

Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 90 (1999)
Heft: 2

Artikel: Bestimmung von Rückständen von Tetracyclinen in Lebensmitteln
Autor: Kaufmann, Anton / Pacciarelli, Bruno / Prijic, Alexandra
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-981779>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 12.05.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Bestimmung von Rückständen von Tetracyclinen in Lebensmitteln

Anton Kaufmann, Bruno Pacciarelli, Alexandra Prijic, Bianca Ryser, Sven Roth, Kantonales Laboratorium Zürich

Eingegangen 9. November 1998, angenommen 9. Februar 1999

Einleitung

Tetracyclin (Aureomycin) wurde erstmals aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces aureofaciens* isoliert. Tetracyclin sowie diverse daraus abgeleitete Verbindungen sind heute durch Vollsynthesen zugänglich. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums dieser Antibiotika werden Tetracycline in der Humanmedizin gegen eine Vielzahl von Infektionskrankheiten eingesetzt. In der Veterinärmedizin und der Tierernährung gelangen insbesondere Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin zum Einsatz. In subtherapeutischen Dosen (nutritiven Dosen) angewendet, resultiert ein stärkerer Fleischansatz bei Masttieren.

Die Rückstandsanalytik von Tetracyclinen erfolgt primär mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Die ausgeprägten Komplexbildungseigenschaften von Tetracyclinen mit Kationen (Fe, Mg usw.) stellen ein Hauptproblem bei der Extraktion, Aufarbeitung und LC-Elution dar. Erst mit dem Einsatz von Komplexbildnern (Oxalsäure, EDTA usw.) wurden tiefere Nachweisgrenzen und eine reproduzierbare Analytik Realität. Basierend auf dem basischen Charakter der Tetracycline wurden saure/alkalische flüssig/flüssig Extraktionen (1, 2) vorgeschlagen. Festphasenextraktion mit XAD-Materialien (3), Umkehrphasen C-18 (4–8) oder COOH-Kationenaustauscher (5, 9) wurden von verschiedenen Autoren eingesetzt. Die spezifische Eigenschaft von Tetracyclinen, Chelat-Komplexe mit verschiedenen Metallen zu bilden, kann zur sehr selektiven Aufarbeitung genutzt werden. In mehreren Arbeiten werden mit Kupfer beladene Sepharosesäulen verwendet (3, 7, 10). Zur Erhöhung der Selektivität werden oft zwei verschiedene Aufarbeitungstechniken gekoppelt, um eine orthogonale Selektivität zu erreichen. Insbesondere die Kombination C-18 und Sepharose produziert sehr reine Extrakte (4, 7). Die

Verwendung einer Sepharosesäule ist mit dem Nachteil eines stark limitierten Probendurchsatzes und nicht unerheblichen Verbrauchsmaterialkosten verbunden. Daher wurde versucht, diese Nachteile durch eine on-line Aufarbeitung zu eliminieren (11, 12). Die HPLC-Trennung erfolgt im Normalfall mittels RP C-18. Eine Nachsäulenderivatisierung mit Magnesium- oder Calciumionen und Fluoreszenzdetektion (6, 9) erhöht die Selektivität und die Empfindlichkeit. Die Nachsäulenderivatisierung kann man durch direkte Zugabe des Kations zusammen mit EDTA zur mobilen Phase umgehen (6). Der für die Chelatkomplexbildung notwendige pH sollte $> 3,0$ sein (13). Eine alternative Selektivität kann durch Ionenpaarchromatographie erreicht werden (1, 2). Sehr vielversprechend ist die LC-MS-Technik. Damit lassen sich auch nichtchromophore Metaboliten wie 4-epi-iso-Chlortetracyclin und iso-Chlortetracyclin erfassen. Diese Substanzen sind als Hauptmetaboliten von Chlortetracyclin in Hühnereiern bekannt (14).

Es ist das Ziel dieser Arbeit, eine einfache, robuste Routine-HPLC-Analytik vorzustellen. Das Kernelement der Methodik stellt die Verwendung eines polymeren Solid Phase Extraction Materials (SPE) dar, welches das Problem der ungenügend reproduzierbaren Wiederfindungen löst.

Experimenteller Teil

Geräte

- Zentrifuge
- Pumpe: Gynkotek M 480
- UV-Detektor: Gynkotek DAD
- Fluoreszenz-Detektor: Gynkotek RF 1002
- Probengeber: Gynkotek GINA
- Derivatisierungsreagenzpumpe: Gynkotek 300
- Mischung «T» mit Reaktionsschleife (Teflon 25 cm)
- SPE-Absaugvorrichtung
- Membranfilter: Chromafil PES-20/25 Macherey-Nagel

Reagenzien, Materialien

- SPE: Oasis TM 200 mg Waters 106202
- Tetracycline hydrochlorid, Chlortetracycline hydrochlorid, Oxytetracycline hydrochlorid (Sigma)
- Bernsteinsäure p.a., Oxalsäure wasserfrei p.a., 1-Decansulfonsäure-Natrium-salz (Fluka)
- Borsäure z.A., Natriumhydroxid z.A., Magnesiumacetat-Tetrahydrat z.A. (Merck)
- Acetonitril HPLC, Methanol HPLC (Mächler)
- Wasser bidest.

Lösungen

- Extraktionslösung (Succinatpuffer pH 4,0)
5,9 g Bernsteinsäure in 1000 ml Wasser lösen und mit 1 mol/l NaOH auf pH 4,0 einstellen.
- Oxalsäurepuffer
Oxalsäure 0,01 mol/l mit Natronlauge 1 mol/l auf pH 2,25–2,5 einstellen
- Elutionslösung
Oxalsäurepuffer / Acetonitril (30 / 8) v/v
- Mobile Phase A
1,22 g 1-Decansulfonsäure-Natriumsalz gelöst in einem Liter Oxalsäurepuffer
- Mobile Phase B
1,22 g 1-Decansulfonsäure-Natriumsalz gelöst in einem Liter (Oxalsäurepuffer / Acetonitril / Methanol) (2 / 1 / 1) v/v
- Derivatisierungsreagenz
12,5 g Borsäure, 6 g Magnesiumacetat in einem Liter Wasser. Mit fester NaOH auf pH 9 einstellen.
- Stammlösungen
- Tetracyclin: 21,6 mg Tetracyclin x HCl in 100 ml Methanol
- Chlortetracyclin: 22,2 mg Chlortetracyclin x HCl in 100 ml Methanol
- Oxytetracyclin: 21,6 mg Oxytetracyclin x HCl in 100 ml Methanol

Stabilität: 3 Monate

- Bezugslösung

Je 1 ml der Stammlösungen von Tetracyclin, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin in einen 100-ml-Messkolben geben und mit Elutionslösung zur Marke auffüllen.

Stabilität: 1 Woche

Extraktion

- 10 g der gewürfelten Fleischprobe mit 50 ml Extraktionslösung versetzen. (evtl. Zusatz von 1,00 ml der Bezugslösung; entspricht 200 µg/kg)
- Mit Polytron ca. 1 min lang homogenisieren und Homogenisator mit wenig Wasser abspülen
- 5 min bei 14 500 rpm zentrifugieren
- Überstand durch wenig Medizinalwatte filtrieren

Extraktreinigung

- SPE-Kartusche mit 3 ml Acetonitril aktivieren
- SPE-Kartusche mit 3 ml Wasser spülen
- Filtrat (ca. 50 ml) in 12–15 min durch Kartusche saugen
- Kartusche mit 3 ml Wasser spülen und 1–2 min trockensaugen
- 4 ml Elutionslösung auf Kartusche geben und Eluat in einem tarierten Reagenzglas auffangen

- Reagenzglas mit Eluat zurückwägen
- Eluat mittels Membranfilter filtrieren und direkt in HPLC einspritzen.

Analyse

- Säule: Hypersil BDS C-18, 3 μ m, 100 · 4 mm z. B. HP Nr. 79926
- Vorsäule: Hypersil ODS 5 mm, 4 · 4 mm z. B. HP Nr. 7992618-508
- UV: 356 nm
- Fluoresz.: Anregung: 385 nm. Emission: 500 nm
- Laufmittel: A und B
- Fluss: 1 ml/min
- Einspritzvolumen: 50 μ l
- Säulentemperatur: 35 °C
- Derivatisierungsreagenz: 0,3 ml/min
- Detektoranordnung: UV-Nachsäulenderivatisierungseinheit-Fluoreszenz
- Gradient:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0,0	68	32
0,1	68	32
12,5	0	100
17,5	0	100
20,0	68	32
25,0	68	32
- Retentionszeiten:

Oxytetracyclin ca.:	13,9 min
Tetracyclin ca.:	14,2 min
Chlortetracyclin ca.:	16,5 min

Abbildung 1 zeigt ein Chromatogramm einer Blind- und einer aufgestockten Probe von Kalbsherz. Abbildung 2 zeigt analoge Chromatogramme einer Schweineniere.

Diskussion und Validierung

Problematik der Tetracyclinanalytik

Ein Hauptproblem beim Einsatz der Festphasenextraktion (SPE) in der Tierarzneimittelanalytik sind die unbefriedigenden und schlecht reproduzierbaren Wiederfindungsraten (3, 4, 8). Das zugrundeliegende Problem stellt offensichtlich die ungenügende Chargenreproduzierbarkeit der SPE-Materialien dar (11). Viele Labors sind deshalb dazu übergegangen, ein bestimmtes Lot Kartuschen zu testen und im Eignungsfall einen grösseren Vorrat desselben anzulegen. Gründe für dieses chargenspezifische Verhalten stellen Restsilanolaktivitäten des Silikatgrundgerüsts und verbleibende Metallverunreinigungen dar. Es existieren Ansätze, die SPE-

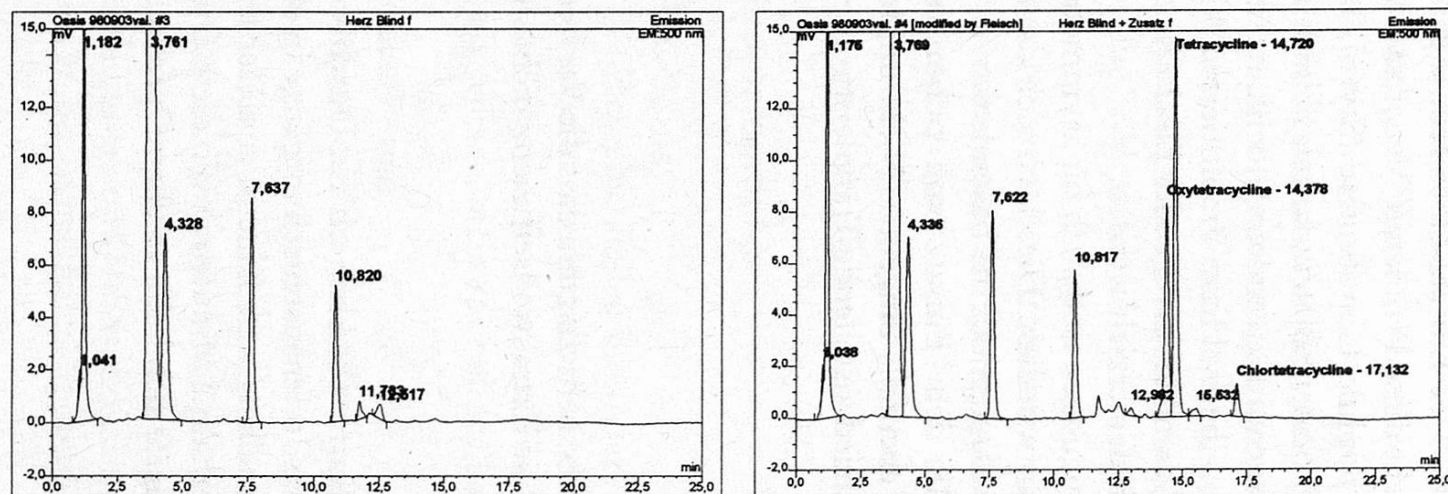


Abbildung 1 Kalbsherz-Blindprobe sowie aufgestockt mit je 200 ppb Tetracyclinen

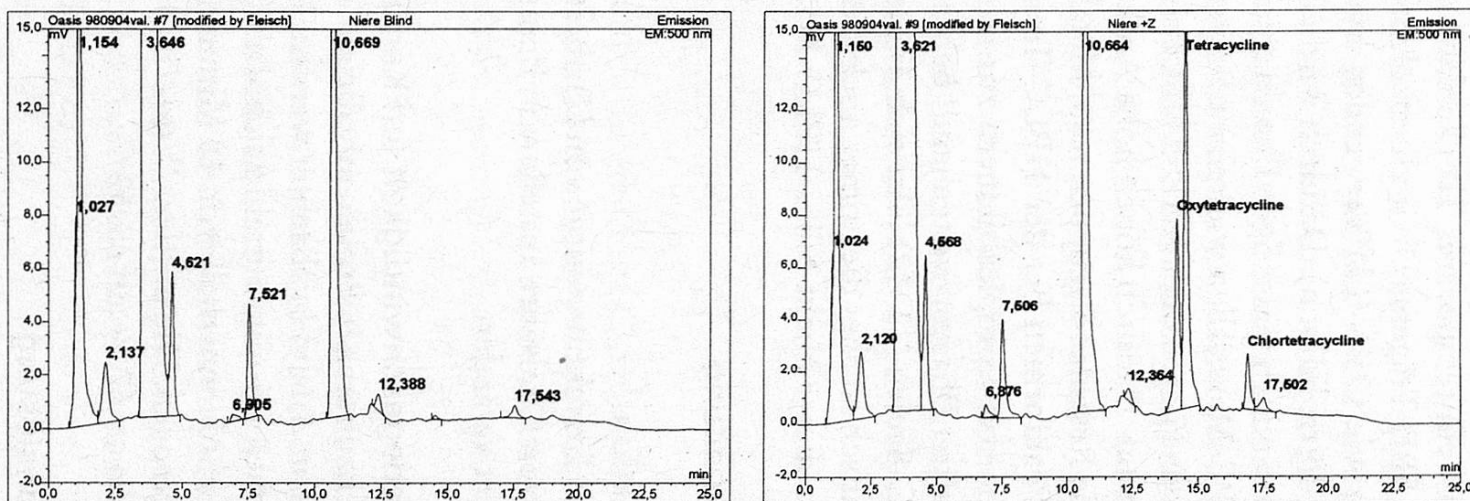


Abbildung 2 Schweineniere-Blindprobe sowie aufgestockt mit je 200 ppb Tetracyclinen

Kartusche vor Gebrauch zu silylieren, um so Restsilanolgruppen zu deaktivieren (15). Es ist aber fraglich, ob so auch sterisch gehinderte Silanolgruppen zugänglich sind. Klassische C-18-Materialien haben zudem die Tendenz, unter der Einwirkung von stark wasserhaltigen Phasen zu kollabieren. Dies kann die Austauschkinetik der Analyten stark beeinflussen. Zudem reagieren solche Materialien sehr empfindlich auf ein temporäres Trockenlaufen des Bettes. Der Einsatz eines rein organischen SPE-Trägers (Divinylbenzol, Styrol) umgeht diese Probleme. Neuere Materialien wie Oasis TM verwenden hydrophile-lipophile Copolymere (Styrol, N-Vinyl-Pyrrolidinon). Dadurch wird eine deutlich bessere Benetzbarkeit beim Einsatz von reinen wässrigen Phasen erreicht. Im Gegensatz zu anderen hochkapazitiven SPE-Materialien wie reinen Polystyrol-Divinylbenzol bzw. graphitierten Aktivkohle-Phasen oder XAD-2 (16) weist Oasis TM ein hervorragendes Elutionsverhalten auf. Dadurch können hohe Aufkonzentrationen erzielt werden.

Die Restsilanolgruppen resp. Metallverunreinigungen sind auch für asymmetrische Peakformen bei der HPLC-Trennung verantwortlich. Dies lässt sich durch Zugabe von Komplexbildnern zur mobilen Phase und moderne basendeaktivierte stationäre Phasen weitgehend beherrschen. Mit dem Einsatz von polymeren HPLC-Säulen (11, 12) lässt sich dieses Problem ebenfalls umgehen. Nicht unproblematisch ist aber die immer noch nicht ganz zufriedenstellende Trennleistungseffizienz dieser Nicht-Silica-HPLC-Materialien.

Aufarbeitung

Extraktion

Die Extraktion wurde von (7) übernommen. Versuche zeigten, dass die Verwendung von Oxalsäure anstelle von Bernsteinsäure die Extraktionseffizienz nicht signifikant verändert.

Aufgabegeschwindigkeit auf Kartusche

Bei zu rascher Probenaufgabe auf eine SPE-Kartusche kann oft ein Durchbrechen von Analyt beobachtet werden. Insbesondere Ionenaustauschvorgänge in organischen Lösungsmitteln zeichnen sich durch eine langsame Kinetik aus. Der Extrakt wurde innerhalb von 18 Minuten bzw. innerhalb 2 Minuten durch die Kartusche gesogen. Die mittlere Wiederfindung reduzierte sich beim raschen Durchsaugen von ca. 67 % auf ca. 52 %.

Elutionslösung

Eine beladene Kartusche wurde zweimal mit je 3 ml Elutionslösung eluiert. Beim vorgeschlagenen Elutionsmittel konnten im zweiten Eluat keine Tetracycline mehr nachgewiesen werden. Citronensäure in Wasser bzw. wässrige Acetonitrillösung zeigten hingegen Analyt-Peaks im zweiten Eluat. Tetracycline sind in saurer wässriger Lösung stabiler als im neutralen Medium (17). Aus diesem Grund wurde

auch die Bezugslösung mit Oxalsäure versetzt. Die kontinuierliche Flächenabnahme der Tetracyclinpeakflächen wurde beim Einsatz von angesäuerten Bezugslösungen nicht mehr beobachtet.

Trockenlaufenlassen der Kartusche

Das Trockenlaufenlassen von SPE-Kartuschen ist oft verantwortlich für schwankende Wiederfindungsraten. Das Verhindern dieses Vorganges verlangt deshalb grosse Aufmerksamkeit bei der Aufarbeitung. Dies stellt jedoch besonders bei grossen Serien ein Problem dar. Die verwendeten Oasis-Kartuschen wurden nach der Probenaufgabe mehrere Minuten lang trockengesaugt und danach eluiert. Einen Einfluss auf die Wiederfindungsraten der Analyten konnte nicht beobachtet werden. Diese stabilen Wiederfindungen sind wahrscheinlich durch das lipophile/hydrophile Trägermaterial der Oasis-Kartuschen zu erklären.

Chargenreproduzierbarkeit

Vier verschiedene Chargen des Oasis-Materials wurden auf Wiederfindungsraten getestet. Es konnten keine relevanten Abweichungen zwischen den Chargen festgestellt werden. Zu bemerken ist, dass ein getestetes Lot als angebrochene Packung über ein Jahr beim Lieferanten gelagert wurde.

Chromatographie

HPLC-Säule

Tetracycline stellen besondere Anforderungen an eine HPLC-Säule. Restsilanolgruppen sowie Metallverunreinigungen führen zu Tailing resp. zu Verlusten am Analyt. Die vorgeschlagene C-18-Säule produziert deutlich symmetrischere Peaks als allgemeine, nicht speziell für basische Analyten optimierte Trennsäulen.

Mobile Phase

Ohne den Zusatz des Ionenpaarbildners Decansulfonsäure eluieren die Analyten zu nahe bei störenden Matrixpeaks. Eine sichere Quantifizierung ist dann nur beschränkt möglich. Die Zugabe des Ionenpaarbildners vergrössert die k' -Werte deutlich. Im Fall von Muskelgewebe (Herz) gelangen die Analyten in eine von Matrixpeaks gänzlich unbelastete Region. Bei Leber, Niere und Honig wurde trotz der Verwendung von Decansulfonsäure Störpeaks beobachtet, die einen Tetracyclinegehalt von bis zu maximal 20 ppb vortäuschen können.

Nachsäulenderivatisierung

Die Nachsäulenderivatisierung mit Magnesiumacetat (9) erlaubt sowohl einen Selektivitäts- als auch Empfindlichkeitsgewinn. Ein direkter Zusatz von Magnesiumacetat zur mobilen Phase (6) ist problematisch. Tetracycline bilden im stark sauren pH-Bereich keine Komplexe mit Metallen. Ein tiefer pH ist aber notwendig, um

symmetrische Peaks zu eluieren. Zudem nimmt die Stabilität von Tetracyclinen im neutralen/alkalischen Bereich stark ab (17).

Linearität

Die Linearität wurde über den Bereich von 20–1000 ppb in Herzmuskeln (Kalb) geprüft. Der Regressionskoeffizient r liegt für Oxytetracyclin und Tetracyclin bei 0,9987 und 0,9981. Für Chlortetracyclin resultierte ein noch zufriedenstellender Wert von 0,9967. Die Werte sind nicht signifikant verschieden von 1.

Die Nachweisgrenze von Oxytetracyclin und Tetracyclin liegt bei 2 ppb. Chlortetracyclin ist ab 5 ppb nachweisbar. Alle Angaben betreffend der Linearität und Nachweisgrenze beziehen sich auf die Matrix Herzmuskel.

Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Die mittlere Wiederfindung der drei geprüften Analyten liegt bei 75 % (siehe Tabelle 1). Ein signifikanter Einfluss der Aufstockmenge auf die Wiederfindung ist nicht zu beobachten. Der Variationskoeffizient (VK) der Wiederfindungen ist für Oxytetracyclin und Tetracyclin als gut zu bezeichnen. Bei Chlortetracyclin ist eine etwas schlechtere Reproduzierbarkeit zu beobachten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1

Wiederfindung und Variationskoeffizient (VK) der Wiederfindungen ($n = 4$) in Kalbsherz

Analyt	Aufstockung (ppb)	mittlere Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (VK) $n = 4$ (%)
Oxytetracyclin	0		
Tetracyclin	0		
Chlortetracyclin	0		
Oxytetracyclin	20	74	3,5
Tetracyclin	20	69	3,8
Chlortetracyclin	20	86	16,6
Oxytetracyclin	100	75	2
Tetracyclin	100	66	2,7
Chlortetracyclin	100	58	5,2
Oxytetracyclin	200	72	4,4
Tetracyclin	200	66	6,2
Chlortetracyclin	200	54	17
Oxytetracyclin	500	74	6,2
Tetracyclin	500	65	7,7
Chlortetracyclin	500	53	14,3
Oxytetracyclin	1000	72	5,1
Tetracyclin	1000	65	6,3
Chlortetracyclin	1000	56	10,4

Die Ansäuerung der Bezugslösung verbesserte die Stabilität der Standards deutlich. Hingegen wurde kein negativer Einfluss des Sonnenlichtes auf die Analytik beobachtet. Alle Analysen wurden in normalen Glasgefäßen durchgeführt.

Die Methode erwies sich als sehr robust. Auch Anwender, welche die Methodik zum erstenmal einsetzten, erreichten auf Anhieb gute Wiederfindungen. Die Methode zeichnet sich neben der Robustheit durch eine sehr einfache Probenaufarbeitung aus. Arbeitsintensive Schritte wie Ausschütteln und Einengen entfallen gänzlich und ermöglichen so eine effiziente Arbeitsweise und einen hohen Probenumsatz. Die vollständige Validierung basierte auf der Matrix Herz. Wiederfindungen in der gleichen Größenordnung wurden bei Niere und Leber (Schweine und Rinder) sowie bei Milch und Eiern gefunden. Honig zeigte mittlere Wiederfindungen von 90 %, wobei im Gegensatz zu Fleischproben starke Matrixunterschiede beobachtet wurden.

Zusammenfassung

Eine einfache, robuste aber trotzdem empfindliche HPLC-Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen in Fleisch wird beschrieben. Der Einsatz eines polymeren Festphasenextraktionsmaterials (SPE) ermöglicht hohe Wiederfindungen. Viele SPE-Methoden ergeben in der Tierarzneimittelanalytik schlechte Reproduzierbarkeiten. Der Grund liegt meistens bei der schlechten Chargenreproduzierbarkeit der SPE-Materialien. Bei der vorliegenden Methode konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist.

Résumé

Une méthode HPLC simple, robuste et sensible est présentée pour l'analyse de douze tetracyclines dans le tissu animal. L'utilisation d'un polymère matériaux pour l'extraction en phase solide (SPE) a permis d'obtenir un bon taux de reproductivité. Beaucoup de méthodes SPE dans le domaine des résidus de médicaments vétérinaires posent des problèmes de reproductibilité en raison de la différence entre les lots de matériel d'extraction. La méthode proposée utilise un matériel SPE entre les lots de matériel d'extraction qui ne provoque pas ce genre de problème.

Summary «Determination of Tetracyclines Residues in Food»

A simple, robust, yet sensitive HPLC method for the determination of tetracyclines in meat is proposed and validated. The use of a polymeric solid phase extraction material (SPE) permits high recovery rates. Many SPE drug residue methods are difficult to reproduce. The main reason is mostly associated with the batch to batch related SPE cartridges reproducibility. The proposed method utilizes a SPE material which was shown not to be affected by such batch to batch differences.

Key words

Tetracyclines, Residues, Food, HPLC, SPE

Literatur

- 1 White, C.R., Moats, W.A. und Kotula, K.L.: Optimization of a liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk. *J. AOAC* **76**, 549–554 (1993).
- 2 Moats, W.A. and Harik-Khan, R.: Rapid HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 931–934 (1995).
- 3 Farrington, W.H., Tarbin, J. and Bygrave, J.: Analysis of trace residues of tetracyclines in animal tissues and fluids using metal chelate affinity chromatography/HPLC. *Food Additives and Contaminants* **8**, 54–64 (1991).
- 4 MacNeil, J.D., Martz, V. K. and Korsrud, G.O.: Chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline in edible animal tissues, liquid chromatographic method: collaborative study. *J. AOAC* **79**, 405–417 (1996).
- 5 Oka, H., Ikay Y. and Kawamura, N.: A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean up system. *J. Chromatogr.* **389**, 417–426 (1987).
- 6 Hougum, J.E. and Larson, R.D.: Assay of chlortetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC* **80**, 961–965 (1997).
- 7 Bestimmung der Rückstände von Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin in essbaren Geweben von Rind, Schaf, Schwein, Putte, Forelle, Karpfen sowie in Kuhmilch und Hühnerei (Routineverfahren). *Bundesgesundheitsblatt* **10**, 410–413 (1995).
- 8 Bergner-Lang, B. und Mikisch, E.: Zur Bedeutung der 4-Epimeren von Oxytetracyclin-, Tetracyclin- und Chlortetracyclin-Rückständen bei der HPLC-Bestimmung in Lebensmitteln tierischer Herkunft. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **90**, 39–41 (1994).
- 9 Haagsma, N. and Scherpenisse, P.: High-performance liquid chromatographic determination of tetracyclines in animal tissue and eggs, Proceedings of Euro Residue II, Veldhoven, The Netherlands, 3–5 May 1993, pages 342–346.
- 10 Carson, M.C. and Breslyn, W.: Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk by metal chelate affinity chromatography: Collaborative study. *J. AOAC* **79**, 29–42 (1996).
- 11 Stubbings, G. and Tarbin, J.: On-line metal chelate affinity chromatography clean up for the high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal tissues. *J. Chromatogr.* **679**, 137–143 (1996).
- 12 Cooper, A. and Stubbings, G.: Improved method for the on-line metal chelate affinity APLC determination of tetracycline antibiotics in animal products. *J. Chromatogr. A* **812**, 321–326 (1998).
- 13 Dürckheimer, W.: Tetracycline; Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen. *Angewandte Chemie* **87**, 751–764 (1975).
- 14 Kennedy, D. and McCracken, R.: Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg. *J. Chromatogr. A* **812**, 327–337 (1998).
- 15 Meinertz, J. and Stehly, G.: Liquid chromatographic determination of oxytetracycline in edible fish fillets from six species of fish. *J. of AOAC* **81**, 702–708 (1998).
- 16 Kaufmann, A.: Fully automated determination of pesticides in wine. *J. AOAC* **80**, 1302–1307 (1997).
- 17 Sporns, P. and Kwan, S.: HPLC analysis of oxytetracyclin residues in honey. *J. Food Prot.* **49**, 383–388 (1986).

Korrespondenzadresse: Anton Kaufmann, Kantonales Labor Zürich, Postfach, CH-8032 Zürich