

KAJIAN ILMIAH MENGENAI METODE KROMATOGRAFI CAIR DAN VOLTAMMETRIK UNTUK ANALISIS RESIDU ANTIBIOTIK GOLONGAN TETRASIKLIN DI DALAM PRODUK MAKANAN ASAL HEWAN

Muhammad Zahid

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340

ABSTRAK

Antibiotik tetrasiklin (TC) secara luas digunakan sebagai obat hewan untuk mengobati infeksi penyakit yang disebabkan oleh bakteri karena memiliki aktifitas luas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Selain itu antibiotik tetrasiklin juga mempunyai profil toksisitas yang rendah dan biaya pengobatan yang ekonomis. Penyalahgunaan serta tidak mematuhi waktu henti obat dari antibiotik ini pada hewan ternak akan mengakibatkan akumulasi residu pada produk makanan asal hewan. Residu antibiotik pada produk asal hewan untuk konsumsi manusia akan berpengaruh terhadap kesehatan manusia. Oleh karena itu, identifikasi dan kuantifikasi jumlah sangat penting untuk menentukan kandungan residu antibiotik yang masih diperbolehkan di dalam produk peternakan sesuai dengan batas maksimum residu (BMR). Artikel ini merupakan kajian ilmiah yang membahas metode instrumentasi kimia, yang merupakan metode analisis yang umum digunakan untuk analisis residu antibiotik, salah satu yang paling sering digunakan adalah metode kromatografi cair. Lebih lanjut kajian ilmiah ini membahas metode kromatografi cair and voltammetrik untuk analisis residu antibiotik golongan tetrasiklin di dalam produk makanan asal hewan dan laut. Metode analisis ini memiliki kelebihan sangat sensitif, selektif, dan mampu mendeteksi jumlah residu yang sangat kecil dalam matriks makanan yang sangat kompleks.

Kata kunci: tetrasiklin, residu, kromatografi cair, voltammetrik, produk makanan

ABSTRACT

Tetracycline antibiotic (TC) is widely being used as veterinary medicine for treatment of infectious diseases caused by bacteria in animals due to having broad antibacterial spectrum against positive and negative Gram bacteria. Besides, it also has low toxicity profile and economic cost for treatment. Misues and unfollowed withdrawal time of these antibiotics for farm animal will lead the accumulation of residues in animal derived products. The residue of antibiotic in animal products for human consumption will affect to human health. Therefore, identification and quantification of the amount of residues are essential to determine of residue contain that is permissible in animal products according to maximum residue limit (MRL). This paper is an article review of chemically instrumentation method, that is commonly analytical method applied for antibiotic residue analysis, which liquid chromatography method is often used among its method. Moreover, this article is specifically reviewed liquid chromatography and voltammetric methods to analyse the residues of tetracycline antibiotic group in animal derived and seafood products. This analytical method is highly sensitive, selective, and able to detect very low quantity of residues in highly complex food matrix.

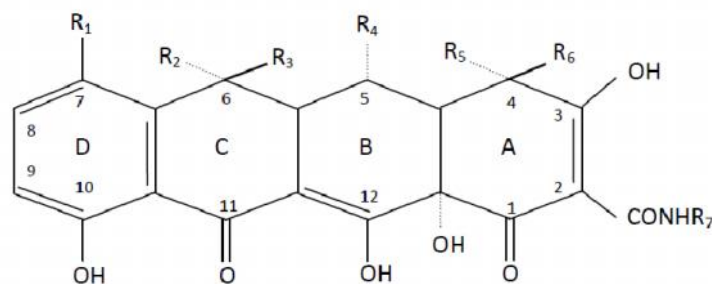
Key word: tetracycline, residue, liquid chromatography, voltammetric, food products

1. Pendahuluan

Antibiotik golongan tetrasiklin (TC) merupakan antibiotik berspektrum luas yang memiliki aktifitas bakteriostatik terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Selain itu juga tetrasiklin efektif terhadap beberapa mikroorganisme seperti, *mycoplasma*, *chlamydiae*,

rickettsias, spirochetes, actinomycetes, dan protozoa⁽³³⁾. Karena aktifitas antimikroba yang luas, antibiotik TC banyak digunakan untuk pengobatan terhadap beberapa penyakit infeksi pada hewan ternak. Khususnya pada sapi, tetrasiklin digunakan untuk mengobati infeksi lokal, saluran pernapasan, urin, dan mastitis. Pengobatan infeksi mastitis intramamari (intrasisternal) umumnya merupakan sumber kontaminasi residu tetrasiklin di dalam susu. Jalur kontaminasi lain terhadap susu juga melalui penggunaan secara perkutan, intrauterin, subkutan, intramuskular, dan intravena⁽¹⁸⁾.

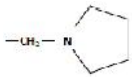
Struktur kimia dari antibiotik golongan TC ini mirip satu dengan lainnya dan berasal dari inti *hydronaphthacene* yang mengandung empat cincin yang menyatu. Struktur kimia umum dari TC memiliki tiga kelompok yang mempengaruhi permeabilitas dari molekul melalui membran biologik dan selanjutnya penyerapan molekul TC oleh sel membran. TC merupakan agen pengelat (*chelating agent*) kuat dan ikatan (*chelation*) dengan logam ion bervalensi dua (*divalent metal ion*) sangat penting dalam menentukan aktifitas antimikrobialnya. Bagian utama dari ikatan ini adalah 11, 12 b sistem diketon (*diketone system*)⁽³⁴⁾. Gambar di bawah merupakan struktur kimia antibiotik golongan tetrasiklin dan berbagai jenis obat antibiotik golongan tetrasiklin diuraikan dalam Tabel 1.



Gambar Struktur Kimia Antibiotik Golongan Tetrasiklin

Tabel 1. Antibiotik golongan tetrasiklin

Nama antibiotik	Nama kimia	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Tetrasiklin (TC)	<i>4-(Dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacene carboxamide</i>	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Klortetrasiklin (CTC)	<i>7-chloro-tetracycline</i>	Cl	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Oksitetrasiklin (OTC)	<i>5-hydroxy-tetracycline</i>	H	CH ₃	OH	OH	N(CH ₃) ₂	H	H
Metasiklin (MTC)	<i>6-methylene-5-hydroxy tetracycline</i>	H	-	-CH ₂	OH	N(CH ₃) ₂	H	H
Minosiklin (MNC)	<i>7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxy-tetracycline</i>	N(CH ₃) ₂	H	H	H	N(CH ₃) ₂	H	H

Doksisiklin (DOC)	<i>6-deoxy-5-hydroxy-tetracycline</i>	H	-	H	OH	N(CH ₃) ₂	H	H	
Demeklosiklin (DMCT)	<i>Demethylenecycline</i>	Cl	H	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H	
Meklosiklin (MCC)	<i>Chlormethylenecycline</i>	Cl	-	-	OH	N(CH ₃) ₂	H	H	
Rolitetrasiklin (RTC)	<i>Pyrrolidinomethyl tetracycline</i>	H	CH ₂ CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H		

Residu antibiotik di dalam makanan asal hewan menjadi faktor penting yang mempengaruhi kesehatan manusia karena adanya peningkatan resistensi antimikrobia (6). Penggunaan TC secara berlebihan dan tidak mematuhi aturan waktu henti (*withdrawal time*) harus dikendalikan dan diawasi untuk mengurangi risiko perkembangan resistensi antimikrobia terhadap strain baru dari mikroorganisme. Untuk mengendalikan dan mengurangi penggunaan TC, perlu dilakukan analisis residu TC di dalam produk makanan asal hewan.

Untuk menjamin keamanan pangan, beberapa otoritas regulator (*regulatory authorities*) menetapkan *maximum residue limits* (MRLs) atau batas maksimum residu (BMR), yaitu batas maksimum residu obat hewan atau antibiotik yang masih ditoleransi atau diperbolehkan ada di dalam produk makanan untuk konsumsi manusia. BMR dihitung berdasarkan asupan harian yang dapat diterima atau *acceptable daily intake* (ADI) tiap obat maupun asupan maksimum makanan atau produk asal hewan yang bersangkutan (11, 26). BMR umumnya ditulis dalam satuan mg kg⁻¹ atau µg kg⁻¹. Tabel 2. menjelaskan batas BMR untuk beberapa antibiotik golongan tetrasiklin berdasarkan negara dan otoritas, termasuk Indonesia untuk makanan serta komoditi asal hewan (sapi, ayam, telur ayam, dan susu sapi) (14).

Tabel 2. Persyaratan batas maksimum residu golongan TC untuk beberapa komoditi makanan asal hewan berdasarkan negara atau regulator (14)

Negara / Otoritas	Antibiotik	Asal Hewan	Komoditi	*Nilai BMR
Amerika Serikat	Klortetrasiklin	Sapi	Lemak	12
			Ginjal	12
			Hati	6
			Otot	2
			Susu	-
Amerika Serikat	Klortetrasiklin	Ayam	Lemak	12
			Ginjal	12
			Hati	6
			Otot	2
			Telur	0,4
Codex	Klortetrasiklin	Sapi	Ginjal	1200 ppb [#]
			Hati	600 ppb

			Otot	200 ppb
			Susu	-
Codex	Klortetrasiklin	Ayam	Ginjal	1200 ppb
			Hati	600 ppb
			Otot	200 ppb
			Telur	400 ppb
Uni Eropa	Klortetrasiklin	Sapi	Ginjal	600 ppb
			Hati	300 ppb
			Otot	100 ppb
			Susu	-
Uni Eropa	Klortetrasiklin	Ayam	Ginjal	600 ppb
			Hati	300 ppb
			Otot	100 ppb
			Telur	200 ppb
Australia	Klortetrasiklin	Sapi	Ginjal	0,6
			Hati	0,3
			Daging	0,1
			Susu	-
Australia	Klortetrasiklin	Ayam	Jeroan	0,6
			Daging	0,1
			Telur	0,2
Jepang	Klortetrasiklin	Sapi	Jeroan	0,6
			Lemak	0,2
			Ginjal	1,2
			Hati	0,6
			Otot	0,2
			Susu	-
Jepang	Klortetrasiklin	Ayam	Jeroan	0,6
			Lemak	0,2
			Ginjal	1,2
			Hati	0,6
			Otot	0,2
			Telur	0,4
Indonesia	Klortetrasiklin	Sapi	Daging	0,1
			Susu	-
Indonesia	Klortetrasiklin	Ayam	Daging	0,1
			Telur	0,01
Amerika Serikat	Oksitetrasiklin	Sapi	Lemak	12
			Ginjal	12
			Hati	6

			Otot	2
			Susu	0,3
Amerika Serikat	Oksitetrasiklin	Ayam	Lemak	12
			Ginjal	12
			Hati	6
			Otot	2
			Telur	-
Codex	Oksitetrasiklin	Sapi	Ginjal	1200 ppb
			Hati	600 ppb
			Otot	200 ppb
			Susu	100 ppb
Codex	Oksitetrasiklin	Ayam	Ginjal	1200 ppb
			Hati	600 ppb
			Otot	200 ppb
			Telur	-
Uni Eropa	Oksitetrasiklin	Sapi	Ginjal	600 ppb
			Hati	300 ppb
			Otot	100 ppb
			Susu	100 ppb
Uni Eropa	Oksitetrasiklin	Ayam	Ginjal	600 ppb
			Hati	300 ppb
			Otot	100 ppb
			Telur	-
Australia	Oksitetrasiklin	Sapi	Ginjal	0,6
			Hati	0,3
			Daging	0,1
			Susu	0,1
Australia	Oksitetrasiklin	Ayam	Jeroan	0,6
			Daging	0,1
			Telur	-
Jepang	Oksitetrasiklin	Sapi	Jeroan	0,6
			Lemak	0,2
			Ginjal	1,2
			Hati	0,6
			Otot	0,2
			Susu	0,1
Jepang	Oksitetrasiklin	Ayam	Jeroan	0,6
			Lemak	0,2
			Ginjal	1,2
			Hati	0,6
			Otot	0,2

			Telur	-
Indonesia	Oksitetrasiklin	Sapi	Daging	-
			Susu	-
Indonesia	Oksitetrasiklin	Ayam	Daging	-
			Telur	-
Amerika Serikat	Tetrasiklin	Sapi	Lemak	12
			Ginjal	12
			Hati	6
			Otot	2
			Susu	-
Amerika Serikat	Tetrasiklin	Ayam	Lemak	12
			Ginjal	12
			Hati	6
			Otot	2
			Telur	-
Codex	Tetrasiklin	Sapi	Ginjal	1200 ppb
			Hati	600 ppb
			Otot	200 ppb
			Susu	-
Codex	Tetrasiklin	Ayam	Ginjal	1200 ppb
			Hati	600 ppb
			Otot	200 ppb
			Telur	-
Uni Eropa	Tetrasiklin	Sapi	Ginjal	600 ppb
			Hati	300 ppb
			Otot	100 ppb
			Susu	-
Uni Eropa	Tetrasiklin	Ayam	Ginjal	600 ppb
			Hati	300 ppb
			Otot	100 ppb
			Telur	-
Australia	Tetrasiklin	Sapi	Daging	-
			Susu	-
Australia	Tetrasiklin	Ayam	Daging	-
			Telur	-
Jepang	Tetrasiklin	Sapi	Jeroan	0,6
			Lemak	0,2
			Ginjal	1,2
			Hati	0,6

			Otot	0,2
			Susu	-
			Jeroan	0,6
			Lemak	0,2
Jepang	Tetrasiklin	Ayam	Ginjal	1,2
			Hati	0,6
			Otot	0,2
			Telur	-
Indonesia	Tetrasiklin	Sapi	Daging	0,1
			Susu	-
Indonesia	Tetrasiklin	Ayam	Daging	0,1
			Telur	-

*jika tidak dinyatakan lain satuan BMR adalah ppm (*part per million*). #ppb (*part per billion*)

2. Metode instrumentasi kimia

Prosedur analitik telah banyak dikembangkan secara luas untuk menentukan residu antibiotik TC di dalam produk makanan asal hewan, seperti *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *capillary electrophoretic* (CE), *thin layer chromatography* (TLC) dan metode *liquid chromatography* (LC)/ kromatografi cair. Khususnya metode LC sendiri memiliki beberapa teknis sesuai dengan jenis detektor yang digunakan, antara lain detektor ultraviolet (UV), *fluorescence* (FL), *diode array detector* (DAD), serta *mass spectrometry* (MS). Dalam tinjauan ini hanya akan dibahas prosedur analitik instrumentasi yang telah digunakan untuk konfirmasi maupun kuantifikasi residu antibiotik golongan TC dan dijelaskan di dalam Tabel 3.

a. Kromatografi cair – detektor ultraviolet (UV)

Metode LC-UV merupakan metode yang paling sering digunakan untuk mendeteksi TC dan sensitifitasnya sangat baik. Beberapa metode LC-UV untuk analisis TC telah banyak dipublikasi dalam 10 tahun terakhir dan telah mampu mendeteksi residu berbagai jenis antibiotik TC dari berbagai produk makanan asal hewan. Metode LC-UV juga bahkan mampu mendeteksi dan menghitung residu dari isomer TC seperti *4-epioxytetracycline* (4-epiOTC) di dalam jaringan tubuh hewan, seperti otot, hati, ginjal, dan lemak ⁽¹¹⁾. Sistem elusi isokratik merupakan sistem pengaliran fase gerak paling umum digunakan dalam metode UV ⁽²⁶⁾. Salah satunya adalah Lee dkk. (2007) mengembangkan sistem elusi isokratik untuk deteksi OTC, TC, dan CTC pada produk

ikan menghasilkan nilai *Level Of Density* (LOD) yang sangat baik yaitu 4-7 ng mL⁻¹. Sistem elusi gradien juga dikembangkan oleh Li dkk. (2008) untuk mendeteksi residu TC, OTC, CTC, MTC, dan DOC di dalam madu, yang menghasilkan nilai LOD 5-12 ng g⁻¹. Kolom yang digunakan pada LC dengan detektor UV umumnya adalah C8 dan C18, akan tetapi Kaale dkk. (2008) mengembangkan metode ini dengan menggunakan kolom *polymer-reversed phase* untuk menganalisis residu TC di dalam susu sapi segar. Nilai deteksi yang dihasilkan sebesar 30 ng mL⁻¹.

b. Kromatografi cair – diode array detector (DAD)

DAD merupakan metode yang sangat berguna untuk memperoleh spektra yang jelas, identifikasi puncak (*peak*) dan uji kemurnian untuk menentukan residu TC ⁽²⁵⁾. Vinas dkk. (2004) mengembangkan metode LC dengan DAD untuk pemisahan TC, OTC, CTC, DOC, MNC, dan MTC di dalam sampel madu. Penggunaan fase diam berbasis amida (*amide-based stationary phase*) mencegah interaksi TC dengan kelompok residual silanol, sehingga menghindari terbentuknya puncak berekor (*tailed peaks*). Ekstraksi menggunakan larutan asam lemah yang mengandung EDTA melepaskan ikatan protein atau ikatan gula dari TC. *Solid Phase Extraction* (SPE) menggunakan *phenyl cartridge* digunakan untuk tahap pembersihan (*clean-up*). Metode secara *online* digunakan untuk menghubungkan sistem ekstraksi dengan LC-DAD seperti yang dikembangkan oleh Wen dkk. (2006). Mereka mengembangkan *in-tube solid-phase micro extraction* (SPME) ke LC dengan DAD untuk mendeteksi secara simultan residu TC, OTC, CTC, dan DC pada ikan. Teknik yang sama juga dikembangkan yaitu SPE-LC-DAD untuk menentukan residu 4-epiTC dan OTC di dalam susu ⁽¹³⁾. Sampel susu diekstraksi dan dibersihkan menggunakan Discovery SPE DSC-18 tubes dan pemisahan selesai dalam waktu kurang dari 8 menit.

c. Kromatografi cair – detektor fluorescence (FL)

Penggunaan detektor FL dikembangkan untuk menganalisis multiresidu secara simultan di dalam produk makanan. Umumnya detektor FL menggunakan dua panjang gelombang (λ), yaitu panjang gelombang eksitasi (λ_{ex}) dan emisi (λ_{em}). Salah satu aplikasi penggunaan detektor FL dikembangkan oleh Schneider dkk. (2007) untuk menentukan residu antibiotik *fluorokuinolon* dan TC di dalam daging ayam. Teknik pembersihan sampel juga dikembangkan untuk menghasilkan puncak yang jelas. *Restricted access materials* (RAM) berdasarkan *alkyl diol silica* (ADS) *porous particles* digunakan untuk proses *sample clean-up* dalam mendeteksi residu OTC, TC, CTC, dan DOC di dalam sampel susu. Sistem RAM sangat berguna untuk menghilangkan puncak

besar yang merupakan matriks protein di dalam sampel susu. Schneider dkk. (2007) mengembangkan metode LC-FL untuk mendeteksi residu OTC, TC, dan CTC di dalam daging menggunakan kolom XDB-*phenyl* menghasilkan nilai LOD yang sangat baik dan jauh di bawah BMR yaitu 1-1,5 ng g⁻¹.

d. Kromatografi cair – detektor spektrometri masa (MS)

Saat ini metode kromatografi cair dengan menggunakan detektor MS untuk analisis residu TC di dalam produk makanan paling banyak dikembangkan untuk meningkatkan sensitifitas dan akurasi pengujian. Metode ini dapat digunakan untuk deteksi multiresidu berbagai jenis golongan antibakteri, seperti golongan sulfonamida, TC, dan pirimetamin, yang dikembangkan oleh Koesukwiwat dkk. (2007) di dalam sampel susu sapi. Sampel susu diekstraksi menggunakan *copolymer Oasis HLB SPE* dan dianalisis dengan LC-MS ESI pada mode ion positif. Nilai LOD yang diperoleh jauh lebih rendah dari nilai BMR yang ditetapkan oleh berbagai otoritas. Metode lain LC-MS ESI pada mode ion positif yang dikembangkan untuk secara simultan mendeteksi berbagai kelas antibiotik seperti kuinolon, TC, sulfonamid dan trimetoprim di dalam daging dan kulit ikan⁽²⁸⁾. Metode ini menggunakan ekstraksi padat-cair (*solid-liquid extraction*) tanpa pencucian lebih lanjut.

Teknik LC tandem MS (LC-MS/MS) dikembangkan untuk mendeteksi berbagai residu antibiotik secara bersamaan di dalam berbagai produk makanan asal hewan. Salah satunya dikembangkan oleh Granelli dkk. (2007) yang mendeteksi 19 antibiotik dari 5 kelas antibiotik (TC, sulfonamid, kuinolon, β-laktam, dan makrolida) di dalam sampel daging dan ginjal dari babi, sapi, domba, rusa, dan rusa kutub. Metode ini dapat menganalisis hingga 60 sampel dalam waktu 24 jam. Nilai rata-rata LOD yang dihasilkan sangat baik yaitu 3-6 µg kg⁻¹. Metode yang sama juga dikembangkan oleh Chico dkk. (2008) mampu mendeteksi hingga 39 antibiotik secara bersamaan (TC, kuinolon, penisilin, sulfonamid, dan makrolida) dalam produk asal hewan. Lebih lanjut teknik ini dapat mendeteksi lebih dari 100 obat hewan dari berbagai kelas dengan menggunakan *Ultra-high Performance Liquid Chromatography* (UPLC) yang digabung dengan *time of flight* (TOF) MS menghasilkan nilai deteksi 108,9-697 µg kg⁻¹⁽²¹⁾.

Selain mampu mendeteksi residu dari berbagai kelas obat hewan, metode LC MS/MS yang dikembangkan juga mampu menganalisis tiga metabolit TC di dalam produk makanan. 4-epiTC, 4-epiCTC, dan 4-epiOTC dapat dideteksi dari sampel susu segar dan sterilisasi. Elusi gradien dan kolom C8-3 *reversed-phased* digunakan, menghasilkan nilai LOD yang sangat baik yaitu 0,5-10 µg kg⁻¹⁽⁴⁵⁾. Untuk memberikan hasil yang lebih baik, proses ekstraksi juga dioptimasi dan digabung (*coupled*) dengan

LC-MS/MS. Jing dkk. (2009) menggunakan sistem ekstraksi *Molecular-Imprinted Solid-Phase Extraction* (MISPE), dimana *molecularly imprinted polymers* disiapkan dengan polimerisasi presipitasi (*precipitation polymerisation*) menggunakan TC sebagai *template*. Dengan menggunakan kolom C18 serta sistem ekstraksi MISPE memberikan pembersihan yang lebih baik dan efisien dibanding C8-3 *catridge* dan nilai *recovery* (perolehan kembali) lebih tinggi dibanding *Oasis HLB catridge*.

e. Kromatografi cair – detektor lain

Selain metode kromatografi cair dengan detektor-detektor yang telah dijelaskan di atas, ada juga LC yang dikembangkan untuk analisis residu TC, antara lain dengan menggunakan detektor *Resonance Rayleigh Scattering* (RSS). Metode yang dikembangkan oleh Wang dkk. (2008) menerapkan *LC reversed-phase* yang secara simultan mampu memisahkan dan menentukan OTC, TC, CTC, dan DC dalam madu. Metode ini memberikan hasil yang sangat selektif dan sensitif. Selanjutnya metode LC yang digabung (*coupled*) dengan detektor *chemiluminescence* (CL) dikembangkan oleh Wan dkk. (2005), dapat mendeteksi OTC, TC, dan MTC di dalam madu. Zhao dkk. (2004) mengembangkan metode LC menggunakan *coulometric electrode array system* untuk menganalisis residu OTC, CTC, TC, MTC, dan DC di dalam susu kambing. Metode ini sangat berguna untuk monitoring rutin residu TC di dalam susu kambing. Detektor lain yang digunakan adalah *capillary electrophoresis* (CE) yang dikombinasi dengan MS menjadi CE/MS dan secara *online* disambungkan dengan sistem *Field-Amplified Sample Stacking with Electromigration Injection* (FASS-EMI). Dengan menggunakan jenis detektor ini mampu meningkatkan sensitifitas hingga enam kali untuk mendeteksi residu TC, OTC, dan CTC di dalam susu sapi⁽⁴⁰⁾.

f. Voltammetrik

Metode voltammetrik, merupakan metode yang cukup sederhana, ekonomis, serta memiliki kinerja yang setara dengan LC, menjadi metode alternatif yang dikembangkan untuk mendeteksi residu TC di dalam makanan. Metode ini menggunakan prinsip *differential pulse stripping voltammetry* (DPSV) dengan bantuan *chemometrics*. Secara sederhana mekanisme kerja dari metode ini adalah mengukur nilai tegangan / *potential* (-mV/ *milliVolt*) serta arus/ *current* (nA/ *nanoAmpere*) yang dihasilkan dari tiap antibiotik dengan menggunakan elektroda kimia. Umumnya menggunakan 2 elektroda, yaitu elektroda kerja (*working electrode*), dimana elektroda ini langsung kontak dengan analit. Selain itu, nilai potensial yang diinginkan juga perlu diatur dengan cara yang dapat dikendalikan. Elektroda ini juga berfungsi untuk memfasilitasi perpindahan muatan ke

dan dari analit. Sedangkan elektroda kedua bertindak sebagai bagian lain dari sel. Elektroda kedua ini harus memiliki nilai potensial yang diketahui, yang dapat digunakan untuk mengukur potensial elektroda kerja. Lebih lanjut lagi elektroda ini harus mampu menyeimbangkan muatan yang ditambahkan atau dihilangkan oleh elektroda kerja.

Seperti halnya metode spektrofotometri, dimana tiap analit memberikan nilai panjang gelombang yang berbeda, demikian juga dengan metode voltammetrik memiliki nilai potensial yang berbeda tiap senyawa antibiotik. Ni dkk. (2011) mengembangkan metode ini untuk menganalisis residu OTC, TC, dan CTC di dalam ikan dalam rentang nilai potensial antara 800 hingga 1200 mV. Sebelumnya tiap standar OTC, TC, dan CTC masing-masing secara terpisah diukur nilai potensial. Konsentrasi juga menentukan nilai potensial, semakin besar konsentrasi suatu analit, semakin tinggi juga nilai potensialnya. Hasil dari metode yang dikembangkan oleh Ni dkk. (2011) mampu menghasilkan nilai rata-rata LOD yang sangat baik yaitu antara 3-5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabel 3. Kondisi LC untuk penentuan residu TC di dalam produk makanan asal hewan dan laut

Antibiotik	Sampel	Kolom	Fase gerak	Detektor	Batas deteksi	Pustaka
TC, CTC, OTC	Susu	C8	Asetonitril / metanol / asam oksalat 0,05 mol L ⁻¹ (13:13:74 v/v)	UV pada 365 nm	LOD 15-22 ng g ⁻¹	26
TC, OTC, CTC	Udang dan susu	<i>Polar end-capped C8</i>	Elusi isokratik terdiri dari 75% A + 18% asetonitril + 7% metanol, dimana A: 0,01 M asam oksalat untuk sampel susu dan 0,1% untuk sampel udang	UV pada 370 nm	Limit of Quantification (LOQ) 50 ng g ⁻¹ untuk semua sampel	3
OTC	Daging	C18	Elusi isokratik air dengan H ₂ SO ₄ (pH 2.1) : asetonitril (85:15)	UV pada 360 nm	LOD: 8.0 µg kg ⁻¹	30
OTC, TC, CTC	Produk ikan	C18	Air 760 mL, asetonitril 240 mL, N,N <i>dimethylformamide</i> 60 mL, <i>ethanolamine</i> 5 mL, NaHPO ₄ 2,5 g	UV pada 254 nm	Limit of detection (LOD): 0.004-0.007 µg mL ⁻¹	23
OTC, 4-epioxytetracycline (4-epiOTC)	Jaringan tubuh hewan	C18	Asetonitril 0,01 mol L ⁻¹ : Na ₂ HPO ₄ (20:80 v/v)	UV pada 370 nm	LOD: 12,4-17,5 ng g ⁻¹	11
TC, OTC, CTC, MTC, DOC	Madu	C18	Elusi gradien, fase gerak A: asam format 0,8%, B: asetonitril	UV pada 365 nm	LOD: 5-12 ng g ⁻¹	24
OTC	Susu segar	<i>Polymer reversed-phase</i>	Asam asetat / air (pH 4.5) / asetonitril (4:68:28)	UV pada 354 nm	LOD 30 ng mL ⁻¹	20
OTC, 4-epiOTC	Susu kambing	C18	Asetonitril : NaH ₂ PO ₄ 0,01 M (20:80 v/v) yang mengandung garam natrium oktanesulfonat, tetrabutilamonium hidrogen sulfat 3 mM, dan tetrasodium EDTA 0,01%, diatur pH 3,8 dengan asam fosfat pekat	UV pada 370 nm	Capability of detection (CCβ) untuk OTC: 114.6 ug kg ⁻¹ dan 4-epiOTC: 115.5 µg kg ⁻¹	12
TC, OTC, MNC, CTC, MTC, DOC	Susu dan madu	C18	Asetonitril : NaH ₂ PO ₄ (pH = 3.00, 0.01 mol L ⁻¹) (9:91 v/v) dari 0 – 10 menit, Asetonitril : NaH ₂ PO ₄ (12:88 v/v) dari 10 – 18 menit, Asetonitril : NaH ₂ PO ₄ (18:82 v/v) dari 18 – 40 menit	UV pada 350 nm	LOD: 10,2-18,8 µg L ⁻¹	32
TC, OTC,	Madu	<i>Amide-C16</i>	Elusi gradien, fase gerak A: asam oksalat 10	<i>Diode Array</i>	LOD: 15-30 ng g ⁻¹	37

CTC, DOC, MNC, MTC			mM (pH 3,0), fase gerak B: asetonitril	<i>Detection</i> (DAD) pada 270 dan 355 nm		
OTC, TC, CTC, MNC, MTC, DMC, DOC	Daging dan hati babi, ayam dan sapi	C18	Elusi gradien, metanol / asetonitril / asam oksalat 0,01M (pH 3.0). Komposisi fase gerak 0-15 menit adalah 7:8:85, 15-18 menit adalah 10:20:70	DAD pada 355 nm	LOD: <10 µg kg ⁻¹ LOQ: <15 µg kg ⁻¹	44
OTC, TC, CTC	Daging kerbau	C8	Asam oksalat 0,01 M / asetonitril / metanol (77:18:5 %v/v)	DAD pada 355 nm	LOD: 31 µg kg ⁻¹ LOQ: 62 µg kg ⁻¹	4
TC, OTC, CTC, DOC	Telur dan daging ayam	<i>Polymeric reversed-phase</i>	Eluen gradien, fase gerak A: asam fosfat 0,02 M dengan natrium 1-decasulfonat 0,01 M, B: asetonitril	DAD pada 355 nm	LOD: 2.2-28.6 ng g ⁻¹ LOQ: 13.0-51.6 ng g ⁻¹	10
TC, OTC, CTC, DOC	Ikan	ODS	20% metanol : 20% asetonitril : 60% larutan asam oksalat 0,02 mol L ⁻¹ (pH 3,0)	DAD pada 355 nm	LOD: 16-30 ng g ⁻¹	42
TC, 4-epiTC dan OTC	Susu	C18	Asam oksalat 0,010 M / asetonitril / metanol (150:20:20 v/v)	DAD pada 365 dan 280 nm	LOD: 2,0 µg L ⁻¹ tiap TC	13
TC, OTC, CTC, DOC	Susu	ODS	Elusi gradien, fase gerak A: asam oksalat 10 mM, B: asetonitril	DAD pada 360 nm	LOD: 0,9-3,5 ng g ⁻¹	35
OTC, TC, CTC, DOC	Daging dan hati ayam	C18	Elusi gradien: fase gerak A: metanol, B: asetonitril, C: asam oksalat 0,03 M	DAD pada 351 nm	LOD: 4.4-10 ng g ⁻¹ LOQ: 10-27 ng g ⁻¹	31
OTC, TC, CTC	Daging ayam	<i>XDB-phenyl</i>	Elusi gradien, fase gerak A: malonate 0,1 M, 50 mM Mg ⁺² , diatur pH 6,5 dengan NH ₄ OH pekat, B: metanol	<i>Fluorescence</i> (FL) pada panjang gelombang eksitasi (λ_{ex}) 375 nm dan emisi (λ_{em}) 535 nm	LOD: 1-1,5 ng g ⁻¹	29
OTC, TC, CTC	Daging, hati, ginjal sapi	C18	Metanol / asetonitril / asam oksalat 50 mM (10:20:70 %v/v)	FL pada λ_{ex} 255 nm dan λ_{em} 365 nm	LOD: 2.2-7.6 µg kg ⁻¹	1
OTC, TC, CTC, DOC	Susu	C18	Elusi gradien, fase gerak A: air, B: asetonitril, C: asam oksalat 0,01 mol L ⁻¹	FL pada λ_{ex} 374 nm dan λ_{em} 495 nm	LOD: 15-30 ng L ⁻¹	10
TC, OTC, CTC	Susu	C18	Metanol / asetonitril / asam oksalat 50 mM (10:20:70 %v/v)	FL pada λ_{ex} 255 nm dan λ_{em} 365 nm	LOD: 2.2 ng g ⁻¹ LOQ: 6.6 ng g ⁻¹	3
OTC, TC, MTC	Madu	XDB C-18	Asetonitril (A) dan 0,001 M asam fosfat (B). Sistem elusi isokratik adalah 16% A untuk 11 menit	<i>Chemiluminescence</i>	LOD: 0.9-5.0 ng L ⁻¹	38
OTC, TC,	Madu	RP	Elusi gradien, fase gerak A: metanol, B:	λ_{ex} dan λ_{em} 370 nm	LOD: 2.12-5,12 µg mL ⁻¹	39

CTC, DOC			asetonitril, C: asam oksalat 5 mM			
OTC, TC, CTC, DOC	Madu	C8	50% metanol dan dapar natrium asetat 25 mM (mengandung Na ₂ EDTA, pH 8,1)	FL pada λ_{ex} 380 nm dan λ_{em} 518 nm	LOD: 0.18-8.62 $\mu\text{g kg}^{-1}$	37
OTC, TC, CTC, MTC, DOC	Susu kambing	C18	NaH ₂ PO ₄ 0,05 M (pH 2,2) : asetonitrile (78:22 v/v)	<i>Coulometric electrode array system</i>	LOD: 10-25 ng mL ⁻¹	46
OTC, TC, CTC, DOC	Daging ayam	C18	Elusi gradien, fase gerak A: air dengan 1% asam format, B: metanol berisi 0,1% asam format	<i>Mass Spectrophotometric (MS) dengan ESI (Electrospray Ionisation)</i> dalam mode positif	LOD: 8.3-14.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ LOQ: 24.2-44.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	7
CTC, OTC, TC	Susu	RP18	Elusi gradien, fase gerak A: asam oksalat 1 mM dalam asetonitril 5%, B: asam oksalat 1 mM dalam asetonitril 95%	MS dengan ESI dalam mode positif	LOD 0.65-2.64 ng mL ⁻¹	24
OTC	Ikan	C18	Elusi gradien, fase gerak A: larutan asam format 0,1% , B: metanol (90:10)	MS dengan ESI dalam mode positif	LOD: 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	28
CTC, DMC, MNC, OTC, TC	Berbagai jenis daging	HSS T3 UPLC	Elusi gradien, fase gerak A: 50 asetonitril, 3 mL asam format dan air hingga 1 L, B: 50 air, 3 mL asam format dan ditambahkan air hingga 1 L	<i>Time of flight (TOF) mass spectrometry</i>	CC β : 108.9-697 $\mu\text{g kg}^{-1}$	21
CTC, DMC, DOC, MTC, MNC, OTC, TC, RTC	Madu	C18	Elusi gradien, fase gerak A: asam oksalat 0,02 M / 0,01 trietilamin (pH 2,0), B: asetonitril	DAD and ESI-TOF-MS	LOD: 0.02-1.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ untuk UV, 0.05-0.76 $\mu\text{g kg}^{-1}$ untuk ESI-TOF-MS	8
OTC, TC, CTC	Jaringan hewan	ODS-80 Ts	Elusi gradien, fase gerak A: air suling yang berisi 0,05% asam format, B: metanol yang mengandung 0,05% asam format	MS-MS	LOD: 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	15
TC, CTC, OTC, DOC, DMC, MTC, MNC, 4- epiTC, 4- epiCTC, 4- epiOTC	Susu	C8-3 reversed-phase	Elusi gradien, fase gerak A: metanol, B: asam trifluoroasetat dalam air 0,01 M	MS-MS	LOD: 0,5-10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	45

CTC, OTC, TC, DOC	Daging dan ginjal	C18	Elusi gradien, fase gerak A: 100%, B: 0,2% asam format mengandung asam oksalat 0,1 mM	MS-MS	LOD: 3-6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	16
OTC, TC, CTC, DOC	Makanan asal hewan	C18 <i>acquity</i> UPLC BEH	Elusi gradien, fase gerak A: larutan asam format 0,2% dan asam oksalat 1 mM, B: asetonitril dengan 0,1% asam format	MS-MS	CC β : 112,0-118,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	8
OTC, TC, CTC, DC	Royal jelly	C18	Elusi gradien, fase gerak A: asam format 0,1% dalam air Milli-Q, B: metanol	MS-MS	LOD: dibawah 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	43
TC, OTC, CTC, DOC	Lobster, bebek, madu	C18	Metanol / asetonitril / larutan asam oksalat 100 mmol L ⁻¹ (1:2:7 v/v)	MS-MS	LOD: 0,1-0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	19
CTC, OTC, TC, DOC	Daging babi dan sapi	C18	Elusi gradien, fase gerak A: asam format 0,2% menandung asam oksalat 0,1 mM, B: asetonitril	MS-MS	LOD: 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	17

Kesimpulan

Pengembangan metode analisis yang sangat sensitif dan selektif diperlukan karena residu obat hewan di dalam produk makanan terdapat dalam jumlah yang sangat kecil dengan matriks yang sangat kompleks. Disamping itu, berbagai otoritas maupun *regulator* juga telah menetapkan BMR residu di dalam produk makanan dengan batas yang diperbolehkan sangat kecil. Oleh karena itu metode analisis harus mampu memberikan nilai deteksi yang jauh lebih rendah dari BMR. Metode LC merupakan satu dari beberapa metode instrumentasi yang sering digunakan untuk mendeteksi residu obat di dalam produk makanan asal hewan dan ikan. Hampir sebagian besar metode LC memberikan sensitifitas yang baik dengan nilai LOD yang sangat rendah. Umumnya, metode LC dengan detektor FL menghasilkan selektifitas dan sensitifitas lebih baik dari LC-UV dan LC-DAD. Sedangkan LC-MS/MS dikembangkan untuk memberikan hasil yang lebih baik dari metode deteksi konvensional (LC-UV, LC-DAD, dan LC-FL). Salah satu kelebihan dari metode ini adalah mampu mendeteksi berbagai kelas atau golongan obat hewan secara simultan dalam jenis produk makanan yang berbeda. Metode instrumentasi yang dikembangkan ini sangat bermanfaat dalam membantu pemantauan residu obat hewan di dalam produk makanan, khususnya yang beredar di Indonesia.

Daftar Pustaka

1. **Abbasi MM, Rashidi MR, Javadi A, Amirhiz MB, Mirmahdavi S. & Zabihi M.** 2009. Levels of Tetracycline Residues in Cattle Meat, Liver, and Kidney From a Slaughterhouse in Tabriz, Iran. *Turkey Journal Veterinary Animal Science*, 33(4), 345-349.
2. **Abbasi MM, Babaei H, Ansarin M, Nourdadgar A. & Nemati M.** 2011. Simultaneous Determination of Tetracycline Residues in Bovine Milk Samples by Solid Phase Extraction and HPLC-FL Method. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(1), 34-39.
3. **Andersen WC, Roybal JE, Gonzales SA, Turnipseed SB, Pfenning AP. & Kuck LR.** 2005. Determination of Tetracycline Residues in Shrimp and Whole Milk Using Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection and Residue Confirmation by Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529, 145-150.
4. **Biswas AK, Rao, GS, Kondaiah N, Anjaneyulu ASR, Mendiratta SK, Prasad R. & Malik JK.** 2007. *Journal of Food and Drug Analyst*, 15(3), 278-284.
5. **Butaye P, Devriese LA. & Haesebrouck F.** 2001. Differences in Antibiotic Resistance Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Farm and Pet Animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1374-1378.

6. **Carrascos-Pancorobo A, Casado-Terrines S, Sugura-Carretero A. & Fernandez-Gutierrez A.** 2008. A Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography Coupled to Ultraviolet and Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry On-Line Detection for the Separation of Eight Tetracyclines in Honey Samples. *Journal of Chromatography A*, 1195, 107-116.
7. **Cetinkaya F, Yibar A, Soyutemiz GE, Okutan B, Ozcan A. & Karaca MY.** 2012. Determination of Tetracycline Residues in Chicken Meat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 1-5.
8. **Chico J, Meca S, Companyo R, Prat MD. & Granados M.** 2008. Restricted Access Materials for Sample Clean-up in the Analysis of Trace Levels of Tetracyclines by Liquid Chromatography. Application to Food and Environmental Analysis. *Journal of Chromatography A*, 1181, 1-8.
9. **Commission Regulation 508/1999/EC.** 1999. Official Journal of The European Communication. L224, 16.
10. **De Ruyck H, De Ridder H, Van Renterghem R. & van Wambeke F.** 1999. Validation of HPLC Method of Analysis of Tetracycline Residues in Eggs and Broiler Meat and Its Application to Feeding Trial. *Food Additives and Contaminants*, 16(2), 47-56.
11. **Fletouris DJ. & Papapanagiotou EP.** 2008. A New Liquid Chromatographic Method For Routine Determination of Oxytetracycline Marker Residue in the Edible Tissue of Farm Animals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(4), 1189-1198.
12. **Fletouris DJ, Papapanagiotou EP. & Nakos DS.** 2008. Liquid Chromatography Determination and Depletion Profile of Oxytetracycline in Milk after Repeated Intramuscular Administration in Sheep. *Journal of Chromatography B*, 876(1), 148-152.
13. **Fritz JW. & Zuo Y.** 2007. Simultaneous Determination of Tetracycline, Oxytetracycline, and 4-Epitetracycline in Milk By High Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry*, 105(3), 1297-1301.
14. **Global MRL Database.** 2015. Classic Veterinary Drug MRLs. <https://vetdrugs.globalmrl.com/results.cfm>. [updated 14th April 2015].
15. **Goto T, Ito Y, Yamadaa S, Matsumoto H. & Okab H.** 2005. High-Throughput Analysis of Tetracycline and Penicilline Antibiotics in Animal Tissues Using Electrospray Tandem Mass Spectrometry With Selected Reaction Monitoring Transition. *Journal of Chromatography A*, 1100, 193-199.

16. **Granelli K. & Branzell C.** 2007. Rapid Multi-Residue Screening of Antibiotics in Muscle and Kidney by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 586, 289-295.
17. **Granelli K, Elgerud C, Lundstrom A, Ohlsson A. & Sjorberg P.** 2009. Rapid Multi-Residue Analysis of Antibiotics in Muscle by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Acta*, 637, 87-91.
18. **Heeschen WH.** 1993. Residue of Antibiotics and Sulfonamides in Milk. Bulletin of the IDF N 283/1993. IDF, Brussel: 3-13.
19. **Jing T, Gao XD, Wang P, Wang Y, Lin YF, Hu HZ et al.** 2009. Determination of Trace Tetracycline Antibiotics in Foodstuffs By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with Selective Molecular-Imprinted Solid-Phase Extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 339(8), 2009-2018.
20. **Kaale E, Chambuso M. & Kitwala J.** 2008. Analysis of Residual Oxytetracycline in Fresh Milk Using Polymer Reversed-Phase Column. *Food Chemistry*, 107, 1289-1293.
21. **Kaufmann A, Butcher P, Maden K. & Wildmer M.** 2008. Quantitative Multiresidue Method for about 100 Veterinary Drugs in Different Meat Matrices by Sub-2-Mu M Particulate High-Performance Liquid Chromatography Coupled To Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1194(1), 66-79.
22. **Koesukwiwat U, Jayanta S. & Leepipatpiboon N.** 2007. Validation of a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Multi-Residue Method for Simultaneous Determination of Sulfonamides, Tetracyclines, and Pyrimethamine in Milk. *Journal of Chromatography A*, 1140, 147-156.
23. **Lee JB, Chung HH, Chung HY. & Lee KG.** 2007. Development of an Analytical Protocol for Detecting Antibiotic Residue in Various Foods. *Food chemistry*, 105, 1726-1731.
24. **Li J, Chen L, Wang X, Jin H, Ding L, Zhang K. & Zhang H.** 2008. Determination of Tetracyclines Residues in Honey by On-Line Solid-Phase Extraction High-Performance Liquid Chromatography. *Talanta*, 75, 1245-1252.
25. **Onal A.** 2011. Overview on Liquid Chromatography Analysis of Tetracycline Residues in Food Matrices. *Food Chemistry*, 127, 197-203.
26. **Navratilova P, Borkovcova I, Drackova M, Janstova B. & Vorlova L.** 2009. Occurrence of Tetracycline, Chlortetracycline, and Oxytetracycline Residues in Raw Cow's Milk. *Czech Journal of Food Science* 27(5), 379-385.

27. **Ni Y, Li S. & Kokot S.** 2011. Simultaneous Voltammetric Analysis of Tetracycline Antibiotics in Foods. *Food Chemistry*, 124, 1157-1163.
28. **Romero-Gonzales R, Lopez-Martinez JC, Gomez-Milan E, Garrido-Frenich A. & Martinez-Vidal JL.** 2007. Simultaneous Determination of Selected Veterinary Antibiotics in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 857(1), 142-148.
29. **Schneider MJ, Braden SE, Reyes-Herrera I & Donoghue DJ.** 2007. Simultaneous Determination of Fluoroquinolones and Tetracyclines in Chicken Muscle Using HPLC with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography B*, 846. 8-13.
30. **Senyuva H, Ozden T. & Sarica Y.** 2000. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Tetracycline Residue in Cured Meat Products. *Turkey Journal of Chemistry* 24, 395-400.
31. **Shalaby AR, Salama NA, Abou-Raya SH, Emam WH. & Mehaya FM.** 2011. Validation of HPLC Method For Determination of Tetracycline Residues in Chicken Meat and Liver. *Food Chemistry*, 124, 1160-1666.
32. **Sun X, He X, Zhang Y. & Chen L.** 2009. Determination of Tetracyclines in Food Samples by Molecularly Imprinted Monolithic Column Coupling with High Performance Liquid Chromatography. *Talanta*, 79, 926-934.
33. **Sundin GW.** 2003. Tetracycline. Encyclopedia of Agrochemicals. John Wiley & Sons, New Jersey: 1521-1522.
34. **Tavares MFM. & McGuffin VL.** 1994. Separation and Characterization of Tetracycline Antibiotics by capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 686, 129-142.
35. **Tsai WH, Huang TC, Huang JJ, Hsue YH. & Chuang HY.** 2009. Dispersive Solid-Phase Microextraction Method for Sample Extraction in the Analysis of Four Tetracyclines in Water and Milk Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(12), 2263-2269.
36. **Taokaenchan N. & Sangrichan S.** 2008. Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Honey Samples Collected from Northern Part of Thailand by HPLC. *KMITL Science Journal Section B*, 8(2), 18-25.
37. **Vinas P, Balsalobre N, Lopez-Erroz C. & Hernandez-Cordoba M.** 2004. Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection for the Analysis of Tetracycline Residues in Honey. *Journal of Chromatography A*, 1022, 125-129.
38. **Wan GH, Cui H, Zheng HS, Zhou J, Liu LJ. & Yu XF.** 2005. Determination of Tetracyclines Residues in Honey Using High-Performance Liquid Chromatography With

- Potassium Permanganate-Sodium Sulfite-B-Cyclodextrin Chemiluminescence Detection. *Journal of Chromatography B*, 824, 57-64.
39. **Wang LF, Peng JD. & Liu LM. 2008.** A Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography Coupled with Resonance Rayleigh Scattering Detection for the Determination of Four Tetracycline Antibiotics. *Analytica Chimica Acta*, 630, 101-106.
 40. **Wang S, Yang P. & Cheng Y. 2007.** Analysis of Tetracycline Residues in Bovine Milk by CE-MS With Field-Amplified Sample Stacking. *Electrophoresis*, 28, 4173-4179.
 41. **Wasch KD, Okerman L, Croubels S, De Brabander D, Van Hoof J. & De Backer P. 1998.** Detection of Residues of Tetracycline Antibiotics in Pork and Chicken Meat: Correlation Between Results of Screening and Confirmatory Tests. *Analyst*, 123, 2737-2741.
 42. **Wen Y, Wang Y. & Feng YQ. 2006.** Simultaneous Residue Monitoring of Four Tetracycline Antibiotics in Fish Muscle by in-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography. *Talanta*, 70, 153-159.
 43. **Xu JZ, BinWu TD, Yang WQ, Zhang XY, Liu Y, Shen CY. Et al. 2008.** Analysis of Tetracycline Residues in Royal Jelly by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 868, 42-48.
 44. **Yu H, Tao Y, Chen D, Wang Y. & Yuan Zonghui. 2011.** Development of an HPLC-UV Method for the Simultaneous Determination of Tetracycline in Muscle and Liver of Porcine, Chicken, and Bovine with Accelerated Solvent Extraction. *Food Chemistry*, 124, 1131-1138.
 45. **Zhenfeng Y, Yueming Q, Xiuyun L. & Caini J. 2006.** Determination of Multi-Residues of Tetracyclines and Their Metabolites in Milk by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Positive-Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 34(9), 1255-1259.
 46. **Zhao J, Xue X, Li Y, Zhang J, Chen F, Wu L, et al. 2009.** Multiresidue Determination of Tetracycline Antibiotics in Propolis by Using HPLC-UV Detection with Ultrasonic-Assisted Extraction and Two-Step Solid Phase Extraction. *Food Chemistry*, 115, 1074-1080.