

高效液相色谱-荧光法测定水产品中 多种四环素残留

吴海燕¹ 郭萌萌¹ 李兆新^{1*} 谭志军¹ 乔玉玲²

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²青岛亚是加食品有限公司中心实验室, 266071)

摘要 建立了鲤鱼、鳗鲡、对虾和海参中四环素、土霉素、金霉素和盐酸多西环素残留的高效液相色谱-荧光检测方法。样品用柠檬酸缓冲溶液提取, HLB 固相萃取柱净化, 以咪唑缓冲溶液-甲醇为流动相, 经 C₁₈ 反相色谱柱分离后用荧光检测器测定。土霉素、四环素、金霉素和盐酸多西环素的定量限分别为 20、20、40 和 40 μg/kg, 4 种四环素类药物残留的加标回收率均在 70.5%~100%, 批内相对标准偏差(RSD)小于 10.0%, 批间相对标准偏差(RSD)小于 15.0%。

关键词 高效液相色谱 水产品 四环素类 药物残留

中图分类号 O657.72 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)05-0102-07

Determination of tetracyclines residue in aquatic products by HPLC with fluorescence detector

WU Hai-yan¹ GUO Meng-meng¹ LI Zhao-xin^{1*}

TAN Zhi-jun¹ QIAO Yu-ling²

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²Qingdao A&K Foods CO., LTD., 266071)

ABSTRACT The residue of tetracycline antibiotics including oxytetracycline(OTC), tetracycline(TC), doxycycline(DC) and chlorotetracycline(CTC) in carps, eels, shrimps and sea cucumbers were determined with the optimized method of high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with fluorescence detection(FL). The target compounds were extracted with acidic EDTA-McIlvaine buffer solution, then enriched and cleared up using a hydrophilic-lipophilic balance(HLB) SPE cartridge, followed by separation by the C₁₈RP-HPLC column with imidazole buffer-methanol. The limit of quantification of tetracycline antibiotics in samples were 20, 20, 40, 40 μg/kg for TC, OTC, CTC and DC respectively. The average recovery for all the compounds were 70.5%~100%. The inter-variation coefficients were under 10.0%, and intra-variation coefficients were under 15.0%. The method is rapid, sensitive, accurate, reliable and can be applied in the analysis of antibiotics residues in aquatic products.

中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2012A1002)和农业部标准行业标准项目(2010)共同资助

* 通讯作者。E-mail: lizx@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836348

收稿日期: 2011-09-11; 接受日期: 2012-04-27

作者简介: 吴海燕(1985-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事水产品安全与质量控制研究。E-mail: whyhappy_1985@163.com

KEY WORDS High performance liquid chromatography(HPLC) Aquatic products
Tetracycline antibiotics Residue

四环素类(Tetracyclines, TCs)抗生素是一类碱性广谱抗生素,作为水产养殖饲料的药物添加剂,同时起到促生长和预防各种疾病的作用(Chopra *et al.* 2001),其用量约占抗生素类药物添加剂总量的57%左右(张辉 2004)。抗生素可诱导机体内产生抗药菌株,造成人体免疫功能下降,2006年欧盟全面禁止抗生素作为饲料添加剂。各国相继制定了所有肉制品中四环素类抗生素的最大残留限量(MRL)为100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Commission Regulation 508/1999/EC 1999;FAO/WHO Food Standards Codex Alimentarius 2007;Japanese Ministry of Health Welfare and Labor 2008;US Food and Drug Administration 1975;动物性食品中兽药最高残留限量 1997)。同时,也对单种四环素抗生素进行了严格的限量要求,例如对出口日本的水产品(对虾),土霉素残留要求不高于20 ng/ml 。

近些年来,高效液相色谱(HPLC)结合紫外检测器(UV)、二极管阵列检测器(PDA)、荧光检测器(FL)和质谱检测器(MS)已被广泛用于水产品中四环素类药物残留检测。我国水产品中四环素类的检测方法已渐完善,其中应用最多的是HPLC-PDA法,分别针对不同原料,如罗非鱼(黄志勇等 2005)、鱼肉(吉彩霓等 2005)、动物源性食品(杨洁等 2006)、水产品(陆梅等 2008)等,但检出限过高。已建立比较成熟的液相色谱质谱检测法,检出限可低至5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (刘正才等 2009),空白样品添加TCs类标准溶液定量下限可达2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (刘艳萍等 2009)。

具有高灵敏度、普遍适用的荧光检测器在水产品中的应用尚属空白。鉴于四环素类抗生素在我国水产品使用的广泛性以及监管相对缺乏的现状,使其在动物源性食品中的残留问题日渐突出。作者对4种四环素类药物残留分析的提取、净化和色谱条件进行了系统研究,以期建立水产品高效、高灵敏度及广泛适用的四环素类抗生素同时检测方法,进一步完善水产品中的四环素类药物残留检测方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验时间和样品来源

实验时间为2011年3~9月,样品购自山东省青岛市主要的水产品市场和大型购物超市,包括南美白对虾 *Penaeus vannamei*、刺参 *Apostichpus japonicus* (Selenka)、鳗鲡 *Anguilla japonica* 和鲤鱼 *Cyprinus carpio*,取可食部分,用高速组织捣碎机捣碎。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻保存。

1.1.2 仪器

高效液相色谱仪2695配有荧光检测器2475(美国Waters公司);Visiperp DL型固相萃取装置(美国Supelco公司);Biofuge Primo R台式离心机(Thermo Scientific公司);氮吹仪;Milli Q型超纯水仪;超声波提取仪;旋涡混合器。

1.1.3 试剂与标准品

四环素类抗生素标准品:四环素(Tetracycline, TC)、土霉素(Oxytetracycline, OTC)、金霉素(Chlortetracycline, CTC)和盐酸多西环素(Doxycycline, DC),纯度>99%,均购自德国Dr. Ehrenstorfer公司;甲醇(色谱纯)、冰乙酸、咪唑、草酸、醋酸镁、磷酸二氢钾、柠檬酸、磷酸氢二钠等均为优级纯;超纯水。

咪唑缓冲溶液:准确称取68.06 g咪唑、0.37 g乙二胺四乙酸二钠及10.27 g醋酸镁溶于800 ml水中,用冰醋酸调pH至7.2,再用水定容至1 000 ml,以微孔滤膜(0.45 μm)过滤后备用。现用现配。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:X-Bridge C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);荧光检测器:Ex=380 nm,Em=520 nm;流速:

0.8 ml/min;进样量:30 μ l;柱温:40 $^{\circ}$ C;流动相:咪唑缓冲溶液-甲醇(80+20, v/v)。

1.2.2 提取

称取 5.00 ± 0.01 g 样品置于 50 ml 离心管中,加入柠檬酸缓冲液 20 ml,充分涡旋后超声提取 10 min,6 000 r/min 离心 10 min,上清液移入另一 50 ml 离心管中,残留物用柠檬酸缓冲液 10 ml 重复提取两次,合并 3 次上清液,用滤纸过滤后,避光储存备用。

1.2.3 净化

取固相萃取小柱预先依次用甲醇 10 ml、蒸馏水 10 ml、柠檬酸缓冲液 5 ml 活化,将全部提取液上样,控制流速小于 1.5 ml/min,依次用蒸馏水 10 ml、5% 甲醇溶液 10 ml 洗涤,真空抽干或挤干,再用甲醇 10 ml 洗脱,收集洗脱液于 10 ml 玻璃离心管中。40 $^{\circ}$ C 氮吹至干,用 1.36% 磷酸二氢钾溶液 1 ml 溶解,涡旋混匀,经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后,供液相色谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱分析条件的确定

2.1.1 检测波长的确定

四环素类化合物含有苯环、酮基和烯醇组成的共轭体系,具有两个发色团,在近可见光区(350 nm 附近)具有强的紫外吸收。本研究采用荧光检测器,对土霉素、四环素、金霉素和盐酸多西环素在 190~800 nm 波长范围内进行激发-发射波长全扫描。结果发现,在激发波长 380 nm 和发射波长 520 nm 处具有较强信号,4 种物质的灵敏度均能满足测定要求,且无杂质干扰。

2.1.2 色谱柱的选择

用于分离四环素类抗生素的液相色谱柱主要是 C_{18} 和 C_8 (Gustavo Tayar Peres 2010) 两种。本研究对比了 4 种规格为 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m 的色谱柱: SunfireTM C_{18} 、Eclipse C_{18} 、X-Bridge C_{18} 和 Eclipse XDB C_8 , 对目标物分离效果、峰形和灵敏度的影响。

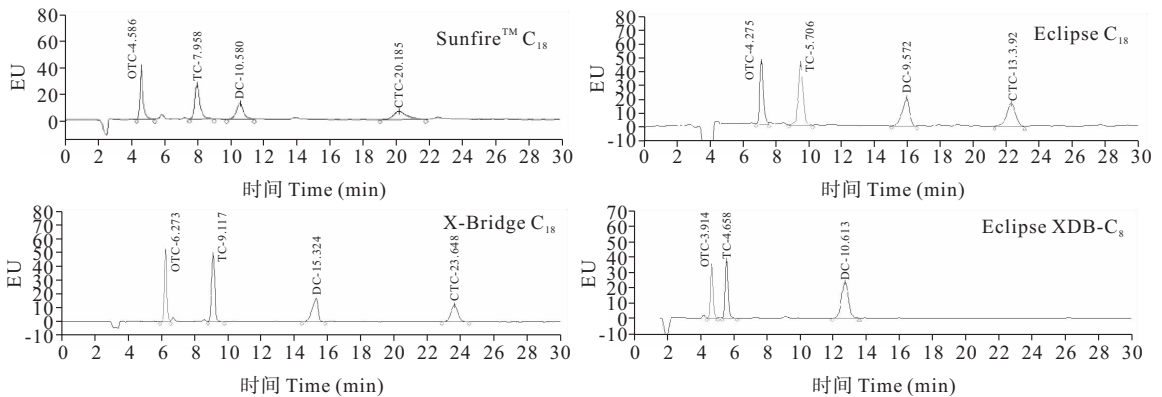


图 1 不同色谱柱对 4 种四环素类抗生素的分离色谱

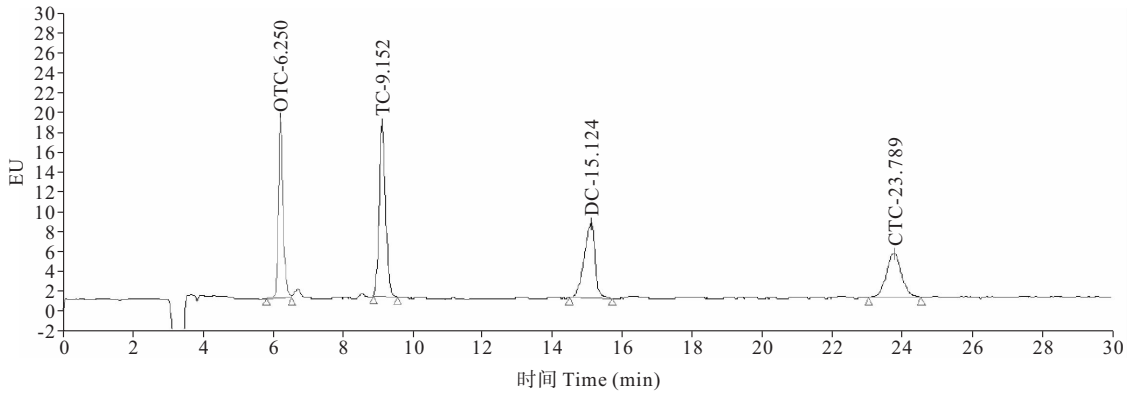
Fig. 1 Chromatogram of 4 tetracycline antibiotics separation by different columns

如图 1 所示, Sunfire C_{18} 柱虽能达到满意的分离度,但是色谱峰形差,且拖尾现象严重; C_8 柱灵敏度高,出峰时间较早,无法有效地与样品基质峰分离且盐酸多西环素出峰情况不稳定; Eclipse C_{18} 柱与 X-Bridge C_{18} 柱相比,后者土霉素峰能有效地与杂质峰分离,且目标峰的响应值更高,峰型对称性较好。最终本实验采用 X-Bridge C_{18} 作为分离色谱柱。

2.1.3 流动相的选择

四环素类药物与色谱柱上残存的硅醇基、金属离子等的吸附作用,往往会引起色谱峰拖尾,柱效下降。在流动相中加入 EDTA、琥珀酸盐、草酸等(吴永宁等 2007)具有螯合作用的弱酸性溶剂,可以抑制四环素类药物的螯合和吸附。分别用乙腈-甲醇-0.01 mol/L 草酸溶液、甲醇-EDTA-咪唑缓冲液、乙腈-0.01 mol/L 柠檬

酸(刘 丽等 2007)溶液进行实验。实验结果表明,3 种流动相均可满足分离度要求,其中甲醇-咪唑缓冲液(pH 7.2)能达到基线分离且有效地排除了杂质峰的干扰,灵敏度高,峰型最好,因此采用甲醇-咪唑缓冲液作为流动相。图 2 所示为四环素类药物混合标准溶液色谱。



土霉素、四环素、金霉素、盐酸多西环素分别为 100、100、200、200 $\mu\text{g/ml}$

OTC,TC,DC and CTC is 100、100、200 and 200 $\mu\text{g/ml}$

图 2 4 种四环素类药物混合标准溶液色谱

Fig. 2 Chromatogram of 4 tetracycline antibiotics standards mixture

2.2 前处理方法的研究

2.2.1 提取溶剂的选择

四环素类抗生素是两性化合物,分子中存在酚羟基和烯醇型羟基(吴永宁等 2007),显弱酸性。生物制品中的四环素类药物易与金属离子形成螯合物,与组织中的蛋白强烈结合,需用含螯合剂的弱酸性脱蛋白剂进行提取。本研究比较了不同溶液对鲤鱼、对虾、海参和鳗鲡 4 种基质的加标回收率,结果见表 1。实验表明,a 提取溶液存在基质干扰;b、c 和 d 3 种柠檬酸缓冲溶液中,提取溶液回收率最高,因此选用柠檬酸-EDTA 缓冲溶液作为提取溶液。

表 1 提取溶剂对 4 种四环素类抗生素回收率的影响

Table 1 Effect of extract solution on recovery of four tetracycline antibiotics

原料 Raw materials	提取溶液 Extracting solution	检测方法 Detection method	检出限 Detection limit	回收率(%) Recovery	参考文献 References
肉及水产品 Meat and Aquatic products	5%高氯酸溶液 ^a	高效液相色谱-荧光 检测器,柱后衍生	1.20~2.32 ng/ml	64.63~90.89	许传梅等 2007
鳗鱼 Korean eel	酸性 EDTA- Mcllvaine 缓冲液 ^b	超高效液相色谱- 串联质谱	0.5~5.0 $\mu\text{g/kg}$	72.4~97.3	刘正才等 2009
水产品 Aquatic products	柠檬酸缓冲液 ^c	高效液相色谱- 荧光检测器	10~30 $\mu\text{g/kg}$	70~120	GB/T 21317-2007
动物源食品 Animal derived food	Na ₂ EDTA-Mcllvaine 缓冲溶液 ^d	液相色谱串联质谱/ 液相色谱紫外检测器	50.0 $\mu\text{g/kg}$	70~110	DB33/T 691-2008

注:b:称取 11.8 g 柠檬酸水合物,13.72 g 磷酸氢二钠二水合物,33.62 g EDTA-2Na 溶解于 1 L 水中,溶解摇匀后用氢氧化钠或盐酸调节 pH 值至 4.5

c:准确称取柠檬酸 21.0 g,用水溶解稀释至 1 L,此为 A 溶液。准确称取磷酸氢二钠 71.6 g,用水溶解稀释至 1 000 ml,此为 B 溶液。准确称取 EDTA-2Na 1.86 g,用 307 ml A 液和 193 ml B 液溶解混匀,调节 pH 至 4.0

d:21.01 g 柠檬酸,用水溶解定容至 1 L;28.41 g 磷酸氢二钠,用水溶解,定容至 1 L;取 1 L 上述柠檬酸溶液中加入 625 ml 磷酸氢二钠溶液,用氢氧化钠或盐酸调节 pH 至 4.0,加入 60.5 g EDTA-2Na 溶解后,摇匀

2.2.2 提取方法的选择

在空白对虾样品中添加混合标准溶液(其中土霉素、四环素含量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,金霉素、盐酸多西环素含量为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$),采用表 2 中所示 3 种提取方式,以提取溶液 40 ml 为总量,分别提取 1、2、3 次,以比较提取率的差异。对 3 组实验数据采用单因素方差分析, P 值为 $0.000\ 679 < 0.01$,存在极显著性差异。3 组实验平均回收率分别为 58.6%、73.9%和 93.1%,其中组 3 中,3 次提取分别添加 20、10、10 ml 提取液,所得回收率最高,且数据稳定,因此最终确定提取液提取 3 次的方法。

表 2 提取次数对 4 种四环素类抗生素回收率的影响

Table 2 Effect of extraction times on recovery of four tetracycline antibiotics

实验组别 Group	提取方式 Extraction method	回收率 Recovery(%)			平均回收率(%) Average recovery
		1	2	3	
1	40 ml 提取液提取 1 次	58.70	56.80	60.21	58.6
2	20 ml 提取液提取两次	78.15	70.12	73.35	73.9
3	20、10、10 ml 提取液提取 3 次	91.22	92.65	95.48	93.1

2.2.3 净化条件的选择

四环素类抗生素的提取液净化多采用固相萃取的净化方式,已有文献报道多用 C_{18} (王 覃等 2006;Zhu *et al.* 2001;刘艳华等 2006)和 HLB(王立君等 2006;刘艳萍等 2009)两种类型的固相萃取柱。研究对比了 Sep-pak C_{18} 固相萃取柱(500 mg,3 ml)和两种规格的 Oasis HLB 固相萃取柱(60 mg,3 ml 和 500 mg,6 ml),用 40 ml 提取液稀释加标溶液后(四环素和土霉素为 0.5 μg ,金霉素和盐酸多西环素为 1.0 μg)的回收率,结果见表 3。结果表明,3 种固相萃取柱对目标物的回收率有显著差别,其中 HLB(500 mg,6 ml)的回收率最高,达 90%以上。最终,采用 500 mg HLB 柱作为净化用固相萃取柱。

表 3 固相萃取柱对 4 种四环素类抗生素回收率的影响

Table 3 Effect of solid phase extraction (SPE) on recovery of four tetracycline antibiotics

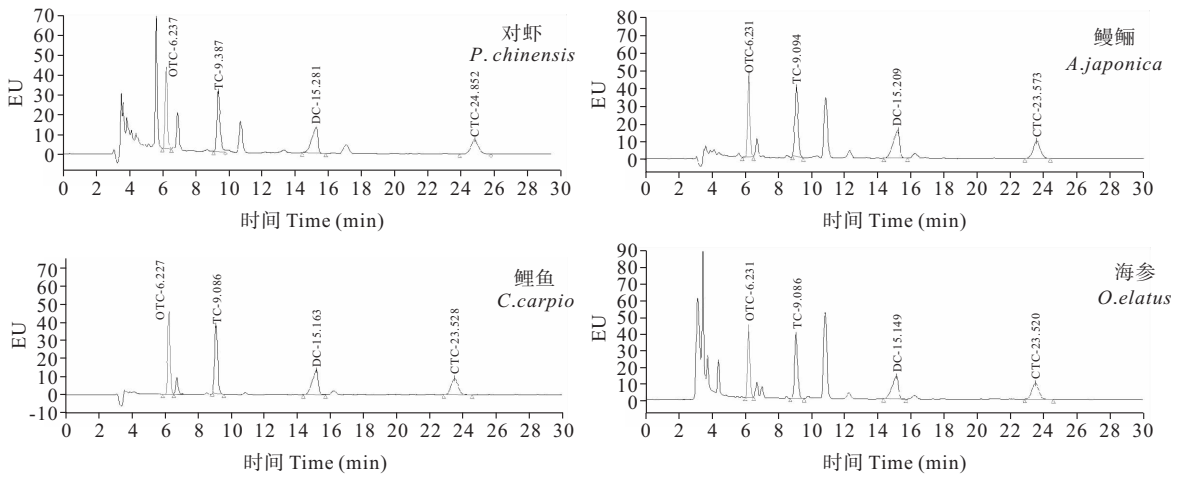
固相萃取柱 Solid phase extraction column	C_{18}	HLB
规格 Specification	500 mg,3 ml	60 mg,3 ml 500 mg,6 ml
回收率 Recovery(%)	67.5	75.8 95.0

2.2.4 定容溶液的选择

考察了磷酸二氢钾和柠檬酸缓冲液两种定容溶液对四环素类药物稳定性的影响。经试验证实使用磷酸二氢钾溶液定容提取物所得谱图基线平,对测定物质无干扰且稳定性好。

2.3 方法回收率和精密度

分别选用阴性的鲤鱼、对虾、海参、鳗鲡进行加标回收和精密度实验,考察方法的准确度和重现性。图 3 为不同样品基质加标色谱图。在 5.00 g 样品中进行基质加标,分别设立 3 个浓度水平的加标回收试验,每个浓度水平做 6 个平行样品,测定 3 个批次。如表 4 所列实验结果,平均回收率在 72.6%~90.9%,批内相对标准偏差 $\leq 9.91\%$,批间相对标准偏差 $\leq 14.4\%$ 。最终确定该方法的土霉素、四环素、金霉素和盐酸多西环素的定量限分别为 20、20、40 和 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$,加标回收率均为 70.5%~100%,批内相对标准偏差(RSD)小于 10.0%,批间相对标准偏差(RSD)小于 15.0%。



土霉素、四环素、金霉素、盐酸多西环素分别为 100、100、200、200 $\mu\text{g/ml}$

OTC, TC, DC, CTC is 100, 100, 200 and 200 $\mu\text{g/ml}$

图 3 不同样品基质加标 4 种四环素类抗生素色谱

Fig. 3 Chromatogram of 4 tetracycline antibiotics spiked aquatic products

表 4 不同样品基质中 4 种四环素类抗生素的回收率与变异系数 ($n=18$)

Table 4 Recovery and relative standard deviations (RSD) of four tetracycline antibiotics in different samples ($n=18$)

化合物 Chemical compound	标准添加量 Standard addition ($\mu\text{g/kg}$)	鳗鲡 <i>A. japonica</i>		海参 <i>O. elatus</i>		对虾 <i>P. chinensis</i>		鲤鱼 <i>C. carpio</i>	
		平均回收率 Average recovery rate (%)	批间变异系数 RSD Interassay coefficient of variation (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	批间变异系数 RSD Interassay coefficient of variation (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	批间变异系数 RSD Interassay coefficient of variation (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	批间变异系数 RSD Interassay coefficient of variation (%)
土霉素 Oxytetracycline	20	83.1	10.6	86.7	9.17	89.6	11.6	90.9	10.0
	50	82.3	12.0	78.3	14.0	78.2	9.07	83.2	8.89
	100	79.9	7.30	77.3	8.40	81.8	6.97	82.9	8.85
四环素 Tetracycline	20	82.7	10.1	73.6	8.55	81.7	7.26	85.5	8.43
	50	73.1	7.80	73.8	7.08	79.7	13.0	72.8	8.24
	100	73.6	4.77	79.2	7.37	85.2	14.4	75.9	6.38
金霉素 Chlorotetracycline	40	79.5	9.19	79.8	9.44	89.3	9.37	80.6	9.89
	100	82.0	8.65	79.1	7.94	78.7	7.73	74.0	6.32
	200	78.8	6.60	80.3	7.65	76.0	8.73	76.7	8.65
盐酸多西环素 Doxycycline	40	81.3	11.1	82.7	8.69	76.2	9.65	81.4	8.40
	100	74.0	5.06	74.4	6.50	73.6	7.91	72.6	5.01
	200	73.2	7.59	78.3	8.58	74.2	10.3	77.5	7.52

2.4 实际样品分析

应用本方法对 20 个市售的鳗鲡、海参和对虾等水产品进行了抽检,其中两个对虾样品分别检出土霉素和盐酸多西环素,含量分别为 $14.6 \pm 0.7, 35.2 \pm 1.3 \mu\text{g/kg}$ ($n=3$),两个样品中四环素类抗生素均未超标,其他 18 个样品均未检出四环素类抗生素。本方法可用于水产品中四环素类抗生素多残留的同时检测。

3 结论

本研究建立了同时检测水产品中土霉素、四环素、金霉素和盐酸多西环素的高效液相色谱-荧光检测法,采用HLB固相萃取柱建立了有效的样品提取、净化方法,以甲醇和咪唑溶液为流动相,等度洗脱,使4种四环素类抗生素得到很好的分离。分别对软体类(海参)、甲壳类(对虾)、低脂鱼类(鲤鱼)和多脂鱼类(鳗鲡)4种代表性水产品进行了方法验证试验,1个工作日内可处理40个样品,方法操作简易,灵敏度高、线性范围宽、重现性好,适用于水产品中四环素类抗生素残留的检测。

参 考 文 献

- DB 33/T 691-2008. 2008. 水产品中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素残留量的测定高效液相色谱荧光检测法. 浙江省质量技术监督局
- GB/T 21317-2007. 2007. 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法. 北京:中国标准出版社
- 王立君,赵健,杨挺. 2006. 固相萃取-高效液相色谱法测定猪肉中四环素类药物的残留. 动物科学, 11:120~121
- 王覃,陈大舟,汤桦,李蕾. 2006. 高效液相色谱法同时测定水产品中四种抗生素的分析方法. 北京化工大学学报, 33(5):90~93
- 刘丽,蔡志斌,张英. 2007. 高效液相色谱法测定水产品中土霉素、四环素、金霉素. 中国卫生检验杂志, 17(8):1405~1406
- 刘艳华,张纯萍,门立强,刘智宏,王树槐. 2006. 液相色谱-串联质谱法测定鸡肌肉组织中的四环素类药物残留. 色谱, 24(2):171~173
- 刘正才,杨方,余孔捷,李耀平,林永辉,张琼,刘素珍. 2009. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测鳗鱼中磺胺类、喹诺酮类、四环素族抗生素药物残留. 食品科学, 30(14):167~170
- 刘艳萍,冷凯良,王清印,王志杰,孙伟红,王瑜,邢丽红. 2009. 高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中的4种四环素类药物残留量. 海洋科学, 33(4):34~39
- 吉彩霓,岳振峰,谢丽琪,郑卫平,陈佩金. 2005. 高效液相色谱法同时检测水产品中7种四环素类抗生素残留的研究. 中国兽医科技, 35(10):820~826
- 许传梅,星玉秀,董琦,皮立,肖远灿,胡风祖. 2007. 肉类及水产品中四环素类抗生素残留量的高效液相色谱测定方法. 分析试验室, 26(S1):258~260
- 农业部第235号公告. 1997. 动物性食品中兽药最高残留限量. 北京:中国标准出版社
- 陆梅,高翔,李淑文. 2008. 高效液相色谱法测定水产品中四环素类抗生素残留. 环境监测管理与技术, 20(5):38~39
- 吴永宁,绍斌,沈健忠. 2007. 兽药残留检测与监控技术. 北京:化学工业出版社, 115~127
- 张辉. 2004. 高效液相色谱法测定肉类食品中四环素类抗生素残留. 理化检验(化学分册), (10):23
- 杨洁,夏虹,蒙缔亚. 2006. 高效液相色谱法同时测定动物源性食品中5种磺胺及3种四环素族抗生素残留. 分析测试技术与仪器, 12(3):151~154
- 黄志勇,蔡洪基,黄高凌,彭爱红. 2005. 水产品中四环素类抗生素残留量的高效液相色谱测定方法. 福建分析测试, 14(1):2093~2095, 2015
- Chopra, L. and Roperts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 6:232~260
- Commission Regulation 508/1999/EC. 1999. Amending Annexes I IV to Council Regulation(EEC)No 2377/90 laying down Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official Journal of European Communities(Available at:<<http://europa.eu.int>>)
- Department of Health and Human Services, Subchapter E Animal drugs, feed and related products. Part556. Tolerances for residues of new animal drugs in food(Available at:<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.0063fmCFRPart=556>>)
- FAO/WHO Food Standards Codex Alimentarius. 2007. Veterinary drug residues in food. Maximum residue limits. (Available at:<http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd_q-e.jsp>)
- Gustavo, T. P., Susanne, R., and Felix, G. R. 2010. A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. Food Control, (21):620~625
- Japanese Ministry of Health Welfare and Labor. 2008. Food safety information. (Available at:<<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food-safety/index.html><EnglishVersion>>)
- US Food and Drug Administration. 1975. Titled 21 Food and drugs. Chapter I Food and Drugs Administration
- Zhu, J., Snow, D. D., Cassada, D. A., Monson, S. J., and Spalding, R. F. 2001. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 928(2):177~186