

KAJIAN PUSTAKA ANALISIS RESIDU KOKSIDIOSTAT DI DALAM PRODUK MAKANAN

Muhammad Zahid

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

ABSTRAK

Koksidiostat digunakan untuk mengendalikan penyakit infeksi yang disebabkan oleh protozoa pada berbagai hewan ternak. Umumnya koksidiostat digunakan sebagai imbuhan pakan yang bermanfaat untuk mempertahankan kesehatan hewan dan dalam beberapa kasus dapat meningkatkan konversi pakan. Obat ini digolongkan ke dalam 2 (dua) kelompok, yaitu koksidiostat non ionofor (kimia) dan koksidiostat polieter karbosiklik ionofor (alami). Sejak akhir tahun 1990an, dilaporkan di beberapa negara bahwa residu koksidiostat sering ditemukan di dalam daging dan telur. Untuk menghindari kontaminasi maupun akumulasi dari residu koksidiostat yang melebihi ambang batas maksimum residu (BMR) di dalam produk makanan, perlu dikembangkan metode analisis untuk mendeteksi residu tersebut. Ini diperlukan untuk memastikan makanan yang aman bagi kesehatan manusia. Di dalam tulisan ini dibahas metode analisis kimia untuk deteksi residu koksidiostat, diantaranya metode *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* dan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / Tandem (LC-MS/MS)*.

Kata kunci: koksidiostat, residu, metode analisis, HPLC, LC-MS/(MS)

ABSTRACT

Coccidiostats are used to control infectious diseases caused by protozoa in various farm animals. Generally, coccidiostats are applied as feed additives that are beneficial to maintain animal health and in some cases enhance feed conversion. These drugs are categorized into two groups, i.e. non ionophoric coccidiostat (chemical) and ionophoric carbocyclic polyether coccidiostat (natural). Since the late 1990s, coccidiostats have been frequently found in meat and eggs reported by a number of countries. To prevent from contamination and accumulation of coccidiostat residues that are exceeded from maximum residue limit requirement in animal food products, it is necessary to develop analytical method that is able to detect such residues. It is essential to ensure safe food for human health. This paper discusses chemical based-methods for the detection of coccidiostat residues, i.e. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / Tandem (LC-MS/MS).

Key words: coccidiostat, residue, analytical method, HPLC, LC-MS/(MS)

PENDAHULUAN

Obat-obat koksidiostat digunakan secara luas untuk mengobati koksidiosis, khususnya pada peternakan. Beberapa dari obat ini juga digunakan pada hewan peliharaan termasuk sapi dan kambing. Koksidiostat dapat dikategorikan sebagai ionofor polietir (alamiah), seperti monensin, narasin, lasalocid, salinomycin, dan maduramicin, serta koksidiostat sintetik, seperti halofuginone, robenidine, diclazuril, dan nicarbazin ⁽³⁴⁾. Karena penggunaan koksidiostat secara intensif pada peternakan baik sebagai pengobatan maupun tambahan pakan (*feed additive*) dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi. Ini memiliki potensi untuk menyebabkan terjadinya efek toksik pada hewan non-target dan menghasilkan residu yang tidak diinginkan di dalam makanan. Efek bahaya pada hewan dapat terjadi jika obat tersebut memiliki batas keamanan rendah (*low margin of safety*) terhadap spesies tertentu ⁽⁸⁵⁾ atau karena interaksi obat antara tiamulin dan ionofor. Tiamulin dapat menghambat metabolisme dan eliminasi ionofor, menyebabkan akumulasi sel dan toksisitas akut pada babi ⁽⁹³⁾.

KOKSIDIOSIS

Koksidiosis merupakan penyakit infeksi saluran cerna yang disebabkan oleh protozoa parasit dari Phylum *Apicomplexa*. Parasit berasal dari genus *Eimeria* yang akan menyebabkan prevalensi pada kondisi lembab dan hangat pada peternakan intensif, seperti pada babi ^(3, 97), unggas ⁽¹⁰¹⁾, sapi ⁽⁸⁰⁾, domba ⁽²³⁾, dan kelinci ⁽²⁾. Kandang yang terlalu penuh, pelaksanaan higiene yang buruk, dan tidak mengisolasi hewan yang terinfeksi merupakan beberapa faktor yang dapat menimbulkan koksidiosis. Parasit ditransmisikan melalui *oocyst*, dibuang bersama feses dari inang yang terinfeksi, dan ditelan oleh hewan yang tidak terinfeksi

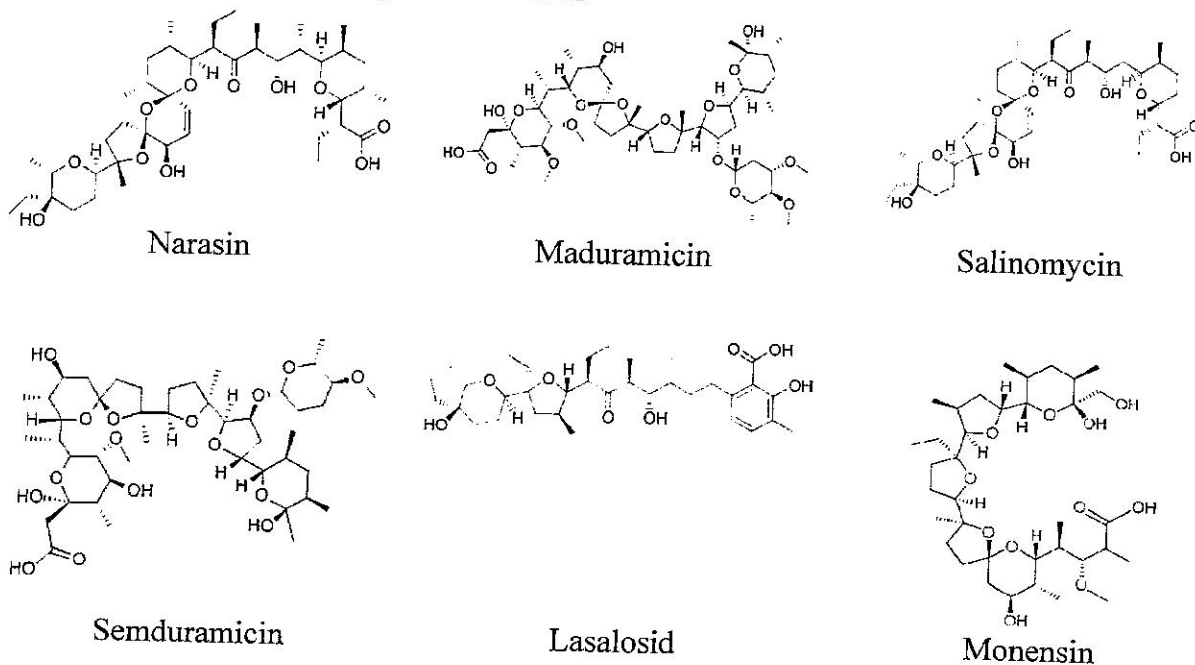
⁽¹⁰⁰⁾. Begitu tertelan, sporozoit-sporozoit dilepaskan dari *oocyst* ke dalam sel epitel pada usus. Sejumlah hasil dari siklus aseksual di dalam pertumbuhan merozoit yang membedakan terhadap tahapan seksual. Makrogamet betina dibuahi oleh makrogamet jantan untuk menghasilkan *oocyst* yang dilepaskan yang berpotensi menginfeksi hewan lain yang dikonsumsi. Penyakit ini dapat menyebabkan lesi pada usus, diare, penurunan berat badan, konversi pakan yang buruk, dan beberapa kasus kematian. Sebagai contohnya pada tahun 2009 di Amerika Serikat mengalami kerugian ekonomi hingga \$127 juta pertahunnya akibat penyakit koksidiosis ⁽²²⁾.

KOKSIDIOSTAT

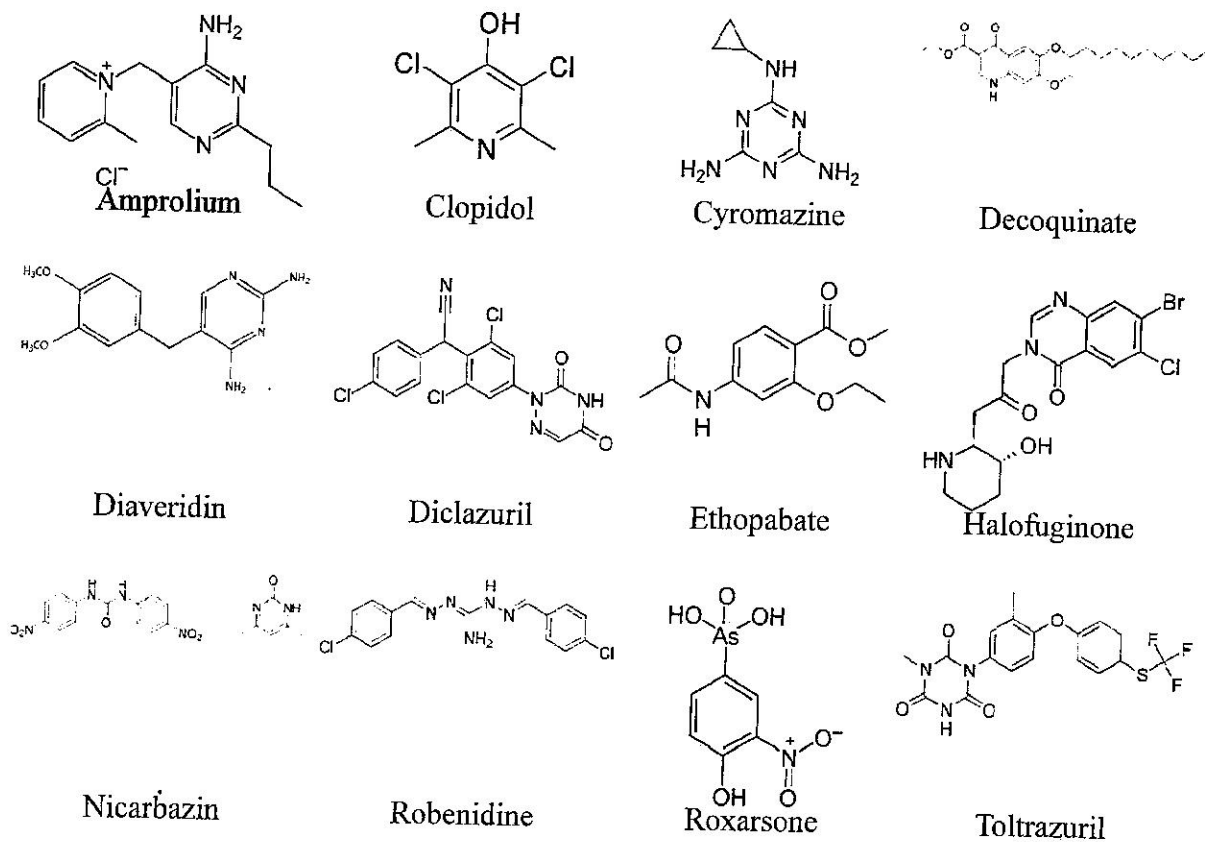
STRUKTUR KIMIA

Koksidiostat ionofor (*ionophore*) diproduksi oleh 53 bakteri yang berbeda dari familia *Streptomyetaceae*. Obat ini digolongkan dengan cincin *tetrahydrofuran* banyak (*multiple tetrahydrofuran rings*) yang dihubungkan bersama dalam membentuk spiroketal *moieties* ⁽⁹²⁾ seperti yang terlihat pada Gambar 1. Secara struktur kimia koksidiostat dapat dibagi menjadi kuinolon, piridon, alkaloid, guanidin, analog tiamin, dan derivat triazin ⁽⁶¹⁾. Kuinolon pertama kali ditemukan tahun 1962 dan sejak saat itu mengalami modifikasi terus terhadap inti kuinolin (*quinoline nucleus*) untuk memperbaiki kinerja farmakokinetik dan spektrum antimikroba ⁽⁴¹⁾. Derivat guanidin seperti robenidin memiliki ikatan sentral imin (*imine central bond*) yang mengandung ikatan ganda karbon-nitrogen, dengan atom nitrogen berikatan dengan sebuah atom hidrogen atau kelompok organik. Derivat triazin dapat dibagi menjadi 2 sub kelompok: asimetrik (1,2,4) triazin dan simetrik (1,3,5) triazin. Kedua sub kelompok ini mengandung sebuah cincin heterosiklik yang dianalogikan ke cincin benzen tetapi

dengan 3 atom karbon yang digantikan gugus fungsional hidroksietil seperti tiamin, oleh atom nitrogen. Amprolium merupakan sehingga tidak bersifat *phosphorylated* analog dari tiamin (Vitamin B₁) yang serupa terhadap analog *pyrophosphate* (61). secara struktur kimia. Namun, tidak memiliki



Gambar 1. Struktur molekul polieteter ionofor (koksidiostat alami)



Gambar 2. Struktur molekul koksidiostat kimia (sintetis)

Umumnya koksidiostat digunakan sebagai imbuhan pakan pada ternak hewan besar maupun ternak unggas. Di industri ternak unggas, khususnya untuk ayam pedaging (*broiler*) koksidiostat digunakan dalam bentuknya garam natrium (*sodium salt*) pada dosis 75-125 mg/kg (lasalocid), 60-125 mg/kg (monensin), 20-70 mg/kg (salinomycin), 60-70 mg/kg (narasin), 5 mg/kg (maduramicin), dan 20-25 mg/kg (semduramicin) ^(4, 5, 6). Sedangkan untuk ternak hewan besar, contohnya sapi, penggunaan koksidiostat berguna untuk meningkatkan efisiensi pakan. Level dosis aman koksidiostat untuk sapi lebih rendah dibandingkan dengan unggas, misalnya untuk monensin 30-45 mg/kg, lasalocid 10-35 mg/kg, dan narasin 25 mg/kg ^(58, 66).

Waktu henti obat (*withdrawal period*) untuk lasalocid, salinomycin, narasin, maduramicin, dan semduramicin adalah 5 hari, sedangkan untuk monensin adalah 3 hari. Waktu henti obat diperlukan untuk menghindari residu koksidiostat di dalam produk makanan. Koksidiostat tidak digunakan dalam pengobatan manusia karena efek kardiovaskular, bahkan lasalocid dengan konsentrasi <1,0 μ M dapat menyebabkan kontraksi pada jantung manusia ⁽⁷⁹⁾.

MEKANISME KERJA

Ionofor membentuk kompleks dengan berbagai ion-ion khususnya natrium, kalium, dan kalsium, dan membawa ion-ion ini ke dalam dan melalui membran ^(6, 8). Sebagai hasil dari mekanisme kerja ini, ionofor memiliki aktifitas luas terhadap protozoa dan telah digunakan secara luas. Voet dan Voet (2004) mengklasifikasikan ionofor ke dalam 2 kelompok berdasarkan bagaimana mereka membawa ion-ion melintasi membran, yaitu pembawa ion (*ion carriers*) dan pembentuk lintasan (*channel formers*). Pembawa ion, seperti lasalocid, membentuk sebuah kompleks dengan ion-ion, melindungi muatannya

sehingga memungkinkan pergerakannya melintasi dua lapisan lemak hidrofobik (*hydrophobic lipid bilayer*). Ionofor pembentuk lapisan, seperti gramicidin, memberikan ruang pergerakan dari ion-ion melintasi membran dengan menghasilkan lintasan hidrofilik (*channel hydrophilic*) untuk ion-ion tersebut ⁽¹⁶⁾. Gangguan dari konsentrasi ion transmembran mencegah fungsi normal dan akan membunuh koksidia. Ionofor mempengaruhi baik tahapan ekstra dan intraseluler dari parasit, khususnya selama pengembangan dari tahapan awal dan aseksual. Ionofor umumnya menekan asupan pakan (*feed intake*), akan tetapi meningkatkan berat badan. Menyertakan atau menambahkan ionofor ke dalam pakan unggas telah diketahui mengurangi konsumsi pakan namun meningkatkan konversi pakan ⁽⁸⁾.

Koksidiostat kimia berfungsi dalam berbagai cara dan sering bertindak dalam perkembangan spesifik dari parasit. Amprolium menghambat serapan tiamin oleh *schizont* generasi kedua dari *Eimeria tenella* dan sehingga mencegah pembentukan *coenzyme* tiamin yang dibutuhkan oleh banyak reaksi metabolik penting ⁽⁵⁶⁾. Clopidol, buquinolate, decoquinolate, dan nequinolate menghambat produksi energi mitokondria selama tahapan awal dari perkembangan *Eimeria*, akan tetapi bekerja pada strain yang berbeda dari koksidia ^(7, 39). *Ethopabate* adalah sebuah struktur antagonis dari asam folat atau dari prekursoranya *para-aminobenzoic acid* (PABA). Mekanisme kerjanya menghambat sintesis asam nukleat, sehingga mengurangi produksi dari sel-sel baru ⁽⁷⁾. Nicarbazin merupakan koksidiostat pertama yang memiliki spektrum kerja luas dan telah digunakan sejak 1950 ⁽⁷⁾. Obat ini digunakan secara propilaktik di dalam pakan *broiler* dan khasiatnya akan timbul pada hari ke-5 di dalam siklus hidup dari perkembangan koksidia sehingga mengurangi kerusakan jaringan. Aksi kerjanya ini melalui penghambatan

dari suksinat (*succinate*) terikat reduksi *nicotinamide adenine dinucleotide* dan *energy-dependent transhydrogenase*, dan akumulasi dari kalsium dengan adanya *adenosine-5'-triphosphate*.

LEGISLASI / ATURAN

Penggunaan antikoksidia dalam pakan tertuang di dalam Surat Edaran Direktur Jenderal Peternakan No. TN. 260/720/DKH/0894 yang menyebutkan pada prinsipnya antikoksidia tidak boleh dicampur dengan pakan serta tidak boleh dikombinasikan dengan vitamin, mineral, dan atau asam amino yang dipakai melalui air minum atau pakan kecuali yang diperbolehkan sebagaimana diatur dalam SK Direktur Jenderal Peternakan No.806/Kpts/TN.260/12/94 tentang Klasifikasi Obat Hewan. Kelompok antikoksidia yang diperbolehkan dicampur di dalam pakan adalah: aklomide, amprolium, butynorate, klopidiol, decoquinate, ethopabate, furazolidone, halquinol, nitrofurazon, olaquindoks, dan sulfanitran. Sedangkan kelompok antibiotik yang diperbolehkan dicampur di dalam pakan antara lain: avilamisin, avoparsin, basitrasin zink, enramisin, flavomisin, higromisin B, kitasamisin, kolistin sulfat, lasalosis, linkomisin hidroklorida, maduramisin,

monensin natrium, narasin, nistatin, salinomisin natrium, spiramisin (base, embonat), tiamulin hidrogen fumarat, tilosin, dan virginiamisin⁽⁹⁾.

Di negara eropa, antibiotik golongan ionofor seperti salinomycin, narasin, monensin, lasalosis, maduramicin, dan semduramicin, termasuk koksidiostat seperti robenidine, decoquinate, halofuginone, nicarbazin, dan diclazulir dibawah lisensi Uni Eropa (*European Union*, EU) imbuhan pakan zooteknik (*zootechnical feed additives*) dibawah aturan 1831/2003/EC. Penilaian terhadap imbuhan pakan diatur oleh *European Food Safety Authorization* (EFSA) dan yang berkenaan dengan keamanan konsumen membutuhkan penetapan batas maksimum residu dan pengawasan berkelanjutan diperlukan sebagai bagian dari penilaian ilmiah. Selain itu koksidiostat seperti amprolium, decoquinate, diclazulir, halofuginone, lasalocid, monensin A, dan toltrazulir juga terdaftar sebagai obat hewan dan memiliki BMR yang diatur oleh *European Commission* (EC) No. 470/2009⁽⁸⁾. Obat-obat ini dapat digunakan jika terjadi wabah koksidiosis secara sporadis, berkembangnya resistensi obat atau ketika vaksin sudah tidak efektif lagi melawan strain tertentu dari koksidiosis⁽²⁷⁾. Nilai BMR dari obat-obat tersebut di atas tertuang di dalam *commission regulation* no. 37/2010⁽⁷⁾.

Tabel 1. BMR untuk residu koksidiostat di dalam jaringan hewan (*edible tissues*)

Obat	Species	BMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
		Telur	Susu	Hati	Ginjal	Otot	Lemak
Lasalocid sodium ^{c,d,e,f}	Ug	150		100	50	20	100 kulit/lemak
	NT		1	50	50	5	5
Narasin	B			100	20	10	20
	AB			50	50	50	50
	NT	2	2	50	5	5	5

Salinomycin sodium ^{c,d}	AB			5	5	5	5
	KP						
Monensin sodium ^{c,d,e}	NT	3	2	5	2	2	2
	AB, AL, K			8	8	8	25 kulit/lemak
	B		2	30	2	2	10
Semduramicin ^d	NT	3	2	8	2	2	2
	AB						
Maduramicin ^{d,e}	NT	2	2	2	2	2	2
	AB			150	100	30	150
	K						
Robenidine ^{d,e}	NT	2	2	2	2	2	2
	AB			800	350	200	1300 kulit/lemak
	T			400	200	200	400 kulit/lemak
	KPB			200	200	100	100
Decoquinat ^{c,d}	NT	25	5	50	50	5	50 kulit/lemak
	AB						
	B, O	#					
Halofuginone ^{c,d}	NT	20	20	20	20	20	20
	AB, K						
	B			30	30	10	25
Nicarbazin ^{d,e}	NT	6	1	30	30	3	3
	AB			15.000	6000	4000	4000 kulit/lemak
Diclazuril ^{c,d,e}	NT	100	5	100	100	25	25
	AB, T			1500	1000	500	500 kulit/lemak
	KPB			2500	1000	150	300
	R, P	#					
Amprolium ^c	NT	2	5	40	40	5	5
	Ug	#					
Imidocarb ^c	B		50	2000	1500	300	50
Toltrazuril ^c	O			2000	1500	300	50
	AMFPS ^a			500	250	100	150
	Ug			600	400	100	200

Ket: AMFPS = *all mamalian food-producing species*, B = bovine, AB = ayam broiler, AL = ayam layer, NT = *non-target species* (spesies yang secara tidak sengaja terpapar residu koksidiostat karena mengonsumsi pakan terkontaminasi), O = ovine, P = *porcine*, U = Unggas, KP = kelinci pedaging, KPB = kelinci pedaging dan breeding, R = ruminan, K = kalkun, # = BMR tidak diperlukan

^a tidak digunakan untuk hewan yang susunya diproduksi untuk konsumsi manusia

^b tidak digunakan untuk hewan yang telurnya diproduksi untuk konsumsi manusia

^c *commission regulation* No. 37/2010

^d *commission regulation* No. 124/2009

^e *community register of feed additives*

^f *commission implementing regulation* No. 86/2012

RESIDU KOKSIDIOSTAT DALAM MAKANAN

Penjelasan di bawah ini merupakan metode analisis yang umum dikembangkan dan digunakan untuk menganalisis residu koksidiostat di dalam produk makanan maupun pakan. Adapun metode analisis tersebut meliputi prosedur persiapan sampel serta metode deteksi, antara lain metode HPLC, LC-MS(/MS), dan metode *immunoassay*.

METODE ANALISIS

a. Prosedur persiapan sampel untuk metode *high performance liquid chromatography* HPLC-UV (Ultraviolet) atau HPLC-FLD (fluoresens)

Koksidiostat bersifat sangat polar (misal: amprolium) hingga berupa molekul lipofilik / senyawa non polar, sebagai contohnya adalah diclazuril dan golongan ionofor. Sebagai hasilnya, obat ini sangat sulit untuk dipisahkan secara selektif dari matriks sampel kompleks di dalam metode tunggal. Akibatnya diperlukan suatu prosedur pembersihan (*clean-up*) sampel yang lebih intensif dengan aplikasi berdasar HPLC, yang umumnya melalui pengujian residu tunggal atau untuk obat dalam kelas kimia yang *sama* (*same chemical class*), seperti: ionofor. Ekstraksi pelarut (*solvent*) diikuti dengan pemurnian (*purification*) menggunakan pemisahan cair-cair (*liquid-liquid partitioning*) atau pemisahan fase padat (*solid phase extraction*) merupakan metode paling luas digunakan pada persiapan sampel untuk analisis koksidiostat. Beberapa penelitian dilaporkan menggunakan metode terbaru untuk prosedur pemisahan / isolasi, diantaranya *immunoaffinity chromatography*⁽⁹¹⁾, *supercritical fluid extraction*^(74, 75), *molecular imprinted polymers* (MIPs)⁽¹¹¹⁾, dan *Magnetic MIPs*⁽¹¹²⁾. Berikut cara persiapan sampel berdasarkan jenis koksidiostat:

Koksidiostat Kimia

Matter dkk. (1990) mengembangkan kan sebuah prosedur pembersihan *on-line dialysis* untuk pemisahan clopidol dari kuning telur, putih telur, dan telur utuh (*whole egg*) sebelum dideteksi oleh HPLC-UV. Metode ini berhasil mendeteksi residu clopidol terhadap 12 dari 112 sampel telur komersial. Residu clopidol yang terdeteksi berkisar antara 10 – 433 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Horii dkk. (1994) mengisolasi decoquinat, ethopabate, dan nicarbazin dari daging unggas dengan asetonitril dan dimurnikan dengan *silica SPE cartridge* sebelum dianalisis dengan HPLC. Beier dkk. (1998) mengekstraksi residu halofuginone dari hati unggas dengan etil asetat dan C_{18} SPE. Sampel jaringan dicerna secara enzimatis dengan tripsin sebelum diekstraksi. Kao dkk. (2001) memisahkan 13 residu obat hewan, termasuk clopidol dan ethopabate dari daging unggas dan babi dengan asetonitril, dihilangkan lemaknya (*deffated*) dengan n-heksan sebelum dibersihkan dengan Sep-Pak C_{18} *cartridge*.

Kanda dkk. (2003) mengembangkan sebuah metoda untuk menentukan diclazuril dan nicarbazin di dalam jaringan unggas berdasarkan ekstraksi asetonitril, *defatting* dengan n-heksan dan purifikasi *liquid liquid partitioning* (LLP) sebelum analisis dengan HPLC. Selanjutnya Capurro dkk. (2005) mengekstraksi nicarbazin dari hati unggas dengan asetonitril dan heksan dan dimurnikan dengan C_{18} *SPE cartridge* sebelum deteksi dengan HPLC-UV. Qi dkk. (2007) menggunakan *matrix solid phase dispersion* (MSPD) untuk memisahkan residu toltrazuril dan diclazuril. Nilai perolehan kembali (*recovery*) >71% dan variasi presisi <12%. Liu dkk. (2010) mengisolasi residu robenidine dari jaringan dan telur ayam dengan asetonitril diikuti pembersihan dengan HLB *SPE cartridge*.

Ionophore

Tarbin dan shearer (1992) mengekstraksi lasalocid dari telur dan daging unggas dengan asetonitril, sebelum pemisahan cair-cair dengan NaCl jenuh (*saturated*), karbon tetraklorida, dan pembersihan dengan silica SPE sebelum analisis HPLC-FLD. Nilai perolehan kembali masing-masing untuk telur dan daging unggas adalah telur >65% dan >76%. Ericson dkk. (1994) mengisolasi residu semduramicin dari hati menggunakan metanolik ammonium hidroksida dan SPE sebelum purifikasi. Gerhardt dkk. (1995) memisahkan residu lasalocid, monensin, narasin, dan salinomycin dari jaringan otot menggunakan etil asetat-isooktan diikuti dengan pembersihan silica SPE. Nilai rata-rata perolehan kembali residu lasalocid, monensin, salinomycin, dan narasin masing-masing adalah 71, 94, 97, dan 94%.

Metode ini telah banyak digunakan oleh peneliti lain diantara Ward dkk. (2005) dan Wu dkk. (2009). Matabudul dkk. (2000) mengembangkan metode cepat dan mudah untuk mengisolasi residu lasalocid dari telur dan jaringan, yang mampu mendeteksi 30 – 40 sampel dalam sehari. Sampel telur hanya dicampur dengan H_2SO_4 dan diekstraksi dengan asetonitril. Nilai *recovery* berkisar antara 87 – 109% untuk sampel yang difortifikasi dengan konsentrasi 10-200 $\mu g kg^{-1}$. Tarbin dkk. (2002) mengembangkan sebuah metode untuk menentukan lasalocid daging yang diproses dan dibumbui (*processed and spiced meat*) dengan menggunakan sistem deteksi yang sama. Pembersihan selanjutnya dari ekstrak menggunakan NH_2 cartridge yang diperlukan untuk mengurangi gangguan matriks (*matrix interference*). Nilai *recovery* berkisar antara 74% untuk sosis dan 96% untuk kue lapis daging (*meat pies*).

b. Prosedur persiapan sampel untuk metode LC-MS atau LC-MS/MS

Protokol persiapan sampel yang lebih dasar dapat digunakan untuk memisahkan

residu koksidiostat sebelum ke LC-MS/(MS) karena selektifitas yang tinggi dari detektor spektrometrik. Dalam metode sebelumnya, lasalocid diekstraksi dari telur pada pH asam menggunakan asetonitril dan dimurnikan dengan LLP sebelum dianalisis⁽¹⁸⁾. Selanjutnya peneliti yang sama mengembangkan sebuah metode multi residu untuk menentukan residu monensin, salinomycin, dan narasin di dalam otot, hati, dan telur diikuti ekstraksi dengan MeOH dan pembersihan LLP⁽¹⁹⁾. Blanchflower dkk. (1997) mengembangkan sebuah protokol untuk pemisahan dua komponen aktif dari nicarbazin dari sampel telur berdasarkan ekstraksi dengan asetonitril dan *defatting* dengan n-heksan. Pang dkk. (2000) mengembangkan suatu metode untuk mengisolasi residu clopidol dari jaringan ayam berdasarkan ekstraksi asetonitril diikuti pembersihan dengan alumina SPE. *Recovery* berkisar antara 92 – 97%. Rosén (2001) mengembangkan metode untuk mengisolasi residu ionofor dari sampel telur dan hati menggunakan pembersihan SPE otomatis dengan sistem *Gilson AspecXL*. Residu ionofor diekstraksi menggunakan metanol 87% yang diaplikasikan ke dalam 100 mg kolom C_{18} dan dilusikan dengan 800 μL metanol sebelum dianalisis dengan LC-MS/MS. Prosedur ini kemudian dimodifikasi dan digunakan untuk mendeteksi residu monensin di dalam lemak, hati, dan jaringan otot⁽²⁴⁾. Matabudul dkk. (2002) mengembangkan protokol persiapan sampel yang sederhana untuk mengisolasi residu dari empat ionofor dan dinitrocarbanilidine dari telur dan hati. Sampel dicampur dengan Na_2SO_4 diekstraksi dengan asetonitril dan dimurnikan dengan *cartridge silica* SPE. *Recovery* (peroleh kembali) >86 dan 92% untuk masing-masing telur dan hati. Metode ini telah digunakan oleh banyak peneliti untuk analisis ionofor^(32, 50, 57, 68, 94). He dkk. (2005) Mengekstraksi clopidol dari otot unggas dengan asetonitril sebelum pembersihan pada *basic alumina sorbent*. Nilai tengah (*mean*) *recovery* dan

presisi masing-masing adalah >65% dan <15%.

Saat ini banyak peneliti yang mengembangkan metoda analitik untuk analisis koksidiostat yang lebih luas. Oleh karena itu dibutuhkan prosedur persiapan sampel yang memadai guna memisahkan residu koksidiostat yang lebih beragam. Mortier dkk. (2003) mendeteksi halofuginone, robenidine, diclazulir, nicarbazin, dan dimetridazole di dalam telur dengan LC-MS/MS. Sampel diekstraksi dengan asetonitril, dikeringkan dengan evaporasi, direkonstitusi dengan asetonitril/air dan disaring sebelum dianalisis dengan LC-MS/MS. Dubois dkk. (2004) mengembangkan suatu metoda untuk mendeteksi 9 koksidiostat di dalam telur dan otot berdasarkan prosedur yang dikembangkan oleh Matabudul dkk. (2002). Dubreil-Cheneau dkk. (2009) mengembangkan metode LC-MS multi-residu untuk 10 dari 11 koksidiostat (halofuginone, robenidine, diclazulir, nicarbazin, monensin, narasin, lasalosisid, salinomycin, maduramicin, dan semduramicin) dengan non-target MLs di dalam telur. Residu koksidiostat diekstraksi dengan asetonitril, dievaporasi, dan dilarutkan di dalam campuran natrium asetat/asetonitril sebelum dianalisis. Galarini dkk. (2009) mengekstraksi 11 koksidiostat dari telur dengan asetonitril, dihilangkan lemaknya dengan heksan dan dimurnikan dengan silica SPE. Presisi *within laboratory repeatability* (WLR) dan *within laboratory reproducibility* (WLR) masing-masing berkisar antara 1,1 – 19% dan 1,7 – 30%. Prosedur pembersihan yang lebih intensif diperlukan untuk memisahkan residu koksidiostat dari matriks yang lebih kompleks seperti hati. Olejnik dkk. (2009) mengembangkan metode multi-residu yang mampu mendeteksi 12 koksidiostat di dalam hati ayam, yang terdiri atas ionofor (lasalosisid, maduramicin, monensin, narasin, salinomycin, semduramicin) dan koksidiostat kimia (clazulir, decoquinat, diclazulir, halofuginone, nizarbazin, dan robenidine).

Sampel diekstraksi dengan asetonitril sebelum dimurnikan dengan kolom alumina dan Oasis HLB SPE.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa analisis koksidiostat dapat dilakukan di dalam telur atau daging tanpa purifikasi sampel dan diikuti dengan ekstraksi asetonitril. Shao dkk. (2009) mengekstraksi 14 residu koksidiostat dari telur dan daging dengan asetonitril, ekstrak dipisahkan sebelum dianalisis dengan UHPLC-MS/MS. *Recovery* dari telur dan daging fortifikasi berkisar antara 78 – 125%. Stubbings dan Bigwood (2009) mengembangkan metode multikelas untuk mengisolasi berbagai residu obat termasuk ionofor dan nicarbazin dari jaringan otot ayam dengan menggunakan metoda QuEChERS, yang merupakan kepanjangan dari *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, dan Safe*. Sampel disiapkan dengan metoda QuEChERS yang dimodifikasi berdasarkan ekstraksi dengan Na₂SO₄ dan 1% asetat di dalam asetonitril diikuti dengan pembersihan *NH₂ dispersive SPE* (dSPE). Wang dkk. (2012) menggunakan metoda modifikasi QuEChERS yang mirip untuk memisahkan cyromazine dan melamine dari telur dan jaringan otot ayam. Sampel diekstraksi menggunakan asetonitril yang diasamkan (*acidified MeCN*) dan dimurnikan menggunakan tabung dSPE mengandung magnesium sulfat anhidrat dan 10 mg *graphitized carbon black*.

Moloney dkk. (2012) mengembangkan suatu metoda LC-MS/MS untuk mendeteksi 20 residu koksidiostat di dalam telur dan jaringan otot unggas. Peneliti mengevaluasi sorbent pembersihan (*cleanup sorbents*) yang berbeda dan menemukan bahwa koksidiostat non-polar tertahan sangat kuat pada sorbent silika dan hasil terbaik untuk berbagai analit dapat dicapai tanpa pembersihan. Metode ini dapat digunakan untuk melakukan studi validasi. Akan tetapi, studi terhadap efek matriks dari telur dan daging menunjukkan beberapa kelemahan dari metode ini. Di dalam telur, ditemukan bahwa

presisi untuk imidocarb dan diclazulir sangat tinggi yaitu masing-masing 140 dan 100%. Serupa, presisi tinggi untuk imidocarb, ethopabate, dan semduramicin di dalam sampel daging unggas, masing-masing 183, 29, dan 34%. Baik sampel telur maupun daging yang digunakan dalam studi matriks berasal dari berbagai sumber termasuk sistem produksi konvensional dan organik. Penulis juga mengevaluasi aplikasi dari metode untuk sampel hati yang tidak sesuai dengan beberapa analit karena efek supresi ion-ion. Clarke dkk. (2013) mengembangkan metode untuk mengukur residu koksidiostat di dalam sampel susu sapi dan otot dari berbagai spesies hewan (sapi, bebek, kuda, domba, dan babi). Sampel jaringan otot disiapkan menggunakan prosedur yang telah dijelaskan sebelumnya⁽⁸¹⁾. Sampel susu diekstraksi menggunakan prosedur QuEChERS. pH sampel diatur pada kondisi basa dengan NaOH dan sampel diekstraksi menggunakan campuran asetonitril, MgSO₄, dan NaCl. Metode yang dikembangkan ini menghasilkan sensitifitas yang kurang baik untuk halofuquinone di dalam jaringan kuda dan domba.

Ai dkk. (2011) menggunakan sistem pembersihan *gel permeation chromatography* (GPC) di dalam analisis residu diclazulir, toltrazulir, toltrazulir sulfoksida, dan toltrazulir sufon di dalam telur dan jaringan. Chico dkk. (2013) menggunakan metode pembersihan yang sama dan mengevaluasi kesesuaian pembersihan GPC untuk memisahkan sembilan residu koksidiostat di dalam telur diikuti ekstraksi dengan etil asetat. Analit dapat dideteksi hingga sub-ppb (*part per billion*) menggunakan LC-MS/MS. Kekurangan dari metode ini adalah menggunakan pelarut dalam volume yang sangat banyak di dalam prosedur ekstraksi yaitu 125 mL per sampel dibanding dengan metode lain dan membutuhkan instrumen HPLC untuk pembersihan GPC. Aplikasi dari pembersihan dengan GPC untuk

analisis koksidiostat perlu diinvestigasi lebih lanjut untuk memperlihatkan kelebihan dibanding dengan metode konvensional. Dimasa akan datang metode ini mungkin sangat berguna dalam aplikasi matriks sampel yang sulit. Penetapan batas maksimum non-target untuk koksidiostat di dalam makanan membuat beberapa peneliti mengembangkan metoda untuk matriks baru seperti susu. Thompson dkk. (2011) mengekstraksi lasalocid, monensin, narasin, dan salinomycin dari susu sapi dengan asetonitril tanpa pembersihan lebih lanjut. Perolehan kembali berkisar antara 60 – 118%. Metode ini kemudian digunakan untuk kegiatan survei, dimana ditemukan monensin pada 736 dari 1072 sampel susu yang diuji pada kisaran antara 0,1-0,53 µg kg⁻¹.

c. Metode deteksi

Deteksi imunokimia (*immunochemical*) untuk skrining residu koksidiostat

Metode *immunoassay* merupakan metode yang ekonomis (*low cost*), sangat spesifik, dan dapat digunakan untuk analisis terhadap sampel dalam jumlah yang sangat banyak. Metode ini dapat digunakan baik untuk skrining (uji kualitatif) maupun uji kuantitatif terhadap berbagai jenis residu obat hewan di dalam produk makanan. Tabel 2 di bawah menyajikan ringkasan mengenai metode *immunoassay* yang diaplikasikan untuk deteksi koksidiostat. Prinsipnya metode *immunoassay* ini melibatkan interaksi antibodi dan antigen untuk saling terikat satu sama lain melibatkan reaksi biokimia dengan bantuan enzim. Umumnya obat hewan memiliki berat molekul kecil sehingga perlu dikonjugasi dengan protein atau enzim guna merangsang respon imun di dalam tubuh hewan. Proses konjugasi dapat mempengaruhi sensitifitas dan spesifisitas dari molekul yang berikatan (*binding molecule*).

Koksidiostat ionofor seperti salinomycin, narasin, monensin, lasalocid,

maduramicin, dan semduramicin memiliki kelompok asam karboksilat, yang apabila diaktifkan akan memberikan mekanisme yang dapat digabung dengan *carrier protein* untuk menghasilkan kompleks imunogenik, yang dapat digunakan untuk memproduksi antibodi. Elissalde dkk. (1993) menggunakan kelompok fungsional asam untuk konjugasi untuk menghasilkan antibodi monoklonal terhadap salinomycin yang juga dapat mendeteksi senyawa yang secara struktur kimia serupa seperti narasin. Kennedy dkk. (1995a) menggunakan aktivasi *carbodiimide* sederhana dari asam karboksilat pada lasalocid untuk direaksikan dengan *carrier protein* menghasilkan immunogen. Selanjutnya immunogen tadi menghasilkan antiserum poliklonal yang digunakan untuk mengembangkan *indirect ELISA* untuk mendeteksi lasalocid di dalam serum, otot, dan hati ayam. Tidak kontaminasi silang yang diamati terhadap salinomycin, monensin, atau maduramicin.

Kennedy dkk. (1995b) juga mengembangkan ELISA untuk menentukan salinomycin di dalam matriks yang sama menggunakan immunogen yang sama dan metode persiapan sampel seperti lasalocid. Antiserum poliklonal yang diproduksi pada kelinci menghasilkan 100% reaksi silang (*cross-reactivity*) dengan struktur kimia sejenis narasin, tetapi tidak untuk lasalocid, maduramicin, atau monensin. Berikutnya kelompok peneliti lain juga menggunakan teknik yang serupa untuk mendeteksi residu maduramicin dan monensin^(31, 64). Peippo dkk. 2005 menjelaskan pengembangan TR-FIA (*Time-Resolved Fluoroimmunoassay*) untuk mendeteksi narasin di dalam plasma menggunakan antibodi poliklonal yang diproduksi pada domba, sedangkan Godfrey dkk. (1997) melaporkan sebuah metode untuk mendeteksi residu monensin dari berbagai matriks sampel unggas. Hagren dkk. (2006) menggunakan antibodi poliklonal dari kelinci untuk mendeteksi

residu monensin pada telur dengan metode yang sama. Metode TR-FIA ini memiliki kemampuan deteksi kurang dari 2 µg kg⁻¹.

Tidak seperti ionofor, koksidiostat kimia memiliki beberapa kendala berkenaan dengan produksi antibodi. Ini disebabkan karena kurangnya kelompok fungsional di dalam struktur molekulnya, sehingga memaksa peneliti untuk menggunakan *mimic* (senyawa serupa) atau memproduksi derivatnya agar dapat menyiapkan *immunogen*. Rowe dkk. (1994) mengembangkan sebuah metode untuk menyiapkan derivat asam suksinat dari amin sekunder (*secondary amine*) dari halofuginone dengan menghambat sementara kelompok hidroksil. Derivat tersebut selanjutnya digunakan untuk memproduksi antibodi monoklonal yang digunakan untuk mendeteksi haloquinone di dalam serum⁽¹⁴⁾. Peneliti yang sama menggabungkan *immunoassay* dan HPLC untuk mendeteksi haloquinone di dalam serum ayam⁽¹⁵⁾ dan hati ayam⁽¹¹⁾ dan melakukan studi terhadap sampel hati ayam yang diperoleh dari rumah potong komersial⁽¹²⁾. Hagren dkk. (2005) menggunakan protokol dari Rowe dkk. (1994) untuk memproduksi antibodi haloquinone poliklonal dengan metode TR-FIA untuk menganalisis residu haloquinone di dalam telur dan hati. Beier dkk. (2001) menggunakan *p-nitrosuccinanic acid* sebagai *mimic* untuk mengikat *dinitronicarbanilide* (DNC) yang merupakan komponen aktif dari nicarbazin untuk memproduksi antibodi monoklonal dengan menggunakan metode *indirect ELISA*. Hal yang sama juga dilakukan oleh Connolly dkk. (2002) dengan menggunakan 3 *mimic* yang berbeda dalam memproduksi immunogen dan *enzyme labels*. Mereka menemukan bahwa 2 *mimic* (*N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-4-nitroanilide* dan *p-nitrosuccinanic acid*) menghasilkan respon imun terbaik dan format ELISA heterolog bekerja sangat baik untuk semua antibodi yang dihasilkan.

Tabel 2. Ringkasan metode *immunoassay*

Target analit	Matriks	Ekstraksi	Tipe Uji	Sensitifitas	Pustaka
Salinomycin, narasin	Hati	Ekstraksi dapar	ELISA, mAb	10 µg kg ⁻¹ LOD	36
Lasalocid	Serum Otot Hati	MeCN/garam + cuci heksan + SPE	ELISA, pAb	0,016 ng mL ⁻¹ LOD 0,01 µg kg ⁻¹ LOD 0,09 µg kg ⁻¹ LOD	62
Salinomycin	Serum Otot Hati	MeCN/garam + cuci heksan + SPE	ELISA, pAb	0,1 ng mL ⁻¹ LOD 0,18 µg kg ⁻¹ LOD 0,17 µg kg ⁻¹ LOD	63
Maduramicin	Serum Otot Hati	Etil asetat/NaOH Etil asetat/NaOH MeCN/garam/SPE	ELISA, pAb	0,02 ng mL ⁻¹ LOD 0,01 µg kg ⁻¹ LOD 0,01 µg kg ⁻¹ LOD	64
Narasin	Plasma	MeCN	TR-FIA, pAb	1,5 ng mL ⁻¹ LOD	88
Monensin	Otot Ginjal Hati Lemak Kulit	<i>Papain digest</i> + IAC	<i>Chemiluminescent</i> ELISA, pAb	1,17 µg kg ⁻¹ LOD 1,2 µg kg ⁻¹ LOD 0,09 µg kg ⁻¹ LOD 1,04 µg kg ⁻¹ LOD 1,99 µg kg ⁻¹ LOD	44
Monensin	Telur	MeCN	TR-FIA, pAb	<2 µg kg ⁻¹ CCβ	47
Halofuginone	Serum	<i>Buffer dilution</i>	ELISA, mAb	0,05 ng well ⁻¹ LOD	96
Halofuginone	Serum	<i>Buffer dilution</i>	ELISA, mAb	0,52 ng mL ⁻¹ LOD	15
Halofuginone	Hati	<i>Buffer extraction</i>	ELISA, mAb	38 µg kg ⁻¹ LOD	11, 12
Halofuginone	Telur & hati	MeCN + cuci heksan	TR-FIA, pAb	1,7 & 1,0 µg kg ⁻¹ LOD	47
Nicarbazin	NA	NA	ELISA, mAb	100 ng mL ⁻¹ LOD	13
Nicarbazin	NA	NA	ELISA, pAb	2,3-7,6 ng mL ⁻¹ IC ₅₀	29
Nicarbazin	Telur & hati	MeCN + cuci heksan	TR-FIA, pAb	3,2 & 11,3 µg kg ⁻¹ LOD	46
Nicarbazin	Telur & hati	MeCN + cuci heksan	<i>Optical biosensor</i> , pAb	19 & 17 µg kg ⁻¹ LOD	78
Nicarbazin	Telur Otot	MeCN + cuci heksan	ELISA, pAb	<3 µg kg ⁻¹ CCβ <10 µg kg ⁻¹ CCβ	54
Halofuginone	Telur Otot	MeCN + cuci heksan	ELISA, pAb	<0,5 µg kg ⁻¹ CCβ <1 µg kg ⁻¹ CCβ	54
Nicarbazin	Pakan	Metanol	<i>Lateral flow device</i>	2 mg kg ⁻¹	20
Diclazulir	NA	NA	ELISA, pAb	1,5 ng mL ⁻¹ IC ₅₀	38
Robenidine				13 ng mL ⁻¹ IC ₅₀	
Toltrazulir sulfon	NA	NA	ELISA, pAb	18 ng mL ⁻¹ IC ₅₀	30

Deteksi HPLC-UV (ultraviolet) dan HPLC-FLD (fluoresens)

Kebanyakan koksidiostat kimia memiliki kromofor UV sehingga dapat langsung dianalisis dengan HPLC-UV. Metode HPLC-UV telah dikembangkan untuk mendeteksi residu clopidol⁽⁷⁷⁾, decoquinat⁽⁵¹⁾, diclazuril^(59, 90), robenidine⁽⁶⁹⁾, dan toltrazuril⁽⁹⁰⁾ yang dapat mengukur residu $\leq 15 \mu\text{g kg}^{-1}$ di dalam sampel telur dan jaringan. Selain itu metode ini digunakan oleh Kao dkk. (2001) untuk mendeteksi 13 residu obat hewan, termasuk clopidol dan ethopabate di dalam otot unggas dan babi.

Metode fluoresens lebih dipilih untuk analisis residu di dalam matriks sampel yang lebih kompleks karena memiliki sensitifitas dan selektifitas yang lebih baik dari pada metode UV. Akan tetapi, metode fluoresens tidak secara luas digunakan untuk analisis koksidiostat kimia karena umumnya memerlukan derivatisasi. Sebagai contoh, robenidine diderivatisasi dengan *dansyl chloride* sebelum dianalisis dan menghasilkan sensitifitas dua kali lipat lebih baik⁽²⁸⁾.

Sebaliknya ionofor kecuali lasalocid umumnya membutuhkan derivatisasi kimia agar dapat mengukur residu pada level $\mu\text{g kg}^{-1}$. Monensin, salinomycin, semduramicin, maduramicin, dan narasin biasanya dianalisis dengan HPLC-UV pada panjang gelombang 520 nm kemudian diikuti dengan *post-column derivatisation* / PCD (HPLC-PCD-UV) dengan *vanillin*. Ericson dkk. (1994) menggunakan prosedur derivatisasi untuk menganalisis semduramicin menghasilkan LOD $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Pendekatan ini secara luas banyak diikuti oleh penelitian lain dan dapat dilakukan kuantifikasi hingga $\leq 5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabel 3). LOQ monensin kira-kira setengah dari salinomycin dan narasin. HPLC-PCD-UV dengan reagen *vanillin* dapat digunakan untuk maduramicin dan semduramicin, tetapi sensitifitasnya lebih buruk dibanding monensin, salinomycin, dan narasin. HPLC-

PCD-UV tidak cocok untuk analisis lasalocid, kebanyakan penelitian menggunakan metode HPLC fluoresens. Tarbin dan Shearer (1992) mengembangkan metode HPLC-FLD untuk menganalisis lasalocid di dalam otot unggas dan telur. Panjang gelombang eksitasi 310 nm dan emisi 420-430 nm. Metode ini dapat mengukur residu lasalocid di dalam sampel telur dan otot unggas, masing-masing hingga 10 dan $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Metode HPLC-FLD juga berhasil digunakan oleh kelompok peneliti lain untuk analisis lasalocid tanpa proses derivatisasi^(52, 73, 104).

Beberapa kelompok lain mengembangkan metode HPLC-FLD untuk menganalisis lasalocid secara simultan dengan ionofor yang diikuti derivatisasi. Pengembangan awal metode ini dilakukan oleh Asukabe dkk. 1994 yang menderivatisasi lasalocid, monensin, dan salinomycin dengan *1(bromoacetyl) pyrene*. Pemurnian ekstensif untuk derivatif diperlukan menggunakan kolom silika sebelum dianalisis. Penelitian terbaru oleh Inoue dkk. 2012 yaitu menderivatisasi secara simultan 5 ionofor (lasalocid, monensin, narasin, salinomycin, dan semduramicin) dengan metode HPLC-FLD. Residu lasalocid diderivatisasi dengan *4-(4,5 -diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzol choride hydrochloride* (DIB-Cl) pada grup fenil. Ionofor lain direaksikan dengan *2-(4-hydrazinocarbonyl-phenyl) 4,5-diphenylimidazole* melalui kelompok fungsional asam karboksilat. Kedua reaksi dilakukan secara simultan di dalam tabung yang sama berisi *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide* dan *pyridine*.

Amprolium bersifat sangat polar dan memerlukan pasangan ion atau *HILIC chromatography* untuk memperoleh waktu retensi yang sesuai. Pemisahan pasangan ion dilakukan untuk menganalisis amprolium dengan HPLC-FLD diikuti dengan reaksi *post-column* dengan *potassium hexacyanoferrate (III)* dalam medium alkali⁽³⁵⁾.

Furusawa mengembangkan metode serupa menggunakan *heptane sulphonic acid* sebagai reagen pasangan ion. Pemisahan *isocratic* HILIC digunakan untuk amprolium menggunakan kolom silika MeCN; pendapar asam format / ammonium format pH 4, 50 mM (60:40) ⁽⁷¹⁾.

Tabel 3. Ringkasan metoda HPLC-UV dan HPLC- FLD untuk analisis koksidiostat

	Matriks	Teknik ekstraksi	Teknik purifikasi	Instrumen	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery (%)	Pustaka
1	Hati	LSE (MeCN), <i>defatted</i> dengan heksana	SPE (C_{18})	HPLC-	12,5	>70	21
1	Telur, otot	LSE (MeCN), dibagi antara NaCl & karbon tetraklorida	SPE (silika)	HPLC- FLD	-	65-78	106
1	Daging diproses	LSE (MeCN & Na_2SO_4)	SPE (silika + NH_2)	HPLC- FLD	-	74-96	107
1	Empal, hati, otot	LSE (MeOH) & karbon tetraklorida	SPE (silika)	HPLC- FLD	0,01	86-101	52
1	Hati, otot	LSE (MeCN), <i>defatted</i> dengan heksana	SPE (silika)	RF-HPLC	0,1	90,4-96,9	104
1	Telur, ginjal, hati, otot	LSE (MeCN & Na_2SO_4)	-	HPLC- FLD	1-10	>86	74
1	Hati	(LSE metanolik amonium hidroksida)	SPE (C_8)	HPLC-PCD-UV	25	>95	37
1	Hati	Dicerna secara enzimatik (tripsin), LSE (etil asetat)	SPE (C_{18})	HPLC-UV	89,6	73-79	11
1	Telur, otot	LSE (MeCN)	SPE (HLB)	HPLC-UV	15	>73	69
3	Otot	LSE (so-oktan-etil asetat)	SPE (silika)	HPLC-UV	2-5	71-97	43
2	Lemak, hati, otot	LSE (MeCN), <i>defatted</i> dengan n-heksan	LLP	HPLC-UV	4-10	>87	59
2	Ginjal, hati	MSPD	-	HPLC-UV	≤ 15	>71	90
2	Otot	LSE (MeCN), <i>defatted</i> dengan n-heksan	SPE (C_{18})	HPLC-PDA	20	>84	60

d. Deteksi LC-MS

Saat ini, LC-MS/MS telah secara luas digunakan di beberapa laboratorium untuk analisis residu koksidiostat di dalam makanan. Umumnya, koksidiostat kimia menghasilkan ion prekursor $[\text{M} + \text{H}]^+$ atau $[\text{M} - \text{H}]^-$ di dalam modus *electrospray ionisation* (*electrospray ionisation mode / ESI*) (27, 34, 69, 82, 84, 86, 115, 116). Selain ESI, aplikasi *atmospheric pressure chemical ionisation* (APCI) juga digunakan untuk menghasilkan fragmentasi (pemisahan) yang baik, seperti

yang diterapkan oleh Martinez-Villalba dkk. (2010) untuk deteksi toltrazulir. Metoda yang selanjutnya dikembangkan dan divalidasi untuk mendeteksi residu golongan toltrazulir di dalam daging dan produk daging proses menghasilkan LOD 0,5, 5 dan 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ masing-masing untuk toltrazulir, toltrazulir sulphoxide, dan toltrazulir sulphone di dalam sampel daging. Ai dkk. (2011) mengembangkan metoda untuk mendeteksi residu diclazulir, toltrazulir, toltrazulir sulphoxide, dan toltrazulir sulphone di dalam telur dan jaringan unggas. LOQ adalah 1,2

$\mu\text{g kg}^{-1}$ untuk diclazuril dan totrazuril, dan *(conformatory purpose)*. Spektra MS dan $1,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ untuk toltrazuril *sulphone* dan MS/MS dari ionophore adalah kompleks toltrazuril *sulphoxide*.

Ionophore menghasilkan ion ini membentuk kompleks dengan berbagai prekursor kuat dalam ESI, yang dengan ion termasuk H^+ , NH_4^+ , dan Na^+ . Prekursor mudah difragmentasi untuk menghasilkan dan produk ion LC-MS/MS baik ionophore ion produk untuk tujuan konfirmasi dan koksidiostat kimia dirangkum di dalam Tabel 4.

Tabel 4. Prekursor dan ion-ion produk LC-MS/MS untuk koksidiostat

Analit	Rumus empiris	BM (g/mol)	Ion perkursor (m/z)	Ion produk (m/z)	Polaritas ESI	Pustaka
Clopidol	$\text{C}_7\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}$	192.04	192.00	101.0, 87.0	+	27, 26
Diaveridin	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$	260.29	261	245.1, 217.1, 123.1	+	27, 69
Arpinocid	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClFN}_5$	277.68	278.0	142.9, 107.0	+	27, 26
Ethopabate	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$	237.25	238.0	206.0, 136.0	+	27
Halofuginone	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_3$	414.68	414.1	396.0, 398.0	+	27
			415.9	138, 121	+	84
			416	398, 138, 120, 100	+	117
Robenidine	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_5$	334.2	334.1	154.9, 138.0, 137.8, 129, 110.9	+	27, 84, 34, 86, 33
Dinitrocarbanilide	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_5$	302.24	301.1	136.9, 107.0	-	27 116
			301.4	136.8, 107.0, 45.8	-	76 82
Diclazuril	$\text{C}_{17}\text{H}_9\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_2$	407.64	405.0	335.9, 333.9	-	27
Toltrazuril <i>sulphone</i>	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	457.38	456.2	456.2	-	27
			388.1	288, 345	-	67
			388.1	248, 288	-	72
Toltrazuril <i>sulphoxide</i>	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	441.28	440.1	-	-	27 71
			371.1	271.0	-	
Toltrazuril	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	425.38	424.2	424.	-	27
			356.1	256.0, 129.9	-	71
Decoquinate	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_5$	417.54	418.4	372.1, 232, 204	+	27 86
Nequinate	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}$	366.00	366	334.0, 200.9, 145.91	+	27 83
Semduramicin	$\text{C}_{45}\text{H}_{76}\text{NaO}_{16}$	896.07	890.8	727.5, 647.5	+	27
			895	852, 834	+	98
			895.5	851.5, 833.4, 705.4	+	102
Lasalosid	$\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{NaO}_{11}$	612.77	613	595, 577, 559, 377, 359	+	110
			608, 613	237, 337, 377, 629	+	48

Monensin-A	$C_{36}H_{61}NaO_{11}$	692.85	693.4	675, 581, 501, 479, 461	+	110
Salinomycin	$C_{42}H_{70}NaO_{11}$	772.99	773	531, 431, 412, 279	+	110
Laidlomycin	$C_{40}H_{63}KO_{13}$	793.03	777.3	759.2, 521.2 503.1	+	27
Narasin-A	$C_{45}H_{72}O_{11}$	765.03	787	531, 431, 412, 279	+	110
Maduramicin	$C_{47}H_{83}NO_{17}$	934.16	934.9	629.3, 647.3	+	27
			939	895, 877	+	98
Amprolium	$C_{14}H_{19}N_4$	243.33	243	150, 122, 94	+	25 72
Buquinolate	$C_{20}H_{27}NO_5$	361.43	362	260, 204	+	83
Clazuril	$C_{17}H_{10}Cl_2N_4O_2$	373.19	371	300, 265	-	118
Zoalene	$C_8H_7N_3O_3$	225.16	224	150.9, 76.9	-	114
ANOT	$C_8H_9N_3O_3$	195.18	196	106.9, 132.9	-	115
Alkomide	$C_7H_5ClN_2O_3$	200.60	199	-	-	118
Nitromide	$C_7H_5N_3O_3$	211.13	210	167, 137	-	118
Robenidine-D ₈	$C_{15}H_5Cl_2N_5D_8$	342.20	342.2	115.0	+	27
Dinitrocarbanilide-D ₈	$C_{13}H_2N_4O_5D_8$	310.24	309.8	142.0	-	27
Decoquinat-D ₅	$C_{24}H_{30}NO_5D_5$	422.54	423.4	377.2	+	27
Toltrazuril-D ₃	$C_{18}H_{113}N_3O_4SD_3$	428.80	359.1	256, 123.9	-	71

Aplikasi LC-MS(/MS) awalnya digunakan untuk menganalisis penggunaan koksidiostat secara luas, khususnya yang terdiri dari ionophore dan nicarbazin di dalam telur dan jaringan unggas. Metode ini umumnya menggunakan prosedur persiapan sampel yang lebih selektif berdasar LLE (*liquid liquid extraction*) atau SPE *clean-up*. Metode LC-MS termasuk (LC yang digabung dengan *single quadrupole MS*) untuk lasalocid⁽¹⁸⁾, *ionophore* (monensin, salinomycin, dan narasin)⁽¹⁹⁾, dan dua komponen aktif dari nicarbazin, seperti *4-4'-dinitrocarbanilide* dan *4,6-dimethyl-2-hydroxypyrimidine*⁽¹⁷⁾. Kelompok lain mengembangkan metoda LC-MS yang menganalisis lebih banyak koksidiostat terbaru termasuk clopidol⁽⁸⁷⁾ dan analog totrazuril⁽⁵³⁾. Sensitifitas dari metoda ini berkisar <1 – 10 µg kg⁻¹.

Kemudian diawal 2000, terdapat pergeseran teknologi LC-MS(/MS) khususnya *triple quadrupole analyzer*, beberapa dirangkum di dalam Tabel 5. Beberapa

kelompok peneliti mengembangkan metode LC-MS(/MS) untuk mendeteksi residu ionophore^(50, 57, 68, 74, 94, 108), termasuk juga ionophore yang kurang sering digunakan seperti maduramicin dan semduramicin, dengan menggunakan nigericin sebagai internal standar^(57, 68, 102). Banyak dari metoda-metoda ini yang dapat mendeteksi ionophore hingga <2 µg kg⁻¹. Metoda yang lebih sensitif telah dikembangkan hingga mampu mendeteksi residu *dinitrocarbanilide* (DNC) dan *ionophore* hingga 0,015 – 0,039 µg kg⁻¹⁽³²⁾.

Perkembangan terbaru dari deteksi koksidiostat diantara para peneliti adalah pengembangan metoda analisis terhadap koksidiostat yang lebih luas lagi. Dubois dkk. (2004) mengembangkan metoda LC-MS(/MS) untuk sembilan koksidiostat di dalam telur dan otot, yang mampu mendeteksi residu antara 0,1 – 0,6 µg kg⁻¹. Kelompok peneliti lainnya juga telah banyak mengembangkan metoda ini yang mampu mendeteksi lebih

banyak koksidiostat secara simultan hingga 11 koksidiostat dengan non-target EU BMR (26, 34, 41, 84, 86, 99). Bahkan Moloney dkk. (2012) telah mengembangkan metoda LC-MS/MS yang mampu mendeteksi hingga 20 residu koksidiostat di dalam telur dan daging dengan nilai LOD hingga $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Serupa Yue dkk. (2012) mengembangkan metoda untuk 20 koksidiostat dengan nilai LOQ berkisar antara $5 - 50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Metoda termasuk sejumlah residu koksidiostat yang jarang dianalisis dengan metoda lain seperti amprolium, clazuril, dinitolmide (zoalene), nequinat, nitromide, dan alkomide. Metoda yang lebih ekstensif ini menggunakan prosedur preparasi sampel yang sederhana, dengan pembersihan yang terbatas. Clarke dkk. (2013) mengembangkan metoda untuk mengukur residu koksidiostat di dalam susu sapi dan otot dari berbagai spesies hewan (sapi, bebek, kuda, domba, dan babi).

Beberapa kelompok lain telah mengembangkan metoda multikelas untuk menentukan berbagai residu obat hewan di dalam sampel makanan, termasuk beberapa koksidiostat yang disertakan dalam metoda ini. Ini karena koksidiostat lebih digolongkan sebagai imbuhan pakan dari

pada obat hewan atau karena koksidiostat tidak mudah diakomodir di dalam tahapan persiapan sampel yang digunakan di dalam metode ini. Peter dkk. (2009) menjelaskan metoda LC-MS/MS untuk menentukan residu obat hewan (termasuk *ionophore*, BNC, dan *nitroimidazole*) di dalam otot ayam dengan menggunakan metoda QuEChERS sebagai persiapan sampel. Perkembangan yang terbaru memperlihatkan metoda yang dikembangkan untuk menganalisis 255 residu obat hewan di dalam susu oleh Zhan dkk. (2012). Metoda ini termasuk tujuh residu koksidiostat dan tujuh *nitroimidazole*. Selanjutnya perkembangan persiapan sampel mengarah kepada protokol ekstraksi yang lebih sederhana yang dapat digunakan untuk mendeteksi residu pada level hingga $\mu\text{g kg}^{-1}$ di dalam matriks makanan yang kompleks. Oleh karena itu, diharapkan dimasa mendatang metoda multikelas akan mencakup koksidiostat yang lebih luas lagi. Tabel 4 menunjukkan ion prekursor dan ion-ion produk pada koksidiostat di dalam sistem LC-MS/MS, sedangkan Tabel 5 merupakan ringkasan dari metode LC-MS(/MS) untuk analisis koksidiostat beserta sistem ionisasi dan batas deteksi ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabel 5. Ringkasan metoda LC-MS/MS untuk analisis koksidiostat

Analit ^a	Matriks ^b	Instrumen	Ionisasi	Sensitifitas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pustaka
MON, NAR, SAL	E	LC-MS	ESI	LOD: 1	19
LAS, MON, NAR, SAL	E, L	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 2,5-50	73, 74
DNC, LAS, MON, NAR, SAL	E, L	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 2,5	76
LAS, MON, NAR, SAL	E	LC-MS	ESI	1	50
LAS, MON, NAR, SAL	E, M	LC-MS	ESI	CC α : 0,8-2,5	94
LAS, MAD, MON, NAR, SAL	I, M	LC-MS/MS	ESI	CC α : 1,7-2,4	57
DNC, LAS, MON, NAR, SAL	E	LC-MS/MS	ESI	LOD: 0,015-0,039	32
LAS, MAD, MON, NAR, SAL	I, M	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 0,1-1,0 ^c	68

LAS, MAD, MON, NAR, SAL, SEM, NIG (IS)	E	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 1,1-3,4	102
TOL, TOLSO2	E, M	LC-MS	<i>Ion spray</i>	LOD: 1-2,5	53
DIC, TOL, TOLSO, TOLSO2	E, K, L, M	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 1,2-1,8	1
HFG, DIC, DNC, ROB, LAS, MAD, MON, NAR, SAL	E, M	LC-MS/MS	ESI	CC α : 0,07-0,6	33
BUQ, NEQ	E, H, L, M	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 1	83
DIC, DMZ, DNZ, HFG, ROB	E	LC-MS/MS	ESI	CC α : 0,75-6,0	82
HFG, ROB, DIC, DNC, MON, NAR, LAS, SAL, MAD, SEM	E	LC-MS/MS	ESI	CC α : 0,27-165	34
CLOP, DIC, ETH, LAS, MAD, MON, NAR, RNZ, SAL	E	LC-MS/MS	ESI	CC α : 0,16-163	26
DEC, DIC, DNC, HFG, LAS, MAD, MON, NAR, ROB, SAL, SEM	E	LC-MS/MS	ESI	CC α : 2,2-174	41
CLAZ, DEC, DIC, DNC, HFG, LAS, MAD, MON, NAR, ROB, SAL, SEM	L	LC-MS/MS	ESI	CC α : 3,18-245	86
AMP, DEC, DIA, DIC, DMZ, DNC, ETH, HFG, LAS, MAD, MNZ, MON, NAR, RNZ, ROB, SAL	E, M	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 0,1-0,2	99
LAS, MON, NAR, SAL	Mk	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 1	108
ARP, CLOP, DEC, DIA, DIC, DNC, ETH, HFG, IMID, LAID, LAS, MAD, MON, NAR, NEQ, ROB, SAL, SEM, TOL, TOLSO, TOLSO2	E, M, Mk	LC-MS/MS	ESI	CC α : 1,1-179	81, 27
ALK, AMP, CLAZ, CLOP, DEC, DIC, DNC, ETH, HFG, LAS, MAD, MON, NAR, NEQ, NIT, ROB, SAL, TOL, TOLSO, TOLSO2, ZOA	M	LC-MS/MS	ESI	LOQ: 5-50	118
DEC, DIC, DNC, HFG, LAS, MAD, MON, NAR, ROB, SAL, SEM	Mk	LC-MS/MS	ESI	CC α :1,25-21	84
AMP	E, M	LC-MS/MS	ESI	0,3-0,6	71
TOL, TOLSO, TOLSO2	M, PM	LC-MS/MS	APCI	0,5-5	72

^a AMP = amprolium, BUQ = buquinolate, CLOP = clopidol, DEC = decoquinat, DIA = diaveridin, DIC = diclazuril, DMZ = dimetridazole, DNC = dinitrocarbanilide, ETH = ethopabate, HFG = halofuginone, IMID, imidocarb, LAID = laidlomycin, LAS = lasalosid, MAD = maduramicin, MON = monensin, NAR = narasin, NEQ = nequinat, RNZ = ronidazole, ROB = robenidine, SAL = salinomycin, SEM = semduramicin, TOL = toltrazuril, TOLSO = toltrazuril sulphoxide, TOLSO2 = toltrazuril sulphone.

^b E = *egg* (telur), F = *fat* (lemak), H = *heart* (jantung), K = *kidney* (ginjal), L = *liver* (hati), M = *muscle* (otot), Mk = *milk* (susu), PM = *processed meat* (daging proses)

KESIMPULAN

Koksidiostat dikenal sejak lama dapat mengendalikan dan mengobati penyakit infeksi yang disebabkan oleh protozoa. Obat-obat ini digunakan sebagai imbuhan pakan golongan antimikroba dalam mempertahankan kesehatan hewan dan mencegah penyebaran penyakit infeksi terutama pada hewan ternak. Penggunaan koksidiostat di dalam pakan salah satunya berfungsi untuk meningkatkan konversi pakan. Akan tetapi penggunaan koksidiostat dalam jangka waktu yang lama dan tidak terkendali akan menimbulkan akumulasi residu di dalam produk peternakan. Akumulasi residu yang melebihi ambang batas maksimum residu (BMR) dapat mempengaruhi kesehatan manusia. Oleh karena itu penting

untuk mengembangkan metoda analisis yang dapat mendeteksi maupun menghitung jumlah residu yang terdapat di dalam produk makanan. Metoda analisis yang biasanya dikembangkan untuk residu koksidiosis antara lain metoda kromatografi cair, seperti HPLC, LC-MS(/MS), maupun metoda *bioassay*, misalnya *immunoassay*. Metoda-metoda analisis tersebut memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang sangat baik. Umumnya metoda LC-MS(/MS) memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang paling baik diantara metoda lainnya, yang mampu mendeteksi multi residu koksidiostat secara bersamaan (simultan). Pengembangan metoda analisis residu koksidiostat ini sangat bermanfaat dalam menjamin makanan asal hewan yang aman bagi kesehatan manusia.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Ai LF, Sun HW, Wang FC, Chen RC. & Guo CH.** 2011. *Determination of Diclazuril, Toltrazuril, and Its Two Metabolites in Poultry Tissues and Eggs by Gel Permeation Chromatography-Liquid Chromatography -Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography B, 879(20), 1757-1763.*
2. **Akpo Y, Kpodekon MT, Djago Y, Licois D. & Youssao IAK.** 2012. *Vaccination Rabbits Against Coccidiosis Using Precocious Lines of Eimeria Magna and Eimeria Media in Benin. Veterinary Parasitology, 184(1), 73-76.*
3. **Anonimous.** 1998. *Committee for Veterinary Medicinal Products, Toltrazuril. European Medicines Agency, 314, 1-5.*
4. **Anonimous.** 2006. *European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the Safety and Efficacy of the Coccidiostat Elancoban (Monensin Sodium) as a Feed Additive for Calves for Rearing and Cattle for Fattening in Accordance with Regulation (EC) No. 1831/2003. The European Food Safety Authority Journal, 387, 1-33.*
5. **Anonimous.** 2007. *European Food Safety Authority (EFSA). Cross Contamination of Non-target Feedingstuffs by Narasin Authorised for Use as a Feed Additive. The European Food Safety Authority Journal, 552, 1-35.*
6. **Anonimous.** 1990. *Report of Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Lasalocid Sodium in Feedingstuffs*

- for Finishing Cattle. *Opinion Expressed*, 27 July 1990.
7. **Anonimous.** 2010c. (10th ed.) *Merck Veterinary Manual, Vol. 10, New Jersey, USA: Merck & Co. Inc.*
 8. **Anonimous.** 2009a. *Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of The Council of 6th May 2009 Laying Down Community Procedures for the Establishment of Residue Limits of Pharmacologically Active Substances in Foodstuffs of Animal Origin, Repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and Amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of The Council. Official Journal of The European Communities L152, 11-22.*
 9. **Anonimous.** 2009b. *Vademikum Imbuhan Pakan (Feed Additive Vademikum). Asosiasi Obat Hewan Indonesia (ASOHI), Jakarta.*
 10. **Asukabe H, Murata H, Harada K, Suzuki M, Oka H. & Ikai Y.** 1994. *Improvement of Chemical Analysis of Antibiotics 21 Simultaneous Determination of Three Polyether Antibiotics in Feeds Using High Performrance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(1), 112-117.*
 11. **Beier RC, Dutko TJ, Buckley SA, Muldoon MT, Holtzapple CK. & Stanker LH.** 1998. *Detection of Halofuginone Residues in Chicken Liver Tissue by HPLC and a Monoclonal-Based Immunoassay. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46(3), 1049-1054.*
 12. **Beier RC, Feldman SF, Dutko TJ, Petersen HD & Stanker L.** 2002. *Immunoassay and HPLC Detection of Halofuginone in Chicken Liver Samples Obtained from Commercial Slaughterhouses: A Combined Study. Food and Agricultural Immunology, 14(1), 29-40.*
 13. **Beier RC, Ripley LH, Young CR. & Kaiser CM.** 2001. *Production, Characterization, and Cross-Reactivity Studies of Monoclonal Antibodies Against the Coccidiostat Nicarbazin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(10), 4542-4552.*
 14. **Beier RC, Rowe LD, Nasr M, Elissalde MH, Rose BG. & Stanker LH.** 1996. *Detection of Halofuginone Residues in Chicken Serum by A Monoclonal-Based Immunoassay and High-Performance Liquid Chromatography. Food and Agricultural Immunology, 8(1), 11-17.*
 15. **Bergen WG. & Bates DB.** 1984. *Ionophores – Their Effect on Production Efficiency and Mode of Action. Journal of Animal Science, 58(6), 1465-1483.*
 16. **Blanchflower WJ, Hughes PJ. & Kennedy DG.** 1997. *Determination of Nicarbazin in Eggs by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. Journal of AOAC, 80(6), 1177-1182.*
 17. **Blanchflower WJ. & Kennedy DG.** 1995. *Determination of Lasalocid in Eggs Using Liquid Chromatography-Electrospray Mass - Spectrometry. Analyst, 120(4), 1129-1132.*
 18. **Blanchflower WJ. & Kennedy DG.** 1996. *Determination of Monensin, Salinomycin, and Narasin in Muscle, Liver, and Eggs from Domestic Fowl Using Liquid Chromatography*

- Electrospray Mass Spectrometry. Journal of Chromatography B*, 675(2), 225-233.
- 19 **Campbell K, Fodey T, Flint J, Danks C, Danaher M, O’Keeffe M, Kennedy DG. & Elliot C.** 2007. Development and Validation of A Lateral Flow Device for The Detection of Nicarbazin Contamination in Poultry Feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2497-2503.
 20. **Capurro E, Danaher M, Anastasio A, Cortesi ML. & O’Keeffe M.** 2005. *Efficient HPLC Method for the Determination of Nicarbazin, as Dinitrocarbanilide in Broiler Liver.* *Journal of Chromatography B*, 822(1-2), 154-159.
 21. **Chapman HD.** 2009. *A Landmark Contribution to Poultry Science- Prophylactic Control of Coccidiosis in Poultry.* *Poultry Science*, 88(4), 813-815.
 22. **Chartier C. & Paraud C.** 2012. *Coccidiosis Due To Eimeria in Sheep and Goats, A Review.* *Small Ruminant Research*, 103(1), 84-92.
 23. **Cheneau E, Henri J, Pirotais Y, Abjean JP, Roudaut B, Sanders P. & Laurentie M.** 2007. *Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometric Method for Quantification of Monensin in Plasma and Edible Tissues of Chicken Used in Pharmacokinetic Studies: Applying A Total Error Approach.* *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*, 850(1-2), 15-23.
 - 24 **Chiaochan C, Koesukwiwat U, Yudthavorasit S. & Leepipatpiboon N.** 2010. *Efficient Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for The Multiclass Analysis of Veterinary Drugs in Chicken Muscle.* *Analytical Chimica Acta*, 682(1-2), 117-129.
 25. **Chico J, Rubies A, Centrich F, Companyo R, Prat MD. & Granados M.** 2013. *Use of Gel Permeation Chromatography for Clean-Up in The Analysis of Coccidiostats in Eggs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.* *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(14), 4777-4786.
 26. **Clarke L, Moloney M, O’Mahony J, O’Kennedy R. & Danaher M.** 2013. *Determination of 20 Coccidiostats in Milk, Duck Muscle and Non-Avian Muscle Tissue Using UPHLC-MS/MS.* *Food Additives and Contaminants, Part A*, 30(6), 958-969.
 27. **Cohen H, Armstrong F. & Campbell H.** 1995. *Sensitive Fluorescence Detection of Robenidine by Derivatization with Dansyl Chloride and High-Performance Liquid Chromatography.* *Journal of Chromatography A*, 694(2), 407-413.
 28. **Connolly L, Fodey TL. Crooks SRH, Delahaut P. & Elliott CT.** 2002. *The Production and Characterisation of Dinitrocarbanilide Antibodies Raised Using Antigen Mimics.* *Journal of Immunological Methods*, 264(1-2), 45-51.
 29. **Connolly L, Fodey TL. Crooks SRH, & Elliott CT.** 2002. *The Production and Characterisation of an Antibody to Detect the Coccidiostat Toltrazuril and Its Metabolite Ponazuril.* *Analyst*, 128(5), 459-461.
 30. **Crooks SRH, Traynor IM, Elliott CT. & McCaughey WJ.** 1997. *Detection of Monensin Residues in Poultry Liver Using an Enzyme Immunoassay.* *Analyst*, 122(2), 161-163.

31. **Dmitrovic J. & Durden DA.** 2011. *A New Approach to the Analysis of Nicarbazine and Ionophores in Eggs by HPLC/MS/MS.* *Journal of AOAC*, 94(2), 428-435.
32. **Dubois M, Pierret G. & Delahaut P.** 2004. *Efficient and Sensitive Detection of Residues of Nine Coccidiostats in Egg and Muscle by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry.* *Journal of Chromatography B*, 813(1-2), 181-189.
33. **Dubreil-Cheneau E, Bessiral M, Roudaut B, Verdon E. & Sanders P.** 2009. *Validation of a Multi-Residue Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Method for 10 Anticoccidials in Eggs According to Commission Decision 2002/657/EC.* *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8149-8157.
34. **Dudikova L, Nenahlova D, Breburdova A. & Dousa M.** 2002. *Optimization of the HPLC Method with Postcolumn Derivatization for Determination of Amprolium in Fodders at Contents Lower than 5 mg kg⁻¹.* *Chemicke Listy*, 96(9), 751-755.
35. **Elissalde MH, Beier RC, Rowe LD. & Stanker LH.** 1993. *Development of a Monoclonal-Based Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay for the Coccidiostat Salinomycin.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 2167-2171.
36. **Ericson JF, Calcagni A. & Lynch MJ.** 1994. *Determination of Semduramicin Sodium in Poultry Liver by Liquid-Chromatography with Vanillin Postcolumn Derivatization.* *Journal of AOAC*, 77(3), 577-582.
37. **Fodey TL, Delahaut P. & Elliott CT.** 2007. *Use of Antigen Mimics to Produce Specific Antibodies to Anti-Coccidial Drugs.* *Journal of Immunological Methods*, 323(1), 31-38.
38. **Fry M. & Williams RB.** 1984. *Effects of Decoquinate and Clopidol on Electron-Transport in Mitochondria of Eimeria Tenella (Apicomplexa, Coccidia).* *Biochemical Pharmacology*, 33(2), 229-240.
39. **Furusawa N.** 2002. *Simplified High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Residual Amprolium in Edible Chicken Tissues.* *Journal of Chromatographic Science*, 40(6), 355-358.
40. **Galarini R, Fioroni L, Angelucci F, Tovo GR. & Cristofani E.** 2009. *Simultaneous Determination of Eleven Quinolones in Animal Feed by Liquid Chromatography with Fluorescence and Ultraviolet Absorbance Detection.* *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8158-8164.
41. **Galarini R, Fioroni L, Moretti S, Pettinacci L. & Dusi G.** 2011. *Development and Validation of A Multi-Residue Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Method for Eleven Coccidiostats in Eggs.* *Analytica Chimica Acta*, 700(1-2), 167-176.
42. **Gerhardt GC, Salisbury CDC. & Campbell HM.** 1995. *Determination of Ionophores in the Tissues of Food Animals by Liquid-Chromatography.* *Food Additives and Contaminants*, 12(6), 731-737.
43. **Godfrey MAJ, Luckey MF. & Kwasowski P.** 1997. *IAC/cELISA Detection of Monensin Elimination from Chicken Tissues, following Oral Therapeutic Dosing.* *Food Additives and Contaminants*, 14(3), 281-286.

44. Hagren V, Connolly L, Elliott CT, Lövgren T. & Tuomola M. 2005. *Rapid Screening Method for Halofuginone Residues in Poultry Eggs and Liver Using Time-Resolved Fluorometry Combined with The All-In-One Dry Chemistry Assay Concept. Analytica Chimica Acta*, 529, 21–25.
45. Hagren V, Crooks SRH, Elliott CT, Lovgren T. & Tuomola M. 2004. *An All-In-One Dry Chemistry Immunoassay for the Screening of Coccidiostat Nicarbazin in Poultry Eggs and Liver. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2429–2433.
46. Hagren V, Peippo P, Tuomola M. & Lovgren T. 2006. *Rapid Time-Resolved Fluoroimmunoassay for the Screening of Monensin Residues in Eggs. Analytica Chimica Acta*, 557(1–2), 164–168.
47. Harris JA, Russell CAL. & Wilkins JPG. 1998. *The Characterisation of Polyether Ionophore Veterinary Drugs by HPLC-electrospray MS. Analyst*, 123(12), 2625–2628.
48. He LM, Liu YH, Zeng ZL, Huang XH. & Liu R. 2005. *Determination of Residual Clopidol in Chicken Muscle by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Journal of AOAC*, 88(4), 1104–1107.
49. Heller DN. & Nohetto CB. 2004. *Development of Multiclass Methods for Drug Residues in Eggs: Silica SPE Cleanup and LC–MS/MS Analysis of Ionophore and Macrolide Residues. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6848–6856.
50. Horii S, Miyakawa H, Igusa K. & Itoh T. 1994. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 35(4), 352–356.
51. Horil S, Miyahara K. & Momma C. 1990. *High Performance Liquid-Chromatographic Determination of Lasalocid Sodium in Chicken Tissue. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 13(7), 1411–1417.
52. Hormazabal V, Yndestad M. & Ostensvik O. 2003. *Determination of Flunixin and Tiamulin Hydrogen Fumarate in Meat and Toltrazuril and the Metabolite Toltrazuril Sulfone in Meat and Eggs Using LC/MS. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(5), 791–801.
53. Huet AC, Mortier L, Daeseleire E, Fodey T, Elliott C. & Delahaut P. 2005. *Screening for the Coccidiostats Halofuginone and Nicarbazin in Egg and Chicken Muscle: Development of an ELISA. Food Additives and Contaminants*, 22(2), 128–134.
54. Inoue K, Miura Y, Suzuki M, Kishikawa N, Hino T, Kuroda N. & Oka H. 2012. *Simultaneous Determination of Five Polyether Ionophores Using Liquid Chromatography with One-Step Fluorescent Derivatization. Analytical Sciences*, 28(2), 175–178.
55. James S. 1980. *Thiamine Uptake in Isolated Schizonts of Eimeria tenella and the Inhibitory Effects of Amprolium. Parasitology*, 80(APR), 313–322.
56. Jestoi M, Rokka M. & Peltonen K. 2007. *An Integrated Sample Preparation to Determine Coccidiostats and Emerging Fusarium-Mycotoxins in Various Poultry Tissues with LC–MS/MS. Molecular Nutrition & Food Research*, 51(5), 625–637.
57. Kabell G, Saini RK, Somani P. & Pressman BC. 1979. *Effects of the Carboxylic Ionophore Monensin on Regional Blood Flow in Normal and*

- Ischemic Myocardium in Anesthetized Dogs. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 211, 231-237.
58. **Kanda M, Ushiyama K, Igusa K, Murayama M, Horie M, Hirokado M. & Miyazaki T.** 2003. *Simple Determination of Residual Anticoccidial Drugs (Diclazuril and Nicarbazin) in Chicken Tissues by HPLC. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 44(2), 110-113.
59. **Kao YM, Chang MH, Cheng CC. & Chou SS.** 2001. *Multiresidue Determination of Veterinary Drugs in Chicken and Swine Muscles by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Food and Drug Analysis*, 9(2), 84-95.
60. **Kart A. & Bilgili A.** 2008. *Ionophore Antibiotics: Toxicity, Mode of Action and Neurotoxic Aspect of Carboxylic Ionophores. Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(6), 748-751.
61. **Kennedy DG, Blanchflower WJ. & Odornan BC.** 1995a. *Development of an ELISA for Lasalocid and Depletion Kinetics of Lasalocid Residues in Poultry. Food Additives and Contaminants*, 12(1), 83-92.
62. **Kennedy DG, Blanchflower WJ. & Odornan BC.** 1995b. *Development of An ELISA for Salinomycin and Depletion Kinetics of Salinomycin Residues in Poultry. Food Additives and Contaminants*, 12(1), 93-99.
63. **Kennedy DG, Blanchflower WJ. & Odornan BC.** 1997. *Development of an ELISA for Maduramicin and Determination of The Depletion Kinetics of Maduramicin Residues in Poultry. Food Additives and Contaminants*, 14(1), 27-33.
64. **Lesa Clarke, Terence LF, Steven RHC, Mary M, John O'Mahony, Philippe D, Richard O'Kennedy. & Martin Danaher.** 2014. *A Review of Coccidiostats and The Analysis of Their Residues in Meat and Other Food. Meat Science* (97), 358-374.
65. **Levy JV. & Inesi G.** 1974. *Positive Inotropic Effect on Isolated Human Atrial Muscle Produced by the Ionophore X 537A: Preliminary Report. Journal of Clinical Pharmacology*, 14, 32-34.
66. **Li H, Kijak PJ, Turmipseed SB. & Cui W.** 2006. *Analysis of Veterinary Drug Residues in Shrimp: A Multi-Class Method by Liquid Chromatography-Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. Journal of Chromatography B*, 836(1-2), 22-38.
67. **Liang C, Cheng L, Shen J, Zhang Y. & Zhang S.** 2009. *Determination of 5 Polyether Antibiotics in Chicken Tissues by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Chinese Journal of Chromatography*, 27(6), 815-819.
68. **Liu Y, Wu Y. & Jiang Y.** 2010. *Determination of Robenidine Residue in Chicken Tissues and Eggs by High Performance Liquid Chromatography. Chinese Journal of Chromatography*, 28(9), 905-907.
69. **Liu ZY, Wu Y, Sun ZL. & Wan LR.** 2012. *Characterization of in Vitro Metabolites of Trimethoprim and Diaveridin in Pig Liver Microsomes by Liquid Chromatography Combined with Hybrid Ion Trap / Time-of-Flight Mass Spectrometry. Journal of Chromatography*, 26(9), 1101-1108.
70. **Martinez-Villalba A, Moyano E. & Galceran MT.** 2010. *Analysis of Amprolium by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography - Tandem*

- Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(37), 5802–5807.
71. **Martinez-Villalba A, Moyano E, Martins CPB. & Galceran MT.** 2010. *Fast Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (Highly Selective Selected Reaction Monitoring) for the Determination of Toltrazuril and Its Metabolites in Food. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(7), 2893–2901.
72. **Matabudul DK, Conway B. & Lumley ID.** 2000. *A Rapid Method for the Determination of Lasalocid in Animal Tissues and Eggs by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Confirmation By LC-MS-MS. Analyst*, 125(12), 2196–2200.
73. **Matabudul DK, Crosby NT, Lumley I. & Sumara S.** 2001. *The Optimisation of A Rapid Method for the Determination of Lasalocid in Poultry Feed Using Supercritical Fluid Extraction and High Performance Liquid Chromatography. Food Chemistry*, 75(4), 465–471.
74. **Matabudul DK, Crosby NT. & Sumar S.** 1999. *A New and Rapid Method for the Determination of Nicarbazin Residues in Poultry Feed, Eggs and Muscle Tissue Using Supercritical Fluid Extraction and High Performance Liquid Chromatography. Analyst*, 124(4), 499–502.
75. **Matabudul DK, Lumley ID. & Points JS.** 2002. *The Determination of 5 Anticoccidial Drugs (Nicarbazin, Lasalocid, Monensin, Salinomycin and Narasin) in Animal Livers and Eggs By Liquid Chromatography Linked with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS). Analyst*, 127(6), 760–768.
76. **Mattern EM, Kan CA. & Vangend HW.** 1990. *An Automated HPLC Determination of Meticlorpindol in Eggs With UV Absorbance Detection, Using Online Dialysis and Pre-Concentration As Sample Cleanup — Occurrence in and Carry Over to Eggs. Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und -forschung*, 190(1), 25–30.
77. **McCarney B, Traynor IM, Fodey TL, Crooks SRH. & Elliott CT.** 2003. *Surface Plasmon Resonance Biosensor Screening of Poultry Liver and Eggs for Nicarbazin Residues. Analytica Chimica Acta*, 483(1–2), 165–169.
78. **Mervi R, Marika J. & Kimmo P.** 2013. *Trace Level Determination of Polyether Ionophores in Feed. Biomed Research International*, 1–12.
79. **Mitchell ESE, Smith RP. & Ellis-Iversen J.** 2012. *Husbandry Risk Factors Associated with Sub-Clinical Coccidiosis in Young Cattle. Veterinary Journal*, 193(1), 119–123.
80. **Moloney M, Clarke L, O'Mahony J, Gadaj A, O'Kennedy R. & Danaher M.** 2012. *Determination of 20 Coccidiostats in Egg and Avian Muscle Tissue Using Ultra High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A*, 1253, 94–104.
81. **Mortier L, Daeseleire E. & Delahaut P.** 2003. *Simultaneous Detection of Five Coccidiostats in Eggs by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. Analytica Chimica Acta*, 483(1–2), 27–37.
82. **Nakajima T, Hayashi H, Sasamoto T, Kanda M, Kusano T, Matsushima Y, Kanai, S, Takeba K. & Nagayama T.** 2011. *Determination of Nequinat and Buquinolate in Livestock Products Using*

- Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Food Hygiene and Safety Science*, 52(3), 178–182.
83. **Nasz S, Debreczeni L, Rikker T. & Eke Z.** 2012. *Development and Validation of A Liquid Chromatographic–Tandem Mass Spectrometric Method for Determination of Eleven Coccidiostats in Milk. Food Chemistry*, 133(2), 536–543.
 84. **Nogueira VA, Franca TN. & Peixoto PV.** 2009. *Ionophore Poisoning in Animals. Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 29(3), 191–197.
 85. **Olejniak M, Szprengier-Juszkiewicz T. & Jedziniak P.** 2009. *Multi-Residue Confirmatory Method for The Determination of Twelve Coccidiostats in Chicken Liver Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8141–8148.
 86. **Pang GF, Cao YZ, Fan CL, Zhang JJ, Li XM. & Wang C.** 2000. *Determination of Clopidol Residues in Chicken Tissues by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A*, 882(1–2), 85–88.
 87. **Peippo P, Lovgren T. & Tuomola M.** 2005. *Rapid Screening of Narasin Residues in Poultry Plasma by Time-Resolved Fluoroimmunoassay. Analytica Chimica Acta*, 529(1–2), 27–31.
 88. **Peters RJB, Bolck YJC, Rutgers P, Stolker AAM. & Nielen MWF.** 2009. *Multi-Residue Screening of Veterinary Drugs in Egg, Fish and Meat Using Highresolution Liquid Chromatography Accurate Mass Time-of-Flight Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8206–8216.
 89. **Qi KZ, Shi ZH, Peng KS, Tu J, Zhu LQ. & Chen DD.** 2007. *Simultaneous Determination of Residues of Diclazuril and Toltrazuril in Chicken Tissues by Matrix Solid Phase Dispersion-High Performance Liquid Chromatography/ Ultraviolet Detection. Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 35(11), 1601–1606.
 90. **Ra YK, Li C, Jiang HY, Zhang SX, Zhao SJ, Li XW. & Shen JZ.** 2008. *Immunoaffinity Chromatography Clean-Up and LC for Analysis of Salinomycin and Narasin in Chicken Muscle. Chromatographia*, 68(9–10), 701–706.
 91. **Riddell FG.** 2002. *Structure, Conformation, and Mechanism in Membrane Transport of Alkali Metal Ions by Ionophoric Antibiotics. Chirality*, 14(2–3), 121–125.
 92. **Roberts E, Hammer JM, Lechtenberg K, Roycroft L. & King S.** 2011. *Investigation of Tiamulin Hydrogen Fumarate In-Feed Antibiotic for the Control of Porcine Respiratory Disease Complex that Includes Mycoplasma hyopneumoniae. Journal of Swine Health and Production*, 19(4), 218–225.
 93. **Rokka M. & Peltonen K.** 2006. *Simultaneous Determination of Four Coccidiostats in Eggs and Broiler Meat: Validation of an LC–MS/MS Method. Food Additives and Contaminants*, 23(5), 470–478.
 94. **Rosén J.** 2001. *Efficient and Sensitive Screening and Confirmation of Residues of Selected Polyether Ionophore Antibiotics in Liver and Eggs by Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Analyst*, 126(11), 1990–1995.

95. **Rowe LD, Beier RC, Elissalde MH. & Stanker LH.** 1994. *Production and Characterization of Monoclonal-Antibodies Against the Poultry Coccidiostat Halofuginone.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(5), 1132–1137.
96. **Rypula K, Porowski M, Kaba J, Gorkczykowski M. & Deniz A.** 2012. *Effect of Isosporiasis Prevention with Toltrazuril on Long-Term Pig Performance.* *Scientific World Journal*, 72, 1–4.
97. **Schneider RP, Lynch MJ, Ericson JF. & Fouda HG.** 1991. *Electrospray Ionization Mass-Spectrometry of Semduramicin and Other Polyether Ionophores.* *Analytical Chemistry*, 63(17), 1789–1794.
98. **Shao B, Wu XY, Zhang J, Duan HJ, Chu XG. & Wu YN.** 2009. *Development of a Rapid LC–MS–MS Method for Multi-Class Determination of 14 Coccidiostat Residues in Eggs and Chicken.* *Chromatographia*, 69(9–10), 1083–1088.
99. **Sharman PA, Smith NC, Wallach MG. & Katrib M.** 2010. *Chasing the Golden Egg: Vaccination Against Poultry Coccidiosis.* *Parasite Immunology*, 32(8), 590–598.
100. **Shirley MW. & Lillehoj HS.** 2012. *The Long View: A Selective Review of 40 Years of Coccidiosis Research.* *Avian Pathology*, 41(2), 111–121.
- 10.1 **Spisso BF, Ferreira RG, Pereira MU, Monteiro MA, Cruz TA, da Costa RP, Belem Lima AM. & da Nobrega AW.** 2010. *Simultaneous Determination of Polyether Ionophores, Macrolides and Lincosamides in Hen Eggs by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Using a Simple Solvent Extraction.* *Analytica Chimica Acta*, 682(1–2), 82–92.
103. **Stubbings G. & Bigwood T.** 2009. *The Development and Validation of a Multiclass Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC–MS/MS) Procedure for the Determination of Veterinary Drug Residues in Animal Tissue Using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) Approach.* *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2), 68–78.
104. **Su SC, Chang PC. & Chou SS.** 1998. *An Analytical Method for Lasalocid Residues in Livestock Products.* *Journal of Food and Drug Analysis*, 6(2), 495–503.
105. **Susin I, Mendes CQ, Pires AV. & Packer IU.** 2004. *Monensin or Decoquinat in High Concentrate Diets Fed to Santa Inês Lambs.* *Journal of Animal Science*, 82, 40–41.
106. **Tarbin JA, Rawlings E, Tyler D. & Sharman M.** 2002. *Improved Clean-Up for the Determination of Lasalocid in ‘Difficult’ Food Matrices.* *Food Additives and Contaminants*, 19(1), 28–32.
107. **Tarbin JA. & Shearer G.** 1992. *Improved High-Performance Liquid-Chromatographic Procedure for the Determination of Lasalocid in Chicken Tissues and Egg Using Polymeric and Porous Graphitic Carbon Columns.* *Journal of Chromatography*, 579(1), 177–183.
108. **Thompson TS, Noot DK. & Kendall JD.** 2011. *Determination of Ionophores in Raw Bovine Milk Using LC–MS/MS: Application to Residue Surveillance.* *Food Chemistry*, 127(1), 321–326.
109. **Voet JG. & Voet D.** 2004. (2nd ed.) *Biochemistry*, Vol. 1, Michigan: J. Wiley & Sons.

110. Volmer DA. & Lock CM. 1998. *Electrospray Ionization and Collision-Induced Dissociation of Antibiotic Polyether Ionophores. Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(4), 157–164.
111. Wang XH, Fang QX, Liu SP. & Chen L. 2012a. *The Application of Pseudo Template Molecularly Imprinted Polymer to the Solid-Phase Extraction of Cyromazine and Its Metabolic Melamine from Egg and Milk. Journal of Separation Science*, 35(12), 1432–1438.
112. Wang XH, Fang QX, Liu SP. & Chen L. 2012b. *Preparation of a Magnetic Molecularly Imprinted Polymer with Pseudo Template for Rapid Simultaneous Determination of Cyromazine and Melamine in Bio-Matrix Samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(5), 1555–1564.
113. Ward TLC, Moran JW, Turner JM. & Coleman MR. 2005. *Validation of a Method for the Determination of Narasin in the Edible Tissues of Chickens by Liquid Chromatography. Journal of AOAC International*, 88(1), 95–101.
114. Wu YL, Wang LJ, Yang T, Zhao J. & Huangfu WG. 2009. *Determination of Narasin in Chicken Tissues by High Performance Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization. Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(7), 1069–1072.
115. Wu YL, Xu Y, Yang T. & Huang-Fu WG. 2011. *Simultaneous Determination of Zoalene and Its Metabolite in Chicken Muscle and Liver by SPE and UPLC-MS-MS. Chromatographia*, 74(11-12), 833-838.
116. Yakkundi S, Cannavan A, Elliott CT, Lovgren T. & Kennedy DG. 2001. *Development and Validation of a Method for the Confirmation of Nicarbazin in Chicken Liver and Eggs Using LC–Electrospray MS–MS According to the Revised EU Criteria for Veterinary Drug Residue Analysis. Analyst*, 126(11), 1985–1989.
117. Yakkundi S, Cannavan A, Elliott CT, Lovgren T. & Kennedy DG. 2003. *Development and Validation of a Method for the Confirmation of Halofuginone in Chicken Liver and Eggs Using Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography B*, 788(1), 29–36.
118. Yue ZF, Kang HN, Chen XX, Xiao CG, Hou LX, Luo ZJ, Zhao FJ. & Shen JC. 2012. *Simultaneous Determination of 20 Coccidiostat Residues in Chicken by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(8), 1262–1266.
119. Zhan J, Yu XJ, Zhong YY, Zhang ZT, Cui XM, Peng JF, Feng R, Liu XT. & Zhu Y. 2012. *Generic and Rapid Determination of Veterinary Drug Residues and Other Contaminants in Raw Milk by Ultra Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 906, 48–57