalaldeído (OPA) para a determinação da gentamicina no tecido muscular de vaca (51) e no leite (52), e para a determinação da neomicina no leite (53). A análise por cromatografia líquida foi efectuada numa coluna de fase inversa com detecção fluorimétrica ($\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 418 \text{ nm}$). Para a gentamicina efectuou uma derivatização "on-column" com OPA em cartuchas de sílica Sep-Pak. O limite de detecção obtido para a gentamicina, quer no tecido muscular quer no leite foi de 0,2 mg/mL. Para isolar a neomicina no leite foi usada uma resina de troca iónica Amberlite CG-50, seguida de derivatização "on-column" com OPA. As recuperações variaram entre 94 e 102 % em amostras fortificado entre 0,1 e 0,5 mg/L, e obteve-se um limite de detecção de 50 mg/mL.

Okayama et al (47) referem a determinação por HPLC da estreptomicina utilizando a ninhidrina como reagente de derivatização pós-coluna e detecção fluorimétrica. O método foi aplicado a amostras de carne de frango, tendo-se obtido recuperações de 67% para o nível de fortificação de 2 mg/Kg.

Gerhardt et al (54) desenvolveram um método de determinação da estreptomicina e dihidroestreptomicina em músculo de bovinos e suínos, e rim por cromatografia líquida com detecção fluorimétrica após derivatização pós-coluna com 1,2-naftoquinona-4-ácido sulfónico a um ($\lambda_{exc} = 347 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 418 \text{ nm}$). Os limites de detecção obtidos foram de 10 e 20 mg/Kg para a estreptomicina e dihidroestreptomicina respectivamente.

Este método foi aplicado ao leite (55). As amostras foram extraídas com ácido perclórico a 3,6 %, e a estreptomicina e dihidroestreptomicina foram detectados por fluorescência após derivatização pós-coluna com 1,2-naftoquinona-4-ácido sulfónico. Obtiveram-se limites de detecção de 10 mg/Kg para a estreptomicina e 20 mg/Kg dihidroestreptomicina. Este reagente de derivatização reage com os compostos guanidina em solução alcalina produzindo produtos

altamente fluorescentes, como a estreptomicina, que contem 2 grupos guanidina e forma compostos fluorescentes (56).

SULFONAMIDAS

As interferências observadas nas matrizes biológicas na detecção das sulfonamidas no U.V. a 280 nm, exigem uma detecção mais específica (57).

A detecção fluorimétrica reduz os níveis de “background” e é mais específica para as sulfonamidas resultando num aumento de sensibilidade (47).

Apenas algumas sulfonamidas apresentam fluorescência nativa (58), deste modo, só se pode obter detecção específica por fluorescência após derivatização. Para as sulfonamidas, a função amina primária é o alvo das reacções de derivatização (59).

Aerts et al (57) procederam à derivatização pós-coluna das sulfonamidas com p-dimetilaminobenzaldeído, e detecção fluorimétrica em amostras de carne, leite e ovos. Verificaram que este procedimento devido à sua especificidade permitia eliminar as interferências e aumentar a resposta cerca de 1,5 vezes, permitindo a determinação de resíduos na ordem dos 5-20 mg/kg, com adequada sensibilidade.

Petz (58) apresenta um método por HPLC para a análise selectiva de sulfaguanidina e sulfanilamina em tecidos animais (músculo e fígado), ovos e leite a níveis de 0,01-0,1 mg/Kg. A sulfaguanidina e sulfanilamina foram detectadas pela sua fluorescência nativa (λ_{exc} = 275 nm e λ_{em} = 340 nm). As recuperações de amostras fortificadas a 0,1 mg/Kg foi de 80% para a sulfanilamina e de 62% sulfaguanidina. Foram detectadas concentrações de 0,27 mg/Kg para a sulfanilamina e 0,05 mg/Kg para a sulfaguanidina no tecido muscular de suínos aos quais foi administrada uma injeção intramuscular de 2,1 g de sulfanilamina e 0,6 g de sulfaguanidina, e sacrificados 24 horas após.

Sista et al (60) descrevem um método por HPLC com derivatização pós-coluna com fluorescamina para a derivatização da sulfapiridina. Este é um muito específico mas pouco sensível, só se detectam concentrações de sulfonamidas superiores a 100 mg/Kg. Outro factor negativo é o elevado preço da fluorescamina.

CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) constitui o método de eleição mais extensamente utilizado na identificação e quantificação de resíduos de antibióticos em alimentos, a nível dos limites máximos recomendados (LMR).

Entre os vários modos de detecção disponíveis, a detecção fluorimétrica proporciona um maior grau de sensibilidade e especificidade, reduzindo os efeitos das interferências presentes neste tipo de matriz.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Conferência proferida pelo Professor Doutor Benito del Castillo em 18/07/1991 na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra subordinada ao tema "Análise de medicamentos por derivatização fluorimétrica".
- (2) NOLLET L. M. L. In: *Food Analysis by HPLC* (1992) PP. 463, Marcel Dekker Inc. New York.
- (3) MOATS, W. A.: *JAOAC* (1990), **73**:343.
- (4) BOBBIT, D. R. & NG, K. W.: *J Chromat* (1992), **624**:153.
- (5) KOHN, K. W.: *Anal Chem* (1961), **33**:862.
- (6) IBSEN, K. H., SAUNDERS, R. L. & URIST, M. R.: *Anal Biochem* (1963), **5**:505.
- (7) HALL, D.: *J Pharm Pharmacol* (1976), **28**:420.
- (8) HAASGMA, N. & SCHERPENISSE, P.: "Proceedings of the Euroresidue II", Conference Veldhoven, Netherlands, Haagsma N., Ruiter A., Czedik-Eysenberg (1993), 342.
- (9) POIGER, H. & SCHLATER, C.: *Analyst* (1976), **101**:808.
- (10) HIRSCHY, L. M. e DOSE, E.V. : *Anal Chim Acta* (1983), **147**:311.
- (11) AHMED, B. M. & JEE, R. D.: *Anal Chim Acta* (1984), **156**:263.
- (12) STEPHENS, C. R., MURAI, K., BRUNNINGS, K. J. and WOODMARD, R. B.: *J Am Chem Soc* (1956), **78**:4155.
- (13) BHATT, V. K. & JEE, R. D.: *Anal Chim Acta* (1985), **167**:233.
- (14) IWAKI, K., OKAMURAN & AMAZAKI, M.: *J Chromat* (1992), **623**:153.
- (15) BARKER, S. A. & WALKER, C. C.: *J Chromat* (1992), **624**:195.
- (16) MOATS, W. A.: *J Chromat* (1986), **366**:69.
- (17) SHARMA, J. P. & BEVILL, R. F.: *J Chromat* (1978), **166**:213.
- (18) KNOX, J. H. & JURAND, J.: *J Chromat* (1975), **110**:103.
- (19) MOATS, W. A.: *J Chromat* (1986), **358**:253.
- (20) HAYES, J. E. Jr & DUBUY, H. G.: *Anal Biochem* (1964), **7**:322.
- (21) BLANCHFLOWER, W. J., Mc CRACKEN, R. J. & RICE, D. A.: *Analyst* (1989), **114**:421.
- (22) HORU, S.: *J Liq Chromat* (1994), **17**:213 .
- (23) AGASOSTER, T. & RASMUSSEN, K. E.: *J Pharm Biomed Anal* (1995), **10**:349.
- (24) HAAGSMA, N. & SCHERPENISSE, P.: "Proceedings of the Euroresidue II", Conference, Veldhoven, ed. Haagsma, N. & Ruiter, A. (1993), 342.
- (25) Mc CRACKEN, R. J., BLANCHFLOWER, W. J., JOHN, W., HAGGAN, S. A. & KENNEDY, D. G.: *Analyst* (1995), **120**:1763.
- (26) PETZ, M.: "Analysis of antibiotic drug residues in food products of animal origin", Vipin K. agarwall, Plenum Press (1994), 153.
- (27) MUNNS, R., SHINODA, W., ROYBAL, J. E. & VIEIRA, C.: *JAOAC* (1985), **68**:968.
- (28) TSUJI, A., MIYAMOTO, E. & YAMANA, T.: *J Pharm Pharmacol* (1978), **30**:811.
- (29) JUSKO, W. J.: *J Pharm Sci* (1971), **60**, 728.
- (30) MIYAZAKI, K., OGINO, O. & ARITA, T.: *Chem Pharm Bull* (1974), **22**:1910.
- (31) MIYAZAKI, K., OGINO O., NAKANO, M. & ARITA, T.: *Chem Pharm Bull* (1975), **23**:178.
- (32) DAVIDSON, D. F.: *Clin Chim Acta* (1976), **69**:67.

- (33) MIYAZAKI, K., OGINO, O., SATO, H., NAKANO, M. & ARITA, T.: *Chem Pharm Bull* (1977), **25**:253.
- (34) BARBHAYA, R. H., TURNER, P. & SHAW, E.: *Clin Chim Acta* (1977), **77**:373.
- (35) HEALD, A. F., ITA, C. E. & SCHREIBER, E. C.: *J Pharm Sci* (1976), **65**:768.
- (36) BARBHAYA, R. H., TURNER, P.: *J Pharm Pharmacol* (1976), **28**:791.
- (37) CARLQUIST, J. & WESTERLUND, D.: *J Chromat* (1985), **344**:285.
- (38) MASCHER, H. & KIKUTA, C.: *J Chromat* (1990), **506**:417.
- (39) SHAH, A. J. & ADLARD, M. W.: *J Chromat* (1988), **424**:325.
- (40) ROGERS, M. E., ADLARD, M. W., SAUNDERS, G. & HOLT, G.: *J Chromat* (1984), **297**:385.
- (41) IWAKI, K. & OKUMURA, N.: *J Chromat* (1990), **504**:359.
- (42) KUSNHIR, J., ADAMEOVÁ, V. & BARNA, K.: *Drug Res* (1978), **28**:2058.
- (43) LABELLE, M. J., VILIM, A., WILSON, W. L.: *J Pharm Pharmacol* (1979), **31**:441.
- (44) MIYAZAKI, K., OHTANI, K., SUNADA, K. & ARITA, T.: *J Chromat* (1983), **276**:478.
- (45) HAGINATA, J., WAKAI, J., YASUDA, H., UNO, T., TAKAHASHI, K. & KATAGI, T.: *J Chromat* (1987), **400**:101.
- (46) BERGER, K. & PETZ, M.: *Dtsch Lebensm Rundsch* (1991), **87**:137.
- (47) SAIKH, B. & MOATS, W. A.: *J Chromat* (1993), **643**:369.
- (48) SCHULMAN, S. G. IN: "Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications: Part1", John Wiley & Sons, New York (1985), 48.
- (49) SAIKH, B. & JACKSON, J.: *J Liq Chromat* (1989), **12**:1497.
- (50) SAIKH, B., ALLEN, E. H. & GRIDLEY, J. C.: *JAOAC* (1985), **68**:29.
- (51) AGARWALL, V. K.: *J Liq Chromat* (1989), **12**:613.
- (52) AGARWALL, V. K.: *J Liq Chromat* (1989), **12**:3265.
- (53) AGARWALL, V. K.: *J Liq Chromat* (1990), **13**:2475.
- (54) GERHARDT, G., SALISBURY, C. D. C. & MAC NEIL, J. D.: *JAOAC Int* (1994), **77**:334.
- (55) GERHARDT, G., SALISBURY, C. D. C. & MAC NEIL, J. D.: *JAOAC Int* (1994), **77**:765.
- (56) KUBO, H., KOBAYASHI, Y. & KINOSHITA, T.: *Anal Chem* (1986), **58**:2653.
- (57) AERTS, M. M. L., BEEK W. M. J. & BRINKMAN, U. A.: *J Chromat* (1988), **435**:97.
- (58) PETZ, M.: *J Chromat* (1987), **273**, 464.
- (59) STRINGHAM, R. W., MUNDELL, E. C. & SMALLIDGE, R. L.: *JAOAC* (1982), **65**:823.
- (60) SISTA, H. S., DYE, D. M. & LEONARD, J.: *J Chromat* (1983), **273**:464.