

HAYVANSAL DOKULARDA TETRASİKLINLERİN SAPTANMASINDA EKSTRAKSİYON VE İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

A COMPARISON OF EXTRACTION AND THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR THE DETECTION OF TETRACYCLINE RESIDUES IN ANIMAL TISSUES

Nursel DEVELİ İŞİKLİ¹, Sevgi GÖKTÜRK²

¹Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Çiftlikköy, MERSİN

² Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Müdürü, Yenimahalle, ANKARA

ÖZET: Yem katkısı ve tedavi amacı ile kullanılan Tetrasiklinlerin et, böbrek, karaciğer örneklerinde yasal olarak izin verilen düzeyini (100 µg/g) saptayacak ekstraksiyon ve ince-tabaka kromatografisi yöntemleri karşılaştırılmıştır. Her üç doku örneğinde MALISCH ekstraksiyon yöntemi ve yüksek-performanslı ince-tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi yasal düzeyi belirlemek için uygun bulunmuştur.

ABSTRACT: Tetracycline antibiotics are most widely applied antibiotics for the treatments of animal and feed additives. Extraction and thin-layer chromatographic methods are compared for measuring legal residue level of tetracyclines (100 µg/g) in meat, kidney and liver. MALISCH extraction methods and high-performance thin-layer chromatography methods are found proper for legal residue level in animal tissues.

GİRİŞ

Çağdaş üretim tekniklerinin gereği olarak hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotiklerin yemlerde kullanılması, hayvanlarda ve indirek olarak da insanlarda antibiyotiklere dirençli bakterilerin artmasına neden olmuştur (CONCON, 1988; LEVY, 1987). Bu nedenle ülkeler bu ilaçların ürünlerde kalış süreleri ve kalıntı düzeyleri konusunda yasal düzenlemeler getirmiştir (HEESCHEN ve BLUTHGEN, 1990). Antimikrobiyal maddelerin, toksik düzeyleri üzerinde yapılan çalışmalarla, tolere edilebilir düzeyleri belirlenmiştir. Birçok ülkede gıdalarda antibiyotiklerin ölçülemeyen düzeylerinin tolere edilebilir olduğuna karar verilmiş ve çok düşük düzeyleri ölçebilecek duyarlı yöntemler geliştirilmiştir (GUSTAFSON, 1993).

Hayvan sağlığında ve yemlerde yaygın kullanılan antibiyotiklerden olan tetrasiklinler için, gıdalardaki kontrollerinde mikrobiyolojik, ince tabaka kromatografisi (TLC), TLC/biyotografik, sıvı kromatografisi gibi yöntemler kullanılmıştır (BRADY ve KATZ, 1987; OKADA ve ark., 1988; OKA ve ark., 1986; ASHWORT, 1985; NEIDERT ve ark., 1987; THOMAS ve ark., 1983).

Bu çalışma ile hayvansal doku örneklerinde, tetrasiklinler için yasalarımızda izin verilen 100 µg/g düzeyini (ANONYMOUS, 1997) kontrol edebilecek güvenilir yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METHOT

Materyal

Tetrasiklin standartları olarak, Sigma firmasından sağlanan tetrasiklin (TC), oksitetrasiklin (OTC), klortetrasiklin (CTC) kullanılmıştır. Sırt bölgesinden alınan et, böbrek ve karaciğeri kapsayan doku örnekleri, mezbahada kesim anında aynı hayvandan alınmıştır.

Tetrasiklin Stok Standardının Hazırlanması

Her bir tetrasiklinden 100 mg tartılıp 10 mL ölçülü balonda metanol'le hacmine tamamlanmıştır. Çalışma standartları hazırlanırken seyreltmeler metanol ile yapılmıştır.

Ayraçlar

Renk gelişimini sağlamak için %0.5 lik demir (III) klorür, %50 lik kalay klorür, %0.5 lik Fast violet B, 1 N HCl ve konsantre H₂SO₄ kullanılmıştır (STHAL, 1969; OKA ve UNO, 1984).

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Silikajel HPTLC (Merck 5631), silikajel TLC (Merck 5721) hazır plakaları, doymuş Na₂EDTA ile ön-develope işlemi uygulandıktan veya doymuş Na₂EDTA ile spreylendikten sonra oda sıcaklığında kurutulmuşlar ve 130°C'de 2 saat aktive edilmişlerdir. Örnekler ve standart karışımları uygulandıktan sonra plakalar kloroform-metanol- %5 Na₂EDTA karışımında geliştirilmişlerdir. Silikajel G ve silikajelG+%5 Na₂EDTA ile hazırlanmış plakalar ve TLC (Merck 5721) ve de HPTLC (Merck 5631) ise, örnek ve standart karışımlarının uygulanmasından sonra, Çizelge-1'de verilen solvent sistemlerinde develope edilmişlerdir (STHAL, 1969; OKA ve UNO, 1984).

Örneklerin ekstraksiyonu

Örneklerden tetrasiklinlerin ekstraksiyonunda iki ayrı yöntem kullanılmıştır.

1- Yöntem A: 50 g numune 75 mL asetonitril'le iki kez ekstrakte edilerek zayıf basınç altında porselen filtreden geçirilmiştir. Filtrat 100 mL hekzanla yıkanmıştır .Ayrılan asetonitril fazına NaCl ve daha sonra diklorometan eklenerek sulu faz ayrılmış, organik faz evapore edilmiştir. 6 mL metanol-asetonitril-su (1:1:1) ile çözülerek vialle alınmıştır. Daha sonra hekzan ile yıkanıp, kalıntı etil asetat fazına alınmıştır. Azot gazı altında kurutulup 0.2 mL metanol'le çözülerek TLC plakalarına uygulanmıştır (MALISCH ve HUBER, 1988).

2. Yöntem B: 20 g örnek 0.02 N HCl-0.1N Na₂EDTA ile homojenize edilerek, 98°C'de 10 dakika ısıtılmıştır. Karışım 2000 rpm de 10 dakika santrifüjlendikten sonra %50 oranında triklorasetikasit ilave edilmiştir. Filtratta 2 mL konsantre HCl eklenerek 98°C de 10 dak. ısıtılmış ve soğutulduktan sonra santrifüjlenmiştir. Üst kısmın pH'sı Na-sitrat ile 3.5-4.5'a ayarlanmıştır. Ekstrakta 10 mL diklorometan eklenerek karıştırılmış, daha sonra diklorometan fazı ayrılmış ve evapore edilmiştir. Kalıntı 0.2 mL metanol de çözüldükten sonra TLC plakalarına uygulanmıştır (ASHWORTH, 1985).

Geri Alma Denemesi

Yöntem A ve B ye göre analiz edilip, tetrasiklin içermediği belirlenen et örneklerinde 0.1; 0.2; 0.5 µg/g düzeyinde ve her üç tetrasiklini içeren standart karışımı eklenerek her iki yönteme göre ayrı ayrı analiz edilmiştir.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Plaka ve Solvent Sisteminin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan plakalar, solvent sistemleri ve bunlara ait kod numaraları Çizelge -1 de verilmiştir. Araştırmada ilk olarak TC, OTC ve CTC için, plaka, solvent sistemi ve teşhisi kolaylaştıran ayraçların seçimi yapılmıştır. Bu amaçla her bir tetrasiklin seçilen plakalara 30-500 ng düzeyinde uygulanmış ve kendi solvent sistemlerinde geliştirilmiştir (Çizelge -1). Geliştirilen plakaların tümü UV lamba altında 360 nm'de ve Çizelge-2 de verilen ayraçlar ile incelenerek en iyi kromatografik ayrımın gerçekleştiği plaka ve solvent sistemi belirlenmiştir. Plakalar değerlendirilirken her bir plakadaki Rf değerleri, lekelerin dağınıklık durumu, renk veya floresans şiddeti, gözlenebilen konsantrasyon düzeyi göz önüne alınmıştır. Bu değerlendirmelere göre özellikle Çizelge-1 deki 1,2,3,4,5,6,7 nolu durumlarda her üç tetrasiklinin birbirinden net bir şekilde ayrılmadığı Rf değerlerinin yakın olduğu gözlenmiştir. Aynı örneklerde plakada gözlenen düzey özellikle OTC, CTC için 300 ng üzerinde kalmıştır. Bu nedenle solvent sistemi üzerinde Rf değerini geliştirecek herhangi bir düzenlemeye gidilmemiştir. Diğer 4 durumda ise, her üç tetrasiklin Na₂EDTA ile ön-developpe spreyleme işlemine tabi tutulan HPTLC TLC plakalarında,

Çizelge-1 Tetrasiklinlerin Belirlenmesinde Kullanılan Durucu Faz ve Solvent Sistemleri

| Kod. No | Durucu Faz | Solvent Sistemi |
|---------|---|---|
| 1 | Slikajel G | Butanol-asetik-su (60:20:20) |
| 2 | Silikajel G | Butanol-metanol-%10 sitrik asit (57.5:14.2:28.6) |
| 3 | TLC (Merck, 5721) | Butanol-metanol-%10 sitrik asit (57.5:14.2:28.6) |
| 4 | HPTLC (Merck, 5631) | Butanol-metanol-%10 sitrik asit (57.5:14.2:28.6) |
| 5 | Silikajel G+Na ₂ EDTA | Butanol-oksalik asit-su (50:2.5 g:50) |
| 6 | Silikajel G+Na ₂ EDTA | Butanol-tartarik asit-su (50:3g:50) |
| 7 | Silikajel G+Na ₂ EDTA | Kloroform-metanol-%5 Na ₂ EDTA (65:20:5) |
| 8 | Na ₂ EDTA ile ön-developpe HPTLC (Merck, 5631) | Kloroform-metanol-%5 Na ₂ EDTA (65:20:5) |
| 9 | Na ₂ EDTA ile spreyleneş HPTLC (Merck, 5631) | Kloroform-metanol-%5 Na ₂ EDTA (65:20:5) |
| 10 | Na ₂ EDTA ile ön-developpe TLC (Merck, 5721) | Kloroform-metanol-%5 Na ₂ EDTA (65:20:5) |
| 11 | Na ₂ EDTA ile spreyleneş TLC (Merck, 5721) | Kloroform-metanol-:5 Na ₂ EDTA (65:20:5) |

kloroform-METANOL- %5Na₂EDTA solvent sisteminde geliştirildiklerinde iyi bir kromatografik ayırım göstermişlerdir (Çizelge-3). Kromatografik ayırımın iyi olduğu bu dört durumda, seçilen ayrıca bağılı olarak plaka üzerinde gözlenen tetrasiklin düzeyleri 50-100 ng arasında değışmiştir.

Uygun Ayracın Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan ayrıçlar, bunların hazırlandığı ortamlar ve ayrıçların renk geliştirmesi için gereken koşullar Çizelge-2'de verilmiştir. Her üç tetrasiklinin, plakalardaki durumları UV lamba ve ayrıçlar kullanılarak incelendiğinde, ayrıç kullanımı seçilen tüm plakalarda tetrasiklinleri daha belirgin hale

getirilmiştir. Ancak SbCl₃, FeCl₃ ve HCl ayrıçları kullanıldığında 100 ng düzeyinde gözlenen renk çok silik olmuştur. H₂SO₄ ayrıcı kullanıldığında tetrasiklinlerin yanı sıra plakanın tümü bu ayrıçtan etkilenmiş, zemin rengi dalgalı, kirli bir görünüm almıştır. Fast violet-B +piridin uygulamasında ise, tetrasiklinler kırmızı renkli ve belirgin benekler oluşmuş, art alan diğer ayrıç uygulamalarından farklı olarak daha temiz, beyaz kalmıştır. Plaka üzerindeki 50 ng düzeyi bu ayracın uygulanması ile gözlenebilmiştir (Çizelge-4). Kullanılan ayrıçların tümü, duyarlı oldukları tetrasiklin düzeylerinde, sürekli tekrarlanabilir sonuçlar vermişlerdir.

Fast violet-B+piridin'in uygulandığı plakalar beneklerin dağılımı yönünden karşılaştırıldığında ise, en uygun ayırım 8 nolu (Çizelge 1) durucu faz ve solvent sisteminde elde edilmiştir. OKA ve UNO (1984)'in belirttiğine göre, bu uygulamadaki en önemli olumsuzluk, toksik bir madde olan piridin'in kullanımıdır. Bir diazonium tuzu olan Fast violet-B tetrasiklinin elekt-

Çizelge 2. Tetrasiklinlerin Belirlenmesinde Kullanılan Ayrıçlar

| Ayrıçlar | Renk Geliştirme |
|---|--|
| %50 SbCl ₃ (Asetik asite) | 110° C'de 5 dak. |
| Konsantr H ₂ SO ₄ | 110°C'de 5 dak |
| %5FeCl (suda) | Amonyak buharı |
| %0.5 Fast Violet B (suda) | 110°C'de 5 dak + Piridin ile spreyleme |
| 1 N HCl | 500 C'de 5 dak. |

Çizelge 3. Tetrasiklinlerin Farklı Plakalardaki⁽¹⁾ Rf Değerleri

| Durucu Faz | Rf değerleri ⁽²⁾ | | |
|---|-----------------------------|------|------|
| | OTC | TC | CTC |
| Na ₂ EDTA ile ön-developpe HPTLC (Merck, 5631) | 0.30 | 0.55 | 0.64 |
| Na ₂ EDTA ile spreyleneş HPTLC (Merck, 5631) | 0.25 | 0.48 | 0.56 |
| Na ₂ EDTA ile ön-developpe TLC (Merck, 5721) | 0.23 | 0.43 | 0.51 |
| Na ₂ EDTA ile spreyleneş TLC (Merck, 5721) | 0.21 | 0.39 | 0.48 |

1 Plakaların tümünde Kloroform-metanol-%5 Na₂ EDTA (65:20:5) solvent sistemi kullanılmıştır.

2 Rf değerleri; tetrasiklinlerin plaka üzerindeki 100 ng düzeylerinin 5'er kez uygulanması sonucu elde edilmiştir.

ron veren grupları ile birleşerek renkli bileşikler oluşturur. Elektron verme yeteneği nötr ve orta düzeylerdeki bazik ortamlarda asidik ortamlardan daha fazla olduğundan, tetrasiklinleri belirlemede diazonium grupları kullanılırken ortam bazik hale getirilmektedir. Yapılan çalışmalarda diazonium tuzlarından fast violet-B'nin tetrasiklinler için uygun olduğu ve bu tuzun kullanımında ortam herhangi bir inorganik bazla bazik hale getirildiğinde benekler silik ve tekrarlanabilirlik düşük olmasına karşın, piridin ile ortam bazik hale getirildiğinde benekler daha renkli ve tekrarlanabilirlik yüksek olmuştur (OKA ve UNO, 1984). Yapmış olduğumuz çalışmada da, bu gerekçe ile diazonium tuzlarından sadece Fast violet-B ve bazik ortam oluşturmak içinde piridin kullanılmıştır.

Doku Örneklerinde Tetrasiklinlerin Belirlenmesi

Doku örneklerinden tetrasiklinin ekstrakte edilmesinde iki ayrı yöntem kullanılmıştır. Ancak, ASHWORT (1985)'de önerilen yöntemde asit ve sıcaklık uygulaması ile tetrasiklinler anhidro forma dönüştürüldüğünden, bu yöntem uygulanırken standart lar plakalara uygulanmadan önce, önerilen şekilde HCl ilave edilip, 98°C'de 10 dakika tutularak anhidro forma dönüştürülmüştür. Anhidro forma dönüştürülen standartlar plakaya uygulanıp Rf değerleri tespit edilmiştir (Çizelge-5).

Her iki yöntemin karşılaştırması geri almadaki başarıları ile yapılmıştır. Doku örnekleri Yöntem A ve Yöntem B'ye göre analize alınmış, her üç tetrasiklinin saptanmadığı örnekler geri alma çalışmasında kullanılmıştır. Doku örneklerine 0.1, 0.2, 0.5 µg/g düzeyinde üç tetrasiklini içeren standart karışımı eklenmiştir. Standart eklenmiş örnekler ve kontrol örnekleri her iki analiz yöntemine (Yöntem A ve Yöntem B) göre ekstrakte edilmişlerdir.

Elde edilen ekstraktlar, plaka üzerinde değerlendirilirken örneklere eklenen her bir düzeyin eş değeri standart karışımları da plakaya uygulanmıştır. Böylece plaka üzerinde 100, 200, 500 ng düzeyinde geri alınabilirlik kontrol edilmiştir. Ayrıca bu düzeylerin ± %30'unu içeren standart karışımları da aynı anda plakaya uygulanmıştır. Böylece yöntemlerin geri almadaki yeterliliği gözün fark edebileceği farklılık düzeyi olarak kabul edilen ±%30 düzeyleri ile kontrol edilmiştir (COKER ve ark. 1985). Uygulamaya alınan her iki yöntemde de et, böbrek, ve karaciğeri içeren doku örneklerine 100-500 µg/g düzeyinde eklenen tetrasiklinlerin %90'ı geri alınmıştır.

Yapılan çalışma sonunda uygulanan her iki yöntem ve seçilen durucu faz, solvent sistemi ve ayraçlar ile her üç tetrasiklin için saptanabilirlik düzeyi 50 µg/g olarak belirlenmiştir. Ancak, ASHWORT (1985)'de önerilen ve FSIS (Food and Safety and Inspection Service) tarafından doku örneklerindeki tetrasiklinlerin saptanmasında kullanılan yöntemde, asit ve sıcaklık uygulaması ile tetrasiklinler anhidro forma dönüştürülmektedir. Bu işlemin örnek ekstraktları yanında kontrolde kullanılan standart karışımlarına da uygulanma zorunluğu analiz süresinin uzamasına neden olmaktadır. Test edilen diğer yöntem (MALISH ve HUBER 1988) ise, çoklu antibiyotiklerin belirlenmesine olanak tanımaktadır ve uygulanabilirliği daha kolaydır. Bu gerekçelerle tetrasiklinlerin rutin kontrollerinde MALISCH ve HUBER (1988)'de önerilen ekstraksiyon yöntemi ASHWORT (1985)'de önerilen yöntemeye göre daha uygun bulunmuştur.

Çizelge 4. Farklı Sprey Ayraçlarının Plakalardaki⁽¹⁾ Tesbit Düzeyi

| Sprey Ayraç | Tesbit Düzeyi (ng) | Plakadaki art alan |
|--|--------------------|----------------------|
| %50 SbCl ₃ Asetik asite) | 100 | Beyaz |
| %5FeCl (suda) | 100 | Sarımsı beyaz |
| 1 N HCl | 100 | Beyaz |
| Konsantre H ₂ SO ₄ | 75 | Açık-koyu kahverengi |
| %0.5 Fast Violet B (suda) | 50 | Beyaz |

¹ Çizelge-1'deki 8,9,10,11 nolu plakaların tümünde.

Çizelge 5. Tetrasiklinlerin ve Anhidro-Tetrasiklinlerin HPTLC Plakalardaki⁽¹⁾ Rf Değerleri

| Tetrasiklinler | Rf değerleri |
|----------------|--------------|
| OTC | 0.30 |
| TC | 0.55 |
| CTC | 0.64 |
| Anhidro-OTC | 0.45 |
| ANHİDRO-TC | 0.59 |
| Anhidro-CTC | 0.68 |

¹ Plakalar klorofom-metanol-%5 Na₂EDTA (65:20:5)'de geliştirilmiştir.

Yapılan çalışma sonunda, doku örneklerindeki TC, OTC, CTC'nin belirlemede, aşağıda özetlenen yöntem ve koşullar uygun bulunmuştur.

Ekstraksiyon yöntemi: Detayları Metot bölümünde Yöntem-A altında verilen ve örneklerin asetonitrille ön ekstraksiyonu ve hekzanla yağlı kısımların uzaklaştırılmasından sonra etil asetat fazına kalıntının alınıp kurutulması..

Durucu faz : Na2EDTA ile ön-developpe edilmiş HPTLC plakası.

Solvent Sistemi : %5 Na2EDTA-Kloroform-Metanol (5:65:20)

Ayraç : %0.5 Fast Violet B+ piridin.

Hayvan beslemede semirtme ve tedavi amacıyla uygulanan tetrasiklinlerin gıdalardaki maksimum kalıntı düzeyleri ülkelere ve gıdaya göre değişmekle beraber, bu değer 100-400 µg/g arasında olup, ülkemizde doku örnekleri için bu değer 100 µg/g olarak belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada tetrasiklinlerin saptanabilirlik düzeyi 50 µg/g olarak belirlenmiş olup bu düzey tetrasiklinler için getirilen sınır düzeyleri kontrol etmek için yeterlidir.

KEUKEN ve ark. (1992), antibiyotik ve benzeri maddelerin kalıntıları ile ilgili kontrol programları genellikle iki aşama halinde yürütüldüğünü ilk aşamada basit, ucuz ve rutin uygulanabilir bir yöntemin seçilmesini, bunu ikinci aşamada doğrulama testlerinin izlemesi gerektiğini belirtmişlerdir. Ancak tarama yöntemlerinin hatalı negatif sonuçlar vermemesi ve hatalı pozitif sonuçlarında belli bir yüzde ile sınırlı olması gerektiğini ifade etmişlerdir. Birçok ülkede antibiyotik kalıntıları, Swap test diye tanımlanan geniş spektrumlu inhibisyon testleri ile tanımlanmaktadır. Ancak bu testlerle çok sayıda örneğin kontrolü yapılabilmesine karşın hatalı pozitif sonuç oluşturma oranının yüksek olması nedeni ile TLC/biootografik yöntem daha uygun olduğu belirtilmiştir (NEIDERT ve ark., 1987).

Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan HPTLC yöntemi, Swap testler kadar kolay olmamakla beraber, uygulanabilirliğinin kolay olması, plakalarda bir anda birkaç örneğin birden analizine olanak vermesi, geri alma düzeyinin yüksek olması, tekrarlanabilirliği ve doku örnekleri için yeterli hassasiyetlerde olması nedeni ile, hayvansal dokuların rutin kontrolünde başarı ile kullanılabilir ve önerilebilecek bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 1997. Veteriner ilaçları. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Resmi Gazete Sayı 23172.
- ASHWORT, B.R., 1985 Liquid chromatographic assay of Tetracycline's in tissue of food producing animals. J. AOAC. 68:5, 1013-1017.
- BRADY, S.M. and KATZ, S.E., 1987. Simplified plate diffusion system for microbial assay of antibiotics. J.AOAC. 66, 1521-1526.
- COKER, R.D., JONES, B.D., NAGLER, M.J., GILMAN, G.A., WALLBRIDGE, A.J., DANIGRAHI, S., 1984. The basis of chromatography; TLC and densitometry, Mycotoxine training manual. Tropical development and research institute overseas development administration. 127 Clerkenwell road. London ERIC 5 BD.
- CONCON, J.M. 1988. Food toxicology Part B. Contaminants and additives. New York and Basel Pp1371.
- GUSTAFSON, R.H., 1993. Historical perspectives on regulatory issues of antimicrobial resistance. Vet. Human Toxicol. 35 (supplement 1) 2-5.
- HEESCHEN. W.H., and BLUTHGEN, A., 1990. Residues and contaminants in milk and milk products. International dairy federation special issue 9101, IDF General secretariat 41, Square Vertote, B-1040 Brussels, pp 189.
- KEUKENS, H.J., AERTS, M.M.L. and TRAAG, W.A., 1992. Analytical strategy for the regulatory control of residues of Chloramphenicol in meat preliminary studies in milk. J. AOAC. International. 75:2, 245-256.
- LEVY, B.S., 1987 Antibiotic use for growth promotion in animals: Ecology and public health consequences. J. Food Protection 50:7, 616-620.
- MALISCH, R., and HUBER, L., 1988. Determination of residues of chemotherapeutic and antiparasitic drugs in foodstuff of animal origin whit liquid and UV7VIS diode-Array detection. J. Liquid Chrom. 11:13, 2801-2827.
- NEIDERT, E., PETER, W.S. and TITTIGER, F., 1987, Thin layer chromatography/bioautografic method for identification of antibiotic residues. J. AOAC. 70:2, 197-200.
- OKA, H. and UNO, K., 1984. Improvement of chemical analysis of antibiotics. J. Chrom. 295, 129-136.
- OKA, H., IKAI, Y., KAWAMURA, N., UNO, K. And YAMADA, M., 1986. Improvement chemical analysis of antibiotics, determination of eight Tetracycline's using thin layer and high-performance liquid chromatography. J. Chrom. 393, 285-296.
- OKADA, J., HIGUCHI, I. and KONDO, S., 1988. Determination of residual Cephalax in chicken tissues by *Bacillus stearothermophilus* paper. J.AOAC. 71:2, 337-340.
- STHAL, E., 1969 Thin-layer chromatography. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1041.
- THOMAS, M.H., ESPEIN, R.L., ASWORTH, R.B. and MARKS, H., 1983. Quantitative thin layer chromatographic Multi-Sulfonamide screening procedure: Collaborative study. J.AOAC. 66:4, 884-892.