

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für ökologische Chemie, Berlin-Dahlem

Extraktion, Clean-up und HPLC-Bestimmung von Streptomycin in Apfel-, Honig- und Nektarproben. – Erste Ergebnisse aus Freilandversuchen

Extraction, clean-up and HPLC-determination of streptomycin in apple, honey and nectar – First results from field experiments

Von Dagmar Klementz und Wilfried Pestemer

Zusammenfassung

Eine empfindliche Methode zum Nachweis von Streptomycin (AS) in Apfel-, Honig- und Nektarproben wurde entwickelt. Der Nachweis erfolgte mittels HPLC/Fluoreszenzdetektion und einer Nachsäulenderivatisierung. Die untere Grenze des praktischen Arbeitsbereiches (Bestimmungsgrenze) liegt für alle Proben bei 0,05 mg Wirkstoff/kg. Erste Ergebnisse aus Freilandversuchen zeigen, daß nur am Behandlungstag selbst meßbare Rückstände auf/in Äpfeln nachweisbar waren. Bereits 14 Tage nach der letzten Behandlung lagen die Streptomycin-Gehalte unterhalb der Nachweisgrenze von 0,02 mg AS/kg Apfel. Bei einem gezielten Einsatz von Plantomycin im Obstbau ließen sich nur in Einzelfällen Spuren von Streptomycin im Nektar und im Honig nachweisen.

Stichwörter: Analytik, Rückstände, HPLC, Antibiotika, Streptomycin, Obstbau, Apfel, Honig, Nektar

Abstract

A sensitive HPLC method for the determination of streptomycin (a.i.) in apple, honey and nectar is described. The measurement is performed by fluorescence detection and post-column derivatization. The routine limit of determination (quantitation limit) is 0.05 mg a.i./kg for the investigated substrates. First results from field experiments indicate detectable residues on/in apples only directly after application. Already 14 days after application the residues of streptomycin amount to less than 0.02 mg a.i./kg (detection limit); whereas residues of streptomycin in nectar and honey samples could be found only in traces in some isolated cases.

Key words: analysis, residues, HPLC, antibiotics, streptomycin, orchard, apple, honey, nectar

Einleitung

Streptomycin (Präparat: Plantomycin) kommt als Sesquisulfat zur Bekämpfung von *Erwinia amylovora* (Feuerbrand) im Kernobst und einigen verwandten Gehölzen aus der Familie der Rosaceen zur Anwendung (ZELLER, 1993), obwohl in Deutschland z. Z. keine Zulassung von Plantomycin vorliegt. Es wurden aber in der Vergangenheit von der Biologischen Bundesanstalt Ausnahmegenehmigungen für die Anwendung streptomycinhaltiger Pflanzenschutzmittel zur Bekämpfung des Feuerbrandes erteilt.

Da sowohl für Honig als auch für Kern- und Steinobst mit eventuell vorhandenen Streptomycin-Rückständen z. Z. noch keine bestimmte Höchstmenge ausgewiesen ist, sind diese gemäß § 14

Abs. 1 Nr. 2 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes in Verbindung mit § 1 Abs. 4 Nr. 2a der Rückstands-Höchstmengenverordnung zu beurteilen. Solche Lebensmittel dürfen z. Z. nicht in den Verkehr gebracht werden, wenn die Streptomycin-Rückstände höher als 0,01 mg/kg sind.

In Zusammenarbeit mit der Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz in Mainz und der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau in Freising wurden Freilandversuche zur Erstellung von Streptomycin-Abbaureihen auf/in Äpfeln gemäß BBA-Richtlinie für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren (Teil IV, 3–3, Prüfung des Rückstandsverhaltens – Allgemeine Hinweise zur Planung, Anlage und Durchführung von Rückstandsversuchen) im April 1995 angelegt.

Unter der Leitung des Institutes für Obstbau der Biologischen Bundesanstalt in Dossenheim wurden im Versuchsjahr 1995 an vier verschiedenen Standorten Freilandversuche zum Nachweis eines eventuellen Eintrags von Streptomycin in Honig- und Nektarproben durchgeführt.

Über eine Methode zur analytischen Bestimmung des Wirkstoffes sowie die mit dieser Methode erhaltenen Rückstandswerte wird im Folgenden berichtet.

Literaturübersicht zum analytischen Nachweis von Streptomycin

Streptomycin gehört wie auch Gentamycin und Neomycin zu der Gruppe der Aminoglycosid-Antibiotika. Die chemischen Strukturen der einzelnen Antibiotika dieser Gruppe weichen jedoch relativ stark voneinander ab.

Die Bestimmung von Streptomycin ist in der Literatur mehrfach beschrieben. In den meisten dieser Arbeiten erfolgt die Detektion des Wirkstoffes mittels HPLC. So beschreiben GERHARDT et al. (1994a), KUROSAWA et al. (1985) sowie WHALL (1981) die Bestimmung von Streptomycin mittels Anreicherungs säulen- und Nachsäulenderivatisierungstechnik und Fluoreszenzdetektion. Aufgrund der ionischen Form und der kaum fluoreszierenden Eigenschaft des Wirkstoffes müssen im HPLC-System ein Ionenaustausch und eine Nachsäulenderivatisierung stattfinden. Der Ionenaustausch erfolgt nach GERHARDT et al. (1994b) und KUBO et al. (1986) mit Natriumhydrogensulfonat bzw. mit verschiedenen Ethan- und Octansulfonaten.

USLEBER et al. (1995) beschreiben ein Analyseverfahren zum Nachweis von Streptomycin in Honig mittels Enzymimmunoassay. Streptomycin wurde von SLIMPSON und KOBOS (1983) potentiometrisch

Tab. 1. Ausgewählte Literaturstellen zur Analytik von Streptomycin und Nachweisgrenzen

Literaturstelle	Nachweismethode	Matrix	Nachweisgrenze
BOSSUYT et al., 1976	DC	Milch	3 ng/ μ l*
SALISBURY et al., 1989	DC	Tiergewebe	75–100 mg/kg Std. 0,67 mg/kg
KUROSAWA et al., 1985	HPLC/UV	Serum	2 mg/l
WHALL, 1981	HPLC/FD	keine	2 ng/ μ l*
GERHARDT et al., 1994a	HPLC/FD	Milch	10 μ g/l
GERHARDT et al., 1994b	HPLC/FD	Tiergewebe	10 μ g/kg
KUBO et al., 1986	HPLC/FD	Serum	0,5 mg/l
YONEDA et al., 1981	DC	Medikamente	1 mg/kg
MARUYAMA et al., 1985	DC	Milch	0,1 mg/l
USLEBER et al., 1995	ELISA	Honig	0,03 mg/kg

* = Angabe als minimal detektierbare Menge (MDQ)

trisch und von INCHAUSPE und SAMAIN (1984) mit Hilfe eines Brechungsindex-Detektors (RID) bestimmt.

Die in der Literatur meist zu findenden Substrate, in denen Streptomycin bestimmt wurde, sowie die Nachweisgrenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Bei den aufgeführten Literaturangaben zeigt sich, daß in keinem Fall die geforderte Bestimmungsgrenze von 0,01 mg/kg erreicht wird. Am Institut für ökologische Chemie der Biologischen Bundesanstalt wurde im Jahr 1995, basierend auf den zitierten Methoden, eine empfindliche Methode zum quantitativen Nachweis von Streptomycin entwickelt.

Material und Methoden

Entwicklung einer empfindlichen Methode zum Nachweis von Streptomycin in Apfel-, Honig- und Nektarproben

In der Tabelle 2 werden physikalisch-chemische Angaben und weitere Eigenschaften von Streptomycin aufgeführt.

Prinzip der Nachweismethode

Von einer Apfel-, Honig- bzw. Nektarprobe wird ein Extrakt gewonnen, in dem nach Reinigung mittels Ionenaustauschersäule und Festphasenextraktion die Bestimmung von Streptomycin unter Verwendung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und einer Nachsäulenderivatisierung erfolgt.

Tab. 2. Angaben zum Wirkstoff

Wirkstoffname	Streptomycinsulfat
Herkunft der Charge	Merck, Darmstadt
Chargen-Nummer	K 18394517
Chemische Bezeichnung des Wirkstoffes (IUPAC)	O-2-deoxy-2-methylamino- α -L-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-5-deoxy-3-C-formyl- α -L-lyxofuranosyl-(1 \rightarrow 4)-N ³ , N ⁹ -diamidino-D-streptamine
Chemische Formel	C ₄₂ H ₈₄ N ₁₄ O ₃₆ S ₃
CAS-Nummer	57-92-1
Molare Masse	1457,39 g/mol
Physikalisch-chemische Beschaffenheit	schwach weißes Pulver
pH-Wert (25%ige Lösung)	5,9
Löslichkeit (28 °C)	20 g/l in Wasser; 0,85 g/l in Methanol; 0,3 g/l in Ethanol
Stabilität	keine Zersetzung bei sachgerechter Lagerung
Lagerbedingungen	kühl lagern
Sicherheitshinweise	kein Gefahrstoff bzw. keine gefährliche Zubereitung nach der Gefahrstoffverordnung
LD ₅₀ (Ratte, oral)	> 10 000 mg/kg

Geräte:

- Vakuumeinheit: Baker, SPE-12G, Prod.-Nr.: 7018-94
- Zentrifuge: Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge RC-5C, Sorvall Instruments, Du Pont de Nemours, GSA-Rotor
- Magnetrührwerk: IKAMAG REO
- pH-Meßgerät: pH-Meter CG 810, Schott
- HPLC-System mit Fluoreszenzdetektor, Gynkotek

Material:

- Kartuschen: Bakerbond, SPE Octadecyl (C18) 500 mg
- Trockenrohr: gefüllt in der Reihenfolge von unten nach oben: Quarzwatte, Papierfilter, Aktivkohle, Papierfilter, Quarzwatte, Calciumchlorid
- Austauschersäule: Volumen = 18,5 ml, mit ca. 1 cm Quarzwatte als Filter (nur bei Honig- und Nektarproben verwendet)
- Zentrifugengefäße, Bechergläser, Glasstäbe, Magnetrührer, graduierte Meßzylinder, Tropftrichter

Reagenzien:

- Ionenaustauscher-Harz III (stark basischer Anionenaustauscher), Merck
- Methanol p. a., Riedel-de Haën
- Aqua bidest.
- Acetonitril Chromasolv®, Riedel-de Haën
- Natriumhexansulfonat, mindest. 98 %, Sigma
- Trinatriumphosphat, mindest. 99 %, Merck
- Natrium-1,2-naphthoquinone-4-sulfonat, mindest. 99 %, Sigma
- Natriumhydroxid, mindest. 99 %, Merck
- o-Phosphorsäure, reinst, mindest. 89 %, Merck
- Essigsäure, p. a., 99,8 %, Riedel-de Haën
- Aktivkohle, p. a., Merck
- Calciumchlorid, rein, Merck

Extraktion und Reinigung der Apfelproben

- ca. 30 g zerkleinerte Apfelprobe einwiegen, mit 60 ml Extraktionspuffer (50 mmol/l Natriumhexansulfonat, 25 mmol/l Trinatriumphosphat mit o-Phosphorsäure auf pH 2,0 eingestellt) versetzen und auf pH 2,0 mit o-Phosphorsäure einstellen
- Proben zentrifugieren (0 °C/12 000 RPM/30 min.)
- Zentrifugat auf die mit Methanol und Aqua bidest. konditionierte Kartusche geben
- 2 h mit Trockenrohr und Vakuum (ca. 400 mbar) trocknen
- Elution mit 1,5 ml Methanol

Extraktion und Reinigung der Honig- und Nektarproben

- ca. 30 g Honig bzw. Nektar in einem Becherglas in 50 ml Aqua bidest. vollständig lösen (erst mit Glasstab, dann mittels Magnetrührwerk)
- Lösung in einen Tropftrichter (mit Trichter und Quarzwatte) überführen und das Becherglas mit ca. 10 ml Aqua bidest. spülen
- Lösung auf die frisch vorbereitete Ionenaustauscher-Säule (Harz neutral waschen) tropfen lassen, Tropfgeschwindigkeit ca. 1 ml/min
- gereinigte Probenlösung in einem graduierten Meßzylinder auffangen und das Volumen bestimmen
- Probenlösung in ein Zentrifugengefäß überführen, mit den – je nach Probenvolumen entsprechenden – Mengen an Trinatriumphosphat (25 mmol/l) und Natriumhexansulfonat (50 mmol/l) versetzen und mit o-Phosphorsäure auf pH = 2,0 einstellen
- Proben zentrifugieren (1 °C/12 000 RPM/30 min.)
- Zentrifugat auf die mit Methanol und Aqua bidest. konditionierte Kartusche geben
- 2 h mit Trockenrohr und Vakuum (ca. 400 mbar) trocknen
- Elution mit 1,5 ml Methanol

Bestimmung von Streptomycin mittels HPLC*Geräte- und Arbeitsparameter*

Pumpe:	Gynkotec Niederdruckpumpe, M 480G
Autosampler:	Gynkotec, Gina 50
Degasser:	Gynkotec, GT 103
Säulenofen:	Gynkotec, Säulenthermostat STH 585A
Auswertesoftware:	Gynkosoftware Version 5.32
Detektoren:	FD bei λ (Ex) = 365 nm, λ (Em) = 418 nm
Säule:	UltraSep RP18, 5 μ m, 125 \times 3 mm
Eluent:	Wasser/Acetonitril = 83:17-Gemisch Das Wasser enthält als Ionenaustauscherreagenz 5 mmol Natriumhexansulfonat und 0,2 mmol Natrium-1,2-naphthoquinon-4-sulfonat

Nachsäulenreagenz:	0,5 M NaOH – über eine Mischkammer dosiert
Reaktionsschleifenlänge:	ca. 4 m (Edelstahl)
Flußrate:	1 ml/min
Flußrate d. Base:	0,1 ml/min
Einspritzvolumen:	50 μ l
Retentionszeit:	zwischen 3,1 und 5,1 min (matrixabhängig)
Minimal detektierbare Menge:	1 ng/ μ l

Auswertemethodik

Integration:	über die Peakfläche
Auswertung:	absolut
Kalibrierungstyp:	bracketed Calibration
Linearitätsbestimmung:	5 Eichpunkte
Konzentrationen:	1; 3; 10; 20 und 30 ng/ μ l
Kalibriersystem:	Einpunktkalibrierung

Validierung der Methode

Zur Validierung der Methode wurden zahlreiche Zusatzversuche im Bereich von 0,05 mg/kg bis 1,67 mg AS/kg Apfel durchgeführt. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 56,6 % und 100,2 %, bei einer absoluten Standardabweichung < 10 % (Tab. 3).

Tab. 3. Wiederfindungsraten sowie absolute und relative Standardabweichungen bei Wiederfindungsversuchen von Streptomycin auf/in Äpfeln

Einwaage (g)	Zusatz (mg/kg)	Anzahl n	Wiederfindung (%)	Standardabweichung abs. (%)	rel. (%)
30	1,67	4	82,2	8,0	9,8
30	0,83	4	88,6	8,2	9,3
30	0,33	4	79,1	6,3	8,0
30	0,1	4	56,6	4,3	7,5
30	0,05	4	100,2	9,3	9,2

Die Wiederfindungsversuche mit Zusätzen von 0,1 mg/kg bis 1,67 mg/kg wurden im September und Oktober 1995 durchgeführt. Die Aufarbeitung der mit einem Zusatz von 0,05 mg/kg dotierten Äpfel wurde hingegen im Januar 1996 durchgeführt. Verbesserte Wiederfindungsergebnisse (bei 0,1 mg/kg 56,6 %; bei 0,05 mg/kg 100,2 %) zeigen, daß im Laufe der Zeit viele Erfahrungen mit der Methode gesammelt wurden. Diese Erfahrungen spiegeln sich in den Ergebnissen wider.

Für die Matrix Honig wurden Methodenvalidierungsversuche im Bereich von 0,05 mg/kg bis 5,0 mg AS/kg Honig durchgeführt. Die

Tab. 4. Wiederfindungsraten sowie absolute und relative Standardabweichungen bei Wiederfindungsversuchen von Streptomycin in Honig

Einwaage (g)	Zusatz (mg/kg)	Anzahl n	Wiederfindung (%)	Standardabweichung abs. (%)	rel. (%)
10	5,0	4	98,5	18,5	18,8
20	2,5	4	87,9	10,5	11,9
30	0,83	2	82,7	6,2	7,4
30	0,33	4	105,6	17,9	16,9
30	0,33 (*)	4	94,5	8,7	9,3
30	0,1 (*)	4	97,7	8,2	8,4
30	0,05 (*)	4	102,5	6,5	6,4

(*) mit Ionenaustauschersäule

Wiederfindungsraten lagen zwischen 82,7 % und 105,6 %; bei einer absoluten Standardabweichung < 20 % (Tab. 4).

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die untere Grenze des praktischen Arbeitsbereiches (Bestimmungsgrenze) ist mit 0,05 mg AS/kg Apfel und die Nachweisgrenze mit 0,02 mg AS/kg Apfel anzugeben.

Für die Matrix Honig bzw. Nektar ergibt sich eine untere Grenze des praktischen Arbeitsbereiches (Bestimmungsgrenze) von 0,05 mg AS/kg Honig bzw. Nektar und eine Nachweisgrenze von 0,03 mg AS/kg Honig bzw. Nektar.

Die minimal detektierbare Menge (MDQ) liegt bei einem Einspritzvolumen von 50 μ l bei 1 ng/ μ l.

Der z. Z. gültige Höchstmengenwert von 0,01 mg/kg kann mit der dargestellten Methode nicht überwacht werden. Nicht in allen, sehr unterschiedlichen Substraten (insbesondere Honigen) war es möglich, Gehalte dieser Größenordnung zu bestimmen. Bei künftigen Änderungen der Rückstands-Höchstmengenverordnung (RHmV, 1994) sollte die Höchstmenge daher nicht unterhalb von 0,05 mg Streptomycin/kg Substrat festgesetzt werden.

Durchführung der Versuche*Versuchsdurchführung zur Bestimmung von Streptomycin auf/in Äpfeln nach Anwendung von Plantomycin im Obstbau*

Die Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz in Mainz und die Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau in Freising führten im Versuchsjahr 1995 Freilandversuche zur Erstellung von insgesamt drei Streptomycin-Abbaureihen auf/in Äpfeln durch. Es wurden, um eine worst-case-Situation zu erhalten, fünf Applikationen (Beginn der Blüte, Hauptblüte, abgehende Blüte, 64 und 56 Tage vor der Ernte) durchgeführt. Die Wasseraufwandmenge pro Behandlung betrug 1000 l/ha (0,06 % Plantomycin). Die Probenahmen erfolgten gemäß den BBA-Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren (Teil IV, 3–3 und 3–8).

Versuchsdurchführung zur Bestimmung von Streptomycin in Honig- und Nektarproben nach Anwendung von Plantomycin im Obstbau

Die Versuche zur Untersuchung des Rückstandsgehaltes von Streptomycin in Honig- und Nektarproben nach gezielter Behandlung von Plantomycin im Obstbau wurden an vier verschiedenen Standorten (Dossenheim, Großsachsen, Augustenberg und Winden) durchgeführt. Die Wasseraufwandmenge pro Behandlung betrug 1100 l/ha (0,06 % Plantomycin). Es wurden im Frühjahr 1995 drei (am Standort Augustenberg zwei) Behandlungen an Apfelbäumen im Abstand von 2 bis 5 Tagen (am Standort Augustenberg zehntägiger Abstand) durchgeführt und jeweils nach der 1. Behandlung mehrere Ableger

von Bienenvölkern in diese Anlagen gestellt, von denen die Proben direkt entnommen wurden (worst-case-Situation). Die Probenahmen bei Nektar aus den einzelnen Völkern wurden 1 bis 3 Tage nach erfolgter Applikation durchgeführt. Die Honigproben wurden etwa einen Monat nach der ersten Applikation genommen.

Ergebnisse

Ergebnisse der Bestimmung von Streptomycin auf/in Äpfeln

In den Abbildungen 1, 2 und 3 sind die in den Apfelproben ermittelten Gehalte von Streptomycin zusammengestellt.

Ergebnisse der Bestimmung von Streptomycin in Honig- und Nektarproben

Die Streptomycin-Gehalte in den Honig- und Nektarproben von den drei Standorten Dossenheim, Großsachsen und Augustenberg lagen alle bis auf eine Nektarprobe aus Großsachsen unterhalb der Nachweisgrenze. Hingegen konnte im Honig vom Standort Winden ein Streptomycin-Gehalt von durchschnittlich 0,13 mg/kg bestimmt werden. Nektarproben waren von diesem Standort nicht gezogen worden. Es wurden stets 2 Laborproben bzw. bei Streptomycin-Gehalten oberhalb der Bestimmungsgrenze 4 Laborproben aufgearbeitet und untersucht.

Bewertung der Ergebnisse

Die aufgeführten Rückstandsgehalte auf/in Äpfeln (Abb. 1 bis 3) zeigen, daß nur am Tag der Behandlung meßbare Rückstände vorhanden waren. Streptomycin-Gehalte waren bei den Freisinger Äpfeln im Bereich von 0,06 mg/kg bis 0,10 mg/kg und bei den Mainzer Äpfeln der Sorte Gloster im Bereich von 0,06 mg/kg bis 0,13 mg/kg vorhanden. Die Rückstände auf/in Äpfeln der Sorte Jonagold aus Mainz lagen im Bereich von 0,02 mg/kg und 0,05 mg/kg Äpfel, also zwischen der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze. Damit sind sehr geringe Rückstände auf/in den Äpfeln gefunden worden.

Die Streptomycin-Gehalte in Honig- und Nektarproben zeigen, daß sich auch bei einem gezielten Einsatz (die Probenahmen von Nektar und Honig lassen sich den behandelten Flächen wegen der Blütenstetigkeit der Sammelbienen direkt zuordnen) nur in Einzelfällen Spuren von Streptomycin im Nektar nachweisen lassen. Nach Fermentierung des Nektars im Honigmagen der Bienen wurden in den Honigen nur vom Standort Winden meßbare Rückstände analysiert.

Da vom Standort Winden keine Nektarproben gezogen worden sind, können die vergleichsweise „hohen“ Streptomycin-Gehalte im Honig nicht weiter interpretiert werden.

Die Versuche zum Rückstandsverhalten von Streptomycin auf/in Äpfeln werden im Jahr 1996 weitergeführt. Unter der Leitung der

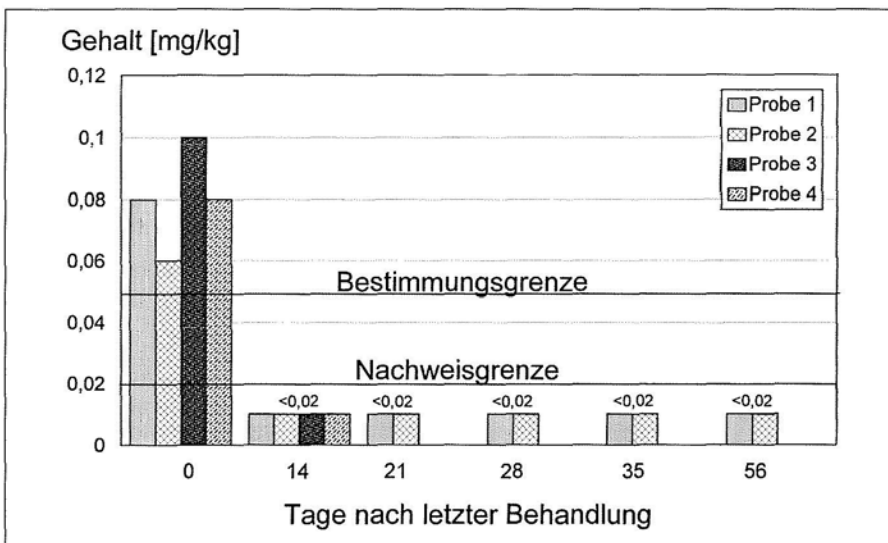


Abb. 1. Streptomycin-Gehalte auf/in Äpfeln der Freisinger Versuchsanlage.

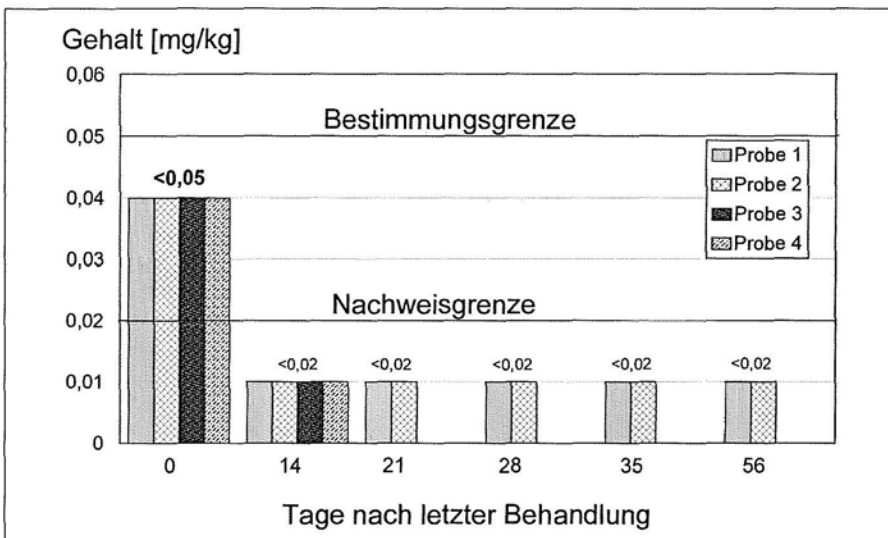
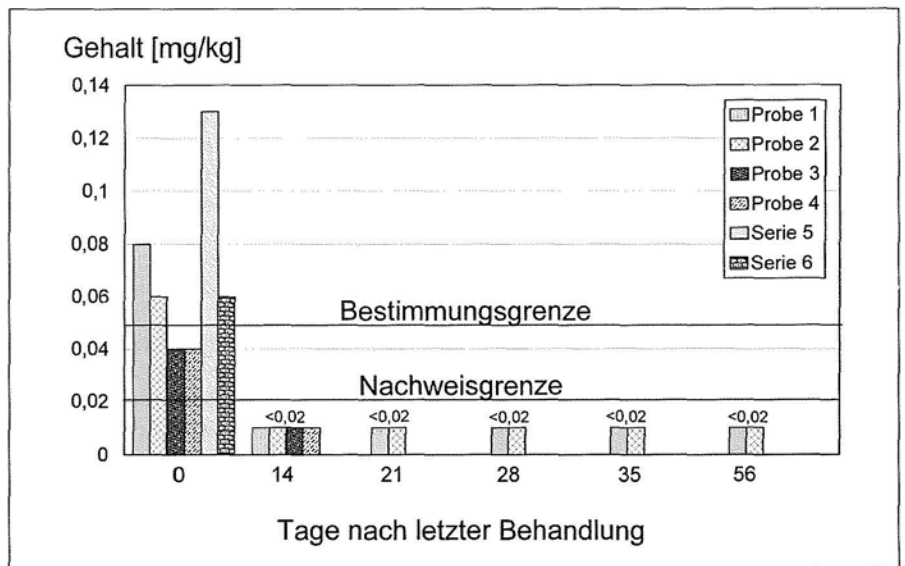


Abb. 2. Streptomycin-Gehalte auf/in Äpfeln der Mainzer Versuchsanlage (Sorte Jonagold).

Abb. 3. Streptomycin-Gehalte auf/in Äpfeln der Mainzer Versuchsanlage (Sorte Gloster).



Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz in Mainz, der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau in Freising und des Pflanzenschutzamtes in Frankfurt/Main werden fünf Freilandversuche angelegt und vom Institut für ökologische Chemie der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft die rückstandsanalytischen Untersuchungen durchgeführt.

Danksagung

Die Autoren danken allen, die durch ihre Mitarbeit diese Untersuchungen ermöglichten, insbesondere Herrn Dr. GÜNDEL aus Mainz, Herrn Dr. STECK aus Freising und Frau WETZEL aus Dossenheim für ihre kooperative Zusammenarbeit sowie Herrn Dr. KOSSMANN vom Institut für ökologische Chemie der Biologischen Bundesanstalt für wertvolle Diskussionen.

Besonders danken möchten wir Frau INGBORG BEHNISCH, Frau KERSTIN KEUNTJE und Frau BARBARA KYCLER, ebenfalls vom Institut für ökologische Chemie, für ihre ausgezeichneten chemisch-analytischen Arbeiten sowie für ihre engagierte und immer zuverlässige Assistenz.

Literatur

- BBA: Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren. Teil IV, 3–3, 1990. Prüfung des Rückstandsverhaltens – Allgemeine Hinweise zu Planung, Anlage und Durchführung von Rückstandsversuchen.
- BBA: Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren. Teil IV, 3–8, 1989. Prüfung des Rückstandsverhaltens – zu analysierende Erntegüter.
- BOSSUYT, R., R. V. RENTERGHEM and G. WAES, 1976: Identification of Antibiotic Residues in Milk by Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr.* **124** (1), 37–42.
- GERHARDT, G. C., C. D. C. SALISBURY and J. D. MACNEIL, 1994a: Analysis of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Milk by Liquid Chromatography. *J. AOAC* **77** (2), 334–337.
- GERHARDT, G. C., C. D. C. SALISBURY and J. D. MACNEIL, 1994b: Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Animal Tissue by

On-Line Sample Enrichment Liquid, Chromatography. *J. AOAC* **77** (3), 765–767.

INCHAUSPE, G. and D. SAMAIN, 1984: Use of Perfluorinated Carboxylic Acids in the Separation of Aminoglycoside Antibiotics by Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **303**, 277–280.

KUBO, H., Y. KOBAYASHI and T. KINOSHITA, 1986: Fluorescence Determination of Streptomycin in Serum by Reversed-Phase Ion-Pairing Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **58**, 2653–2655.

KUROSAWA, N., S. KURIBAYASHI, E. OWADA and K. ITO, 1985: Determination of Streptomycin in Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatography Biomedical Applications* **343** (2), 379–386.

MARUYAMA, S., K. MURAMATSU, S. SHIMIZU and S. KOMIYAMA, 1985: Evaluation of analytical methods of antibiotics in raw milk by the disk methods and TLC [thin layer chromatography]-autobiography. *J. Food Hyg. Soc. Jpn* **26** (1), 65–72.

SALISBURY, C., C. RIGBY and W. CHAN, 1989: Determination of Antibiotic Residues in Canadian Slaughter Animals by Thin-Layer Chromatography-Bioautography. *J. of Agric. Food Chem.* **37** (1), 105–108.

SLIMPSON, D. L. and R. K. KOBOS, 1983: Potentiometric Microbiological Assay of Gentamicin, Streptomycin and Neomycin with a Carbon Dioxide Gas-Sensing Electrode. *Analytical Chemistry* **55** (12), 1974–1977.

WHALL, T. J., 1981: Determination of Streptomycin Sulfate and Dihydrostreptomycin Sulfate by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **219**, 89–100.

YONEDA, Y., H. OZAKI, A. KOMINATO and I. IYAMA, 1981: Chemical Classification of Antibiotics in Meat by the Disc Method and by Thin-Layer Chromatography Bioautography. *J. Food Hyg. Soc. Jpn* **22** (4), 299–306.

ZELLER, W., 1993: Untersuchungen zur Bekämpfung des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora*). *Gesunde Pflanzen* **45** (7) 247–250.

USLEBER, E., R. DIETRICH, M. STRAKA, E. MÄRTLBAUER and W. UNGLAUB, 1995: Nachweis von Streptomycinrückständen in Honig mit einem enzym-immunchemischen Verfahren nach Festphasenextraktion und Immunitätschromatographie. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **46** (4) 94–96.

Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen (Rückstands-Höchstmengenverordnung-RHmV), BGBl. I, 2299 (1994).

1. Änderungsverordnung v. 6. 4. 1995, BGBl. I, 504.
2. Änderungsverordnung v. 7. 3. 1996, BGBl. I, 455.

Kontaktanschrift: Dr. Dagmar Klementz, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für ökologische Chemie, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin