

HAYVANSAL DOKULARDA İNCE-TABAKA KROMATOĞRAFI
YÖNTEMİ İLE TETRASİKLIN REZİDÜLERİNİN TAYİNİ

*Determination of tetracycline residues in animal
tissues by thin-layer chromatography*

H. Ahmet ACET¹
Ömer DEMET²
Bünyamin TRAF³

Summary : This study was evaluated to determine by thin layer chromatography of their residues to be found in animal tissues of tetracycline group antibiotics, which were widely used in Veterinary field.

It was used 1N HCL and methanol in extraction of samples and an Amberlite XAD-2 resin column for clean-up. Slicagel 60 G, cellulose and slicagel HF₂₅₄ were applied as adsorbent. It was shown that cellulose was better result than others.

Their recovery were approximetaly determined as 62 %, adding the tetracyclines at 0.5, 1.0 and 1.5 ppm concentrations to the tissues (muscle, liver, kidney) which was not found the tetracyclines residues. The analyse sensitivity of this system was 1.0 ppm for liver and 0.5 ppm for muscle and kidney.

It was concluded that this method would be able to be used for determination of tetracyclines residues in animal tissues as routine.

Özet : Bu çalışmada, Veteriner hekimliğinde yaygın olarak kullanılan tetrasiklin grubu antibiyotiklerin hayvansal dokularda bulunabilecek rezidülerinin ince tabaka kromatografi yöntemi ile analizleri üzerinde duruldu.

Ekstraksiyon işleminde 1N HCL ve metanol, temizleme aşamasında ise Amberlite XAD-2 resin kolonu kullanıldı. Plaka adsorbantı olarak se-

-
- (1) Doç. Dr., S. Ü. Vet. Fak. Farm. ve Toks. Anabilim Dalı - Konya
 - (2) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Vet. Fak. Farm. ve Toks. Anabilim Dalı - Konya
 - (3) Arş. Gör., S. Ü. Vet. Fak. ve Farm. ve Toks. Anabilim Dalı - Konya

lülöz, slikaşel 60 G ve slikaşel HF₂₅₄ uygulanarak, selülozun diğlerlerine göre daha iyi sonuç verdiği belirlendi.

Rekoveri için tetrasiklin kalıntılarının bulunmadığı belirlenen dokulara (kas, karaciğler, böbrek) 0.5, 1.0 ve 1.5 ppm yoğunluklarında tetrasiklinler ilave edilerek, geriye kazanç yüzdeleri yaklaşık % 62 olarak tespit edildi. Analiz duyarlılığı ise karaciğerde 1. ppm, kas ve böbrekte 0.5 ppm olarak bulundu.

Bu metodun hayvansal dokulardaki tetrasiklin rezidülerinin tayininde rutin olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Giriş

Tetrasiklinler, Streptomyces türü mantar kültürlerinden elde edilen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Doğal kaynaklı tetrasiklin türevlerinden (Tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve dimetilklortetrasiklin) başka, yarı sentetik (doksisisiklin, minosiklin ve rolitetrasiklin) türevleri bulunmaktadır. Veteriner Hekimliğinde, bunlar en sık kullanılan antibiyotiklerin bulunduğu grubu oluşturur. Günümüzde, bu antibiyotikler insan ve hayvanlarda bakteriyel hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta (3, 6, 11, 15, 22), ayrıca, hastalıkların kontrol altında tutulması ve canlı ağırlık artışı sağlamak amacıyla, genç sığırların ve kümes hayvanlarının yemlerine ilave katkı maddesi olarak da katılmaktadır (5, 21). Bu gibi yemlerle beslenen hayvanların dokularında rezidü düzeyinde tetrasiklin kalıntılara rastlanmaktadır (2, 4, 6, 10, 16).

Son zamanlarda, başta et ve et ürünleri olmak üzere hayvansal kökenli gıda maddelerinde bulunması muhtemel olan bu kimyasal rezidüler tüketicinin yakından ilgisini çekmeye başlamıştır. Bazı ülkelerde, insanlar tarafından gıda olarak tüketilen hayvansal dokularda ve ürünlerde rezidü analizleri gıda tüzüğüne göre rutin olarak yapılmaktadır. Ülkemizde de bu tür analizlerin yapılması gereği kaçınılmaz olmuştur.

Plazma ve dokularda tetrasiklin rezidü düzeyleri mikrobiyolojik (6, 13, 20), spektrofotometrik (15), fluorometrik (14), kolorimetrik (17) ve kromatografik (1, 7, 8, 12, 12, 18, 19) yöntemlerle tespit edilebilmektedir.

FDA (Food and Drug Administration) klortetrasiklin ve oksitetrasiklin'in yenilebilir dokulardaki tolerans düzeylerini 1-4 ppm olarak belirtmektedir (9).

Bu çalışmada, hayvansal dokularda tetrasiklin rezidü düzeylerinin yarı-nicel olarak tespit edilebilmesini sağlayacak, laboratuvar şartlarına

uygun, rutin analizlerde kullanılabilecek pratik, güvenilir ve ekonomik bir yöntemin uyarlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

a) Adsorbanlar :

1. Selüloz (Mikrokristal, İnce-Tabaka Kromatografisi için Sigma, No. S-3504).
2. Slikajel G (İnce-Tabaka Kromatografisi için, Type 60, Merck, Art. 7731).
3. Slikajel HF₂₅₄ (İnce-Tabaka Kromatografisi için, Type 60 Merck Art. 7739).
4. Amberlite XAD-2 resin (Kolon Kromatografisi için, Sigma No. A-T 643).

b) Ayraçlar :

1. 0.2M disodyum hidrojenortofosfat çözeltisi : 2.84 g Disodyum hidrojenortofosfat, 100 ml'lik balon jodede distile su ile çözdürülerek hazırlandı.
2. 0.1M Sitrik asit çözeltisi : 2.10 g Sitrik asit 100 ml balon jodede su ile çözdürülerek hazırlandı.
3. 1N Hidroklorik asit çözeltisi : 80.6 ml HCL distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
4. 0.1N Hidroklorik asit çözeltisi : 8.06 ml HCL distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
5. Etilen glikol çözeltisi (% 20'lik) : Metanolde hazırlandı.
6. 0.2M Magnezyum klörür çözeltisi : 1.9 g Magnezyum klörür 100 ml'lik balon jodede distile su ile çözdürülerek hazırlandı.
7. Triethanolamin çözeltisi (% 10'luk) : Metanolde hazırlandı.
8. Antibiyotik standart solüsyonları : Toz şeklindeki oksitetrasiklin HCL, klortetrasiklin HCL, tetrasiklin HCL, standartları Sigma'dan sağlandı.
 - a. Stok çözelti (10 mg/ml'lik) : Üç ayrı tetrasiklin standartından 100'er mg tartılarak 10'ar ml'lik balon jodede 0.5 ml 0.1N HCL ile çözdürüldü. Metanol ile hacim tamamlandı.

b. Çalışma çözeltileri (0.1 ve 0.2 mg/ml'lik) : Stok çözeltilerinden metanolde günlük hazırlandı.

c. Rekover çözeltileri (5 mg/ml'lik) : 0.1mg/ml çalışma çözeltilerinden distile su ile günlük hazırlandı.

c) *Çözücüler :*

Metanol (Merck, Art. 6008)

Etil asetat (Merck, Art. 864)

N-bütanol (Merck, Art. 988)

d) *Cihazlar :*

1. İnce-Tabaka Kromatografi cihazı (Desega)
2. UV-lambası (Desega, uzun-366 nm ve kısa-254 nm dalga)
3. Rotatif evaporatör (Heidelholph)

Metot

Çalışmada, uyarılmanın gerçekleştirilebilmesi için ekstraksiyon ve temizleme işlemlerinde Ryan ve Dupont (18)'un kromatografik işlemlerine ise, Szabo ve ark. (19)'nın önerdikleri teknikler dikkate alındı.

Temizlenmiş ekstrakta tetrasiklin varlığının tespiti, çeşitlerinin ayırt edilmesi ve yarı-nicel olarak belirlenmesi, ince-tabaka kromatografisinde UV ışığı altında, triethanolamin ve magnezyum klörür ayırmaçlarına dayanan doğrulama testleriyle yapıldı (19).

İşlemler :

Homojenizatör kabına konulan 25 g kıyılmış doku örneği (kas, karaciğer ve böbrek) üzerine rekoveri çözeltilerinden 0.5, 1.0 ve 1.5 ppm düzeylerinde tetrasiklin standartları ve 100 ml 1N HCL konarak orta hızda 2 dk. homojenize edildi. Karışım 250 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Kalıntı 2 x 0.5 ml 1N HCL ile yıkanıp tüplere ilave edilerek 5000rpm devirde 15 dk santrifüj edildi. Üstte kalan faz, Whatmann No. 41 süzgeç kağıdından süzüldü.

Kolon kromatografisi hazırlanması : 10 x 20 cm iç çaplı cam kolonun alt ucuna uygun bir şekilde cam pamuğu yerleştirildi. Üzerine 8 g Amberlite XAD-2 resin ilave edilerek yine aynı şekilde cam pamuğu yerleştirildi. Sırasıyla 10'ar ml'lik hacimde aseton, metanol ve distile su ile kolon yıkandı. Kolona 15 ml 1N HCL konarak kullanılıncaya kadar bu şekil-

de muhafaza edildi. Kullanılmadan önce kolon 100 ml'lik distile su ile yıkandı.

Kolon rejenerasyonu : Gerektiğinde kolonun yeniden kullanılması için; sırasıyla 50 ml metanol, 25 ml 1N HCL ve tekrar 50 ml metanol, 25 ml 1N HCL ile yıkanarak rejenerasyon sağlandı.

Tetrasiklin standartlarının elüsyonu : Süzülmüş filtrat hazırlanan kolona aktarılarak yavaş bir şekilde kolondan geçirildi. Kolon 75 ml distile su ile yıkandıktan sonra 50 ml metanol kondu. İlk 15 ml'lik metanol birimi musluktan alınarak atıldı. Kalan hacim 35 °C evaporatörde kuruyuncaya kadar uçuruldu. Kalıntı 0.5 ml metanolde çözdürülerek ince-tabaka kromatografisinde kullanıldı.

Plakaların hazırlanması : 30 g selüloz, 70 ml 0.2M disodyum hidrojortofosfat ve 84 ml 0.1M sitrik asit karışımında 2 dk. çalkalanarak iyice homojenize edildi. Önceden hazırlanmış 5 adet (20 x 20 cm) cam plaka üzerine 0.3 mm kalınlıkta olacak şekilde yayıldı. Plakalar 15 dk süreyle laboratuvar ısısında kurutuldu ve etüvde 90 °C'de 30 dk tutularak aktive edildi.

Tetrasiklin standartlarının ve nünunelerin plakaya uygulanması ve devolapmanı :

Plakalar devolopman yönüne paralel olacak şekilde 1'er cm aralıklarla çizildi. Lekeler uygulanmadan önce etilen glikol çözeltisine daldırılıp çıkarılarak kurutuldu. Plakaların çözücü sistemine dahil olan alt kenarından 2 cm yükseklikte işaretlenmiş sembolik bir eksen boyunca 0.5 ml metanolde çözdürülmüş nümune ekstraktından 2, 5 ve 10 ml, tetrasiklin standartlarından ise 10, 20, 30, 40, 60, 80 ve 100 ng tetrasiklin ihtiva eden lekeler uygulandı. Hazırlanan plaka bir saat önceden, su ile doyurulmuş etil asetat (100 ml) konulmuş tanka yerleştirildi ve 10 cm yüksekliğe kadar devolopman sağlandı. Devolapman işlemi iki defa yapıldı.

Devolopman :

- 1) 100 ml su ile doyurulmuş etil asetat,
- 2) Su ile doyurulmuş etil asetat + n-butanol (90 + 10),
- 3) Su ile doyurulmuş etil asetat + n-butanol (60 + 40),
- 4) 100 ml su ile doyurulmuş n-butanol olmak üzere farklı solvent sistemlerinde karşılaştırmalı olarak denendi. Tanktan çıkarılan plaka laboratuvar ısısında kurutuldu. Plakaya önce triethanolamin ayırıcı, daha sonra da magnesium klörür ayırıcı püskürtüldü. Plaka karanlık bir ortamda

uzun dalga UV-ışığı (366 nm) altında incelendi. Standart klortetrasiklin HCL, oksitetrasiklin HCL ve tetrasiklin HCL farklı Rf değerinde ve sarı renkli floresans veren lekeler şeklinde belirlendi. Bununla beraber, nümune ekstraktında standart tetrasiklin lekeleriyle aynı renkte floresans veren ve Rf değeri gösteren lekeler, doku nümunesine katılan tetrasiklinler olarak değerlendirildi. Floresans şiddeti ve leke alanları bakımından farklı yoğunluklardaki tetrasiklin standartları ile karşılaştırılmaları sonucu, nümune ekstraktına ait lekelerde bulunan tetrasiklin yoğunluğu yarı-nicel olarak ölçüldü.

Bulgular

Bu çalışmada, tetrasiklin HCL ve oksitetrasiklin HCL klortetrasiklin HCL analizleri, ince tabaka kromatografisinde farklı adsorban ve çözücü sistemler kullanılarak yapıldı. Tablo 1'de görüldüğü gibi, tetrasiklin Rf değerleri kullanılan sistemlerin tümünde benzer bulundu. Ancak standartlar arasında en iyi ayırım su ile doyurulmuş etil asetat ile sağlandı. Devolapman süresinde çözücü sistemlere göre önemli farklılıklar gözlemlendi. Devolapman süresi su ile doyurulmuş etil asetat çözücü sisteminde 10-15 dk; etil asetat + n-bütanol (90 + 10) çözücü sisteminde 30-40 dk; etil asetat + n-bütanol (60 + 40) sisteminde 120-130 dk su ile doyurulmuş n-bütanol sisteminde ise 4 saat olarak tesbit edildi.

İnce-tabaka kromatografisinde kullanılan slikajel 60 G ve slikajel HF₂₅₄ adsorbanlarında standart tetrasiklinlerin belirgin bir yükselmesi görülmediği halde selüloz adsorbanında yeterli düzeyde bir yükselme meydana geldi.

Çalışmada geriye kazanç yüzdesinin belirlenmesi amacıyla doku nümunelerine (kas, karaciğer ve böbrek) 0,5, 1,0 ve 1,5 ppm düzeylerinde tetrasiklin standartları katıldı. Tablo 2'de görüldüğü gibi geriye kazanç yüzdesi; 0,5 ppm tetrasiklin HCL katımı sonucu kaslarda % 60, böbrekte % 62 olarak bulundu. Bu düzeyde karaciğerde tesbit yapılamadı. Katılan oran 1,0 ppm düzeyine çıkarıldığında geriye kazanç yüzdesi kaslarda % 65, karaciğerde % 35 ve böbrekte % 67 olarak belirlenirken, 1,5 ppm'lik düzeyde bu oranlar kaslarda % 72, karaciğerde % 30 ve böbrekte % 73 düzeylerinde bulundu. UV-ışığı altında görülebilir tetrasiklin yoğunluğu 20 ng olarak belirlendi. Analiz duyarlılığının karaciğerde 1,0 ppm, dokular-da ise 0,5 ppm olduğu tesbit edildi.

Tablo 1. Oksitetrasiklin HCL, klortetrasiklin HCL ve tetrasiklin HCL'nin selüloz adsorbantı ile kaplanmış plakalarda değişik çözücü sistemleri ile devolapmanından sonra elde edilen Rf değerleri.

Tetasiklin standartları	Etil asetat	Etil asetat n-bütanol (90/10)	Etil asetat n-bütanol (60/40)	N-bütanol
Tetrasiklin HCL	0.32	0.33	0.35	0.35
Oksitetrasiklin HCL	0.35	0.35	0.35	0.36
Klortetrasiklin HCL	0.52	0.53	0.53	0.55

Tablo 2. Doku numunelerine 0.5, 1.0 ve 1.5 ppm düzeylerinde tetrasiklin HCL standartlarının katılması ile elde edilen geriye kazanç yüzdeleri.

Doku (25 g)	Katılan standart yoğunluğu (mcg/g)	Geriye kazanılan düzeyleri (mcg)	Kazanç %'si
Kırmızı kas	0.5	7.3	60
Beyaz kas		7.3	60
Karaciğer		—	—
Böbrek		7.5	62
Kırmızı kas	1.0	16.25	65
Beyaz kas		16.25	65
Karaciğer		7.5	25
Böbrek		16.75	67
Kırmızı kas	1.5	27	72
Beyaz kas		27	72
Karaciğer		9.37	30
Böbrek		27.27	73

Tartışma ve Sonuç

Veteriner Hekimliğinde, gerek bakteriyel hastalıkların kontrol ve sağlığınımla gerekse genç sığırların ve kanatlıların canlı ağırlık artışı sağlanmasında yaygın olarak kullanılan tetrasiklin HCL, oksitetrasiklin HCL ve klortetrasiklin HCL analizleri, ince-tabaka kromatografisinde farklı adsorban ve çözücü sistemleri kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada, ince-tabaka kaplayıcısı olarak kullanılan slikajel 60 G ve slikajel HF₂₅₄ adsorbanları ile solvent sistemlerinin hiç birinde tetrasiklinlerin okunabilir düzeyde yükselmeleri sağlanamadı. Buna karşılık Tablo 1'de görüldüğü gibi selüloz adsorbanında tetrasiklinlerin Rf değerleri belirgin olarak hesaplanabildi. Çözücü sistemleri arasında en iyi sonuç su ile doyurulmuş etil asetat ile alındı. Su ile doyurulmuş n-bütanol devolapman süresi 4 saat iken, etil asetat çözücüsünde bu süre 10-15 dk olarak belirlendi.

Doku nünunelerine 0.5 ppm düzeyinde tetrasiklin standartlarının katılmasıyla elde edilen ekstraktan 2 mikrolitrelik uygulamalarda oluşan renkler belirgin bir şekilde gözlenip değerlendirilemedi; 5 mikrolitrelik düzeyde görülebilir, 10 mikrolitrelik uygulamalar da ise tümüyle belirgin renkler oluştu. Buna mukabil 1.0 ve 1.5 ppm düzeylerinde standart katılarak yapılan ekstrakt uygulamalarında 2 mikrolitrelik lekeler de bile renkler ve floresans şiddeti standartlarla karşılaştırmalı olarak yarınicel ölçüm yapılacak kadar belirgin olarak görüldü. Nitekim standartların 0.5 ppm düzeyinde katılması sonucu 2 mikrolitrelik uygulamalarda karaciğerde belirgin bir leke görülmediği halde 1.0 ve 1.5 ppm'lik katımlarda elde edilen ekstraktan yapılan 2 mikrolitrelik uygulamalarda yarınicel olarak ölçülebilen lekeler oluşmuştur. UV ışığı altında okunabilir en düşük tetrasiklin yoğunluğu 20 ng olarak belirlenmiştir. FDA'nın yenilebilir dokulardaki tolerans düzeylerinin 1-4 ppm olarak belirttiği (9) gözönüne alınırsa, yöntemin rutin analizlerde güvenle kullanılabileceği sonucuna varılabilir.

İleri temizleme aşamasında kullanılan amberlite XDA-2 resin, tetrasiklin analizlerinde önerilen (7, 18) non-iyojenik bir adsorbandır. Tetrasiklinlerin bu adsorbandan ayırımı kolay olmaktadır. Rejenere edildikten sonra yeniden kullanılabilir olması laboratuvar şartlarımızda avantaj teşkil etmektedir.

Plazma ve dokularda tetrasiklin rezidü düzeyleri mikrobiyolojik (6, 13, 20), spektrofotometrik (15), fluorometrik (14) kolorimetrik (17) ve kromatografik (1, 7, 8, 12, 13, 18, 19) yöntemlerle tesbit edilebilmektedir. Bunlar arasında mikrobiyolojik ve kromatografik yöntemler faz-

laca kullanılmaktadır. Mikrobiyolojik yöntemler antibiyotik analizlerin duyarlı olmalarına rağmen, spesifik olmamaları ve uzun süre almaları gibi dezavantajlara sahiptirler (8). Kromatografik yöntemler arasında ince-tabaka kromatografisi duyarlı bir yol olduğu gibi, ekonomik ve istenildiğinde laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilen bir yöntemdir. İnce-tabaka kromatografisi ile çalışmamızda bu avantajlar gözönünde tutulmuştur. Son zamanlarda, tetrasiklin analizlerinde HPLC (yüksek performans likit kromatografisi) yöntemi giderek yaygınlaşmaktadır (1, 7, 12). Ancak likid kromatografi cihazının pahalı olması nedeniyle sayılı laboratuvar bu yöntemi kullanma şansına sahip olmaktadır.

Sonuç olarak, hayvansal dokularda tetrasiklin rezidü düzeylerinin yarı-nicel olarak tesbit edilebilmesini sağlayacak laboratuvar şartlarına uygun rutin analizlerde kullanılacak ince-tabaka kromatografi esasına dayanan basit, güvenilir ve ekonomik bir yöntem uyarlanmıştır.

Kaynaklar

1. Ashworth, R. B. (1985). Liquid chromatographic assay of tetracyclines in tissues of food producing animals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 5, 1013-1017.
2. Black, W. D. and Gentry, R. D. (1984). The distribution of oxytetracycline in tissues of swine following a single oral dose. *Can. Vet. J.*, 25, 158-161.
3. Booth, N. H., McDonald, L. E. (1984). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 5. ed, The Iowa State University Press, Iowa.
4. Johnston, R. W., Reumer, R. H., Harris, E. W., Fugate, H. G. and Schwap, B. (1981). A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. *J. Food Protection*, 44, 828-831.
5. Katz, J. M. and Katz, S. E. (1984). Rapid assay for tetracycline in premixes and mixed feeds. *J. A. O. A. C.*, 67, 3, 576-579.
6. Korkeala, H., Sorvetula, O., Maekipetaeys, O. and Hirn, J. (1932). Comparison of different agar diffusion methods for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals. *Acta Vet. Scand.*, 23, 407-415.
7. Moats, W. A. (1986). Determination of tetracycline antibiotics in tissues and blood serum of cattle and swine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 358, 253-259.
8. Neidert, E., Saschenbrecker, W. and Tittiger, R. (1987). Thin layer chromatographic method for identification of antibiotic residues. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 70, 2, 197-200.

9. Nouws, J. F. M. (1981). Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 32, 4, 103-110.
10. Nouws, J. F. M. (1984). Irritation, bioavailability and residue aspects of ten oxytetracycline formulation administered intramuscularly to pigs. *The Veterinary Quarterly*, 6, 2, 80-84.
11. Nouws, J. F. M. and König, C. D. W. (1983). Penetration of some antibiotics into the lacrimal fluid of sheep. *The Veterinary Quarterly*, 5,3, 114-121.
12. Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, W., Uno, K. and Masuo, Y. (1987). X-determination of eight tetracyclines using thin-layer and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 393, 285-296.
13. Ouderkirk, L. A. (1976). Evaluation of two microbiological methods for detecting residual antibiotics in milking. *J. A. O. A. C.* 59, 1122-1124.
14. Poiger, H. and Schlacter, C. H. (1976). Fluorimetric determination of tetracyclines in biological materials. *Analyst.*, 101, 808-814.
15. Pollet, R. A. and Glatz, C. E. (1983). Oral adsorption of chlortetracycline in turkeys: Influence of citric acid and *Pasteurella multocida* infection. *Poultry Sci.*, 63, 1110-1114.
16. Pollet, R. A., Glatz, C. E., Dyer, D. C. and Barnes, H. J. (1983). Pharmacokinetics of chlortetracycline potentiation with citric acid in the chicken. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 9, 1718-1721.
17. Roushdi, I. M., Ibrahim, E. A., Beltagy, Y. A. and Issa, A. (1973). Chlorimetric methods for the estimation of tetracycline hydrochloride and oxtetracycline hydrochlorid. *Pharmazie*, 8; 4, 236-237.
18. Ryan, J. J. and Dupont, A. (1974). Chemical analysis of tetracycline residues in animal tissues. *J. of A. O. A. C.*, 57, 4, 828-831.
19. Szabo, A., Nagy, M. K. and Tömörkemy, E. (1987). Thin-layer chromatography assay of tetracyclines. *Journal of Chromatography*, 151, 256-258.
20. Thorpe, U. A. (1975). Agar well technique for antibiotics in animal feeds. *J. A. O. A. C.*, 58, 1, 95-98.
21. Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P. (1985). Determination of oxytetracycline; sulphamethazine and sulphamethoxypridazine in feed premixes. *Journal of Chromatography*, 330, 425-428.
22. Ziv, C. (1982). Serum oxtetracycline concentration in cows and calves after intramuscular injection of conventional and two long acting oxytetracycline preparations-refuah. *Veterinariath*, 39, 4, 154-160.