

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE TETRACICLINA EN QUESOS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF TETRACYCLINE RESIDUES IN CHEESE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Nuri Andrea Merchán-Castellanos¹, Astrid Maribel Aguilera-Becerra^{1*} y Wilfred Edilberto Manrique¹

Docentes Universidad de Boyacá- Tunja. Colombia Autor de correspondencia
Teléfono +57 – 3017590233. Dirección electrónica: amaguilera@uniboyaca.edu.co*

RESUMEN

El objetivo del estudio fue desarrollar una metodología de alta precisión que permitiera detectar y cuantificar residuos de tetraciclina en quesos aplicando la técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Como resultado se generó un método mediante el cual se detectaron residuos de tetraciclina en matrices biológicas complejas como el queso. Se establecieron condiciones de temperatura (30 °C), longitud de onda (265 nanómetros (nm)), volumen (20 microlitros (μL)) y flujo de inyección (1 mililitro (mL)/minutos(min)), así como la fase móvil utilizada con metanol: acetonitrilo: ácido oxálico (74:13:13% volumen/volumen (v/v)) para la corrida en el equipo HPLC. Se obtuvieron curvas de calibración con coeficiente de determinación (R²) próximos a 1, con concentraciones de soluciones estándar de 2,0 partes por millón (ppm), 1,5 ppm, 1,0 ppm, 0,8 ppm, 0,6 ppm, 0,5 ppm, para tetraciclina. El método presentó límites de cuantificación para tetraciclina de 0,1 miligramos/Litro (mg/L) y límite de detección de 0,2 mg/L, valores que se encuentran por debajo de los límites máximos permisibles por la norma colombiana para leches. Por otra parte, se establecieron condiciones para realizar el proceso de extracción de los residuos de antibióticos en matrices biológicas complejas, como buffer, tiempo y temperatura de centrifugación, tipo de cartucho para purificación y reactivo de recuperación entre otras. Se concluye que el porcentaje de recuperación fue adecuado y se evidencia que el método permite la detección de los residuos de antibióticos a partir de muestras biológicas.

Palabras clave: Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC); queso; tetraciclina; antibacterianos

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a high-precision methodology that would allow the detection and quantification of tetracycline residues in cheeses using the Liquid Chromatography High Efficiency (HPLC) analytical technique. As a result, a method was generated in which tetracycline residues were detected in complex biological matrices such as cheese. Conditions of temperature (30 °C), wave length (265 nanometres (nm)), volume (20 microlitres (μL) and injection flow (1 millilitres mL / minutes (min)) were established, as well as the mobile phase used with methanol: acetonitrile: oxalic acid (74 : 13: 13% volume/ volume (v/v)) for the assay on the HPLC machine. Calibration curves with coefficient of determination (R²) close to 1 were obtained, with concentrations of standard solutions of 2.0 parts per million (ppm), 1.5 ppm, 1.0 ppm, 0.8 ppm, 0.6 ppm, 0.5 ppm, for tetracycline. The method presented quantification limits for tetracycline of 0.1 milligrams/Litter (mg/L) and detection limit of 0.02 mg/L, values that are below the maximum limits allowed by the Colombian standard for milk. On the other hand, conditions were established to carry out the extraction process of the antibiotic residues in complex biological matrices, such as buffer, centrifugation time and temperature, type of cartridge for purification and recovery reagent, among others. It is concluded that the recovery percentage was adequate, and it is evident that the method allows the detection of antibiotic residues from biological samples.

Key words: Chromatography high pressure liquid (HPLC); cheese; tetracycline; anti-bacterial agents

INTRODUCCIÓN

El queso es un producto lácteo de gran importancia en la nutrición humana [24]. Se estima que hay más de 2.000 variedades de queso, entre madurados, semi-madurados y frescos [21, 22]. El queso es obtenido del proceso de coagulación enzimática de la leche de vaca (*Bos taurus*) cruda entera o descremada [19].

Las tetraciclinas presentan una estructura común de octahidronaftaceno, formado por cuatro anillos condensados, y por su amplio espectro antimicrobiano [2], y de gran uso en las prácticas ganaderas para la prevención y control de múltiples enfermedades infecciosas; no obstante, las tetraciclinas, al igual que cualquier medicamento administrado a los animales son llevados por el torrente sanguíneo y sus residuos pueden encontrarse en la leche, en cantidades que dependen de la dosis y el intervalo entre la de administración y el ordeño del producto que irá para el consumo humano [1].

Uno de los principales residuos de antibióticos en alimentos son los del grupo de las tetraciclinas [26], dado su amplio uso para el tratamiento de enfermedades en el ganado bovino, especialmente contra la mastitis [8]. Si bien, la concentración de antibióticos en la leche destinada al consumo humano es baja, el consumo continuo de estas sustancias puede llegar a producir reacciones alérgicas, así como generar cepas de bacterias resistentes. [9].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federal Drug Administration (FDA) han establecido normas para la ingesta diaria admisible y los niveles máximos de residuos de antibióticos en los alimentos, con el fin de evitar los efectos nocivos de los residuos de medicamentos en la leche y sus derivados. En el caso de Colombia, se ha establecido 100 nanogramos(ng)/gramos(g) como límite máximo para la tetraciclina [15]. El objetivo del presente estudio fue desarrollar una metodología de alta precisión que permitiera detectar y cuantificar residuos de tetraciclina en quesos aplicando la técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y equipos

Los patrones y reactivos empleados fueron grado analítico: metanol, acetonitrilo, etanol, ácido oxálico anhidro (Merck), disodium dihidrogenofosfato (NaH_2PO_4), ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) y ácido cítrico monohidratado (Sigma-Aldrich). La solución de buffer McIlvaine- Na_2EDTA para la extracción del antibiótico en muestras de queso fue preparada disolviendo 1,29 gramos (g) de ácido cítrico monohidratado, 2,76 g de Na_2HPO_4 y 0,37 g de Na_2EDTA en 100 mililitros (mL) en agua destilada, con pH ajustado a $4,0 \pm 0,05$ con 0,1M HCl o 0,1M NaOH. Esta solución fue preparada semanalmente y almacenada en refrigeración (Refrigerador No Frost Marca Electrolux DW42X 2 Puertas 386 L Colombia). Las soluciones estándar de tetraciclina 99% de pureza (Sigma-Aldrich) fueron diluidas en agua milli-q para obtener concentraciones de 0,5;0,6; 0,8; 1,0; 1,5 y 2,0 miligramos (mg)/litros(L), se protegieron de la luz y se mantuvieron en refrigeración hasta por una semana (sem).

Para la preparación de las muestras se empleó la centrifuga Sorvall Primo R, balanza analítica Adventure Ohaus ± 0.0001 g, filtros de jeringa Whatman (Merck), Cartucho Oasis HLB *polymeric sorbent* (3 mL 200 mg) (Waters, Milford, EUA. En la determinación del antibiótico de tetraciclina (TC) se utilizó un equipo de HPLC Perkin Elmer series 200 de bomba binaria e inyector automático Coreano. La separación fue realizada utilizando una Columna Phenomenex Luna 5 micras (μ) C18 (150 x 4,6 milímetros (mm)). Para evidenciar la presencia del analito se utilizó un detector de rayos ultravioleta(UV), marca Beacon Pet, modelo 2002, fabricante Ramdal - Alemania. La fase móvil fue preparada con metanol, acetonitrilo y ácido oxálico 50 milimolar(mM) en una proporción de 74:13:13 volumen(v/v), filtrada y desgasificada. La temperatura de la columna fue de 30 °C con un flujo de inyección de 1,0 mililitros (mL)/minutos(min).

Preparación de la muestra

Aproximadamente $5 \pm 0,001$ g de matriz de queso fueron homogeneizadas con 20 mL de solución de extracción buffer McIlvaine- Na_2EDTA pH 4.0 y fortificadas con 2,0 mg/mL de solución patrón de tetraciclina. La mezcla se agitó en un mezclador vórtex marca Fisherbrand™ ZX3 por 10 min y se llevó a centrifugación por 10 min a 53,936.575 G por minuto (min) a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y al precipitado se le adicionó 20 mL buffer McIlvaine- Na_2EDTA . La mezcla fue centrifugada en una centrifuga marca centric MF48R, modelo 2017 de Eslovenia, bajo las mismas condiciones anteriores y los sobrenadantes fueron recolectados. A los 30 mL del sobrenadante se adicionó una solución de ácido tricloroacético al 24% en un volumen (v) igual al 10% del volumen (v) total recolectado, la mezcla fue agitada por 1 min y mantenida a -4 °C por 15 min, luego del cual la mezcla fue filtrada en papel Whatman con 125 mm de poro [24].

La purificación y concentración del analito fue realizada a través de extracción en fase sólida (SPE), empleando la columna Oasis HLB (3 mL, 200 mg). Una vez acondicionada la columna con 3 mL de metanol (velocidad de flujo 3 mL/min) y 1 mL de agua desionizada, se pasaron 5 mL de la muestra preparada a un flujo de 5 mL/min. Posteriormente, la columna fue lavada con 3 mL de solución de metanol en agua desionizada al 5% y la elución del analito se llevó a cabo con 5 mL de metanol grado HPLC con una velocidad de flujo de 4 mL/min [1]. Las muestras obtenidas fueron secadas con nitrógeno gaseoso y reconstituidas con 2 mL de fase móvil. Finalmente, las muestras fueron filtradas con membranas de celulosa de 0,22 micrómetros (μm) de poro y dispuestas en viales para cromatografía.

Parámetros analíticos

Los límites de detección y de cuantificación se calcularon mediante las siguientes fórmulas: Límite de detección = $(Y_{bl} + 3 S_{bl}/b) * (1/\text{número de datos})$; Límite de cuantificación = $(Y_{bl} + 3 S_{bl}/b) * (1/\text{número de datos})$, donde Y_{bl} : Estimado de la respuesta del blanco, S_{bl} : Desviación estándar del blanco, b : Pendiente de la curva de calibración

Linealidad

1.- Se siguieron los lineamientos establecidos por la guía ICH

Q2(R1). Se prepararon seis soluciones estándar de tetraciclina con concentraciones de 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 y 2,0 mg/L. En total se emplearon seis réplicas para cada concentración. A los resultados experimentales se le aplicaron las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y de t de Student para determinar la linealidad, con un nivel de confianza del 95%, dichos datos fueron analizados en el programa SPSS versión 23.0 [12].

Precisión: repetibilidad

La repetibilidad se evaluó a partir del coeficiente de variación del factor de respuesta (ICH, 2005). Se realizaron doce réplicas en días diferentes para los límites superior e inferior (0,5; 1,0; 2,0 mg/L).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ante el amplio uso de las tetraciclinas como agentes terapéuticos en el área veterinaria se han desarrollado diversos métodos cromatográficos aplicados a matrices biológicas como peces [2], carne [22], leche [4,25], miel [27], huevos [10]; sin embargo, pocos reportes puntualizan detección de antibióticos en matrices de queso [5, 18].

Para la optimización del presente método se tuvo en cuenta la selección y concentración de los solventes, la determinación de la longitud de onda y demás condiciones de la corrida. En este contexto, los reportes indican que las tetraciclinas dos longitudes de ondas de máxima absorción (275 y 350 nm) en detector ultravioleta [28]; sin embargo, para este estudio fueron ensayadas longitudes de onda de 360 y 265 nm, que si bien ambas presentaron una respuesta alta, se observaron menos compuestos interferentes a 265 nm en los cromatogramas, de allí que esta longitud de onda fuera seleccionada para la detección óptima del analito.

En la FIG. 1 se identifica la señal correspondiente y el tiempo de retención con respecto al estándar de tetraciclina que fue de 5,25 min.

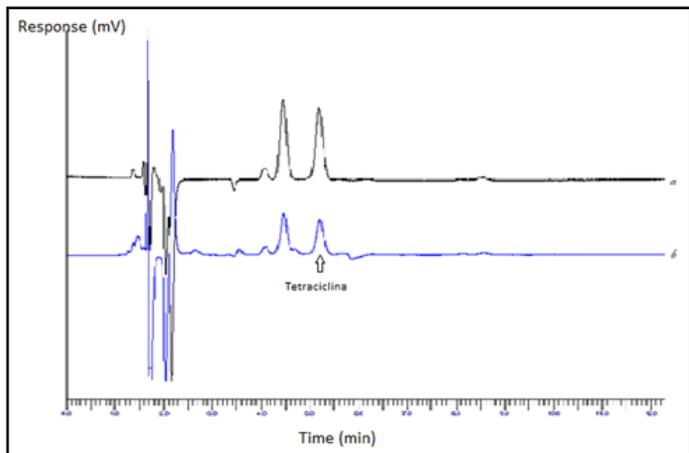


FIGURA 1. CROMATOGRAMA DE TETRACICLINA A 265 nm. (a) Solución patrón de tetraciclina a una concentración de 2,0 mg/mL. (b) Muestra de queso fortificada con 2,0 mg/mL de tetraciclina

En cuanto a los solventes, Stolker y Brinkman [23] escriben que debido a la presencia de dos grupos cetona en la posición 1 y 11, las tetraciclinas pueden quelarse fácilmente con iones metálicos, inclusive puede interactuar con grupos silanol durante la separación por cromatografía líquida y ser adsorbidos en la columna de fase reversa, pudiendo generar *tailing* [22]. En otro estudio, para evitar la formación de quelatos y su absorción en la columna de fase reversa se ensayó con el ácido oxálico [17].

Además del ácido oxálico, otros solventes como acetonitrilo y metanol fueron evaluados en diferentes volúmenes (v), siendo metanol, acetonitrilo y ácido oxálico 50mM (74:13:13 v/v), la combinación óptima de la fase móvil, debido a que se presentó la mejor resolución, obteniendo cromatogramas con un tiempo de ejecución de 5,25 min. El empleo de estos tres solventes para la detección de tetraciclinas ha sido reportado: la separación de ocho tetraciclinas con un sistema de solventes de metanol-acetonitrilo-0,5 M ácido oxálico (pH 2,0) (1: 1: 4) [18].

Para la preparación de la muestra se tomaron como referencia varios protocolos de extracción en leche [6,11,20] y en queso [5], los cuales tiene en común las etapas de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético, extracción líquida con buffer McIlvaine en combinación con EDTA o diclorometano, seguida por una extracción de fase sólida. Estos pasos fueron aplicados a la metodología del presente estudio, considerando al buffer McIlvaine sin combinación con otros compuestos como único solvente de extracción, debido a que ha sido ampliamente reportado como un solvente eficiente en la extracción de tetraciclinas en una diversidad de matrices biológicas [7].

Los procesos de purificación reportados en la literatura refieren que el uso de extracción de fase sólida antes de la cromatografía puede ser ventajoso para disminuir los efectos de supresión iónica [9]. Para este propósito, fueron evaluados los cartuchos Oasis-HLB, debido a su alta selectividad, por ser este un copolímero hidrofílico-lipofílico de N-vinilpirrolidona y divinil-bencenos, en donde N-vinilpirrolidona (hidrofílica) aumenta la humectabilidad del polímero en agua y divinilbenceno (lipofílico) proporciona la retención de fase inversa necesaria para retener los analitos [22]. El empleo de esta columna ha sido reportada por diferentes autores [3, 14] y es recomendado para la extracción y limpieza de productos farmacéuticos de limpieza y cuidado personal [13, 16].

Linealidad

La curva de calibración obtenida en la cuantificación de la molécula de referencia comprendió valores entre 0,5 y 2,0 mg/L, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,99 (FIG. 2); valor que permitió confirmar una buena linealidad entre la concentración del analito y el área de señal de respuesta, existiendo una respuesta a cada cambio de concentración.

TABLA I
RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE TETRACICLINA (P<0,05)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados medios	F	Valor crítico de F
Regresión	1	7752589002	7752589002	2197,92475	1,2383E-06
Residuos	4	14108925,3	3527231,32		
Total	5	7766697927			

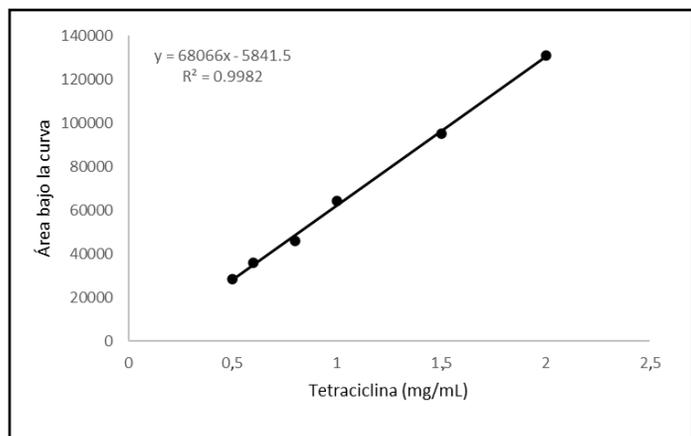


FIGURA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE TETRACICLINA (POR TRIPLICADO) EN 50 mM DE ÁCIDO OXÁLICO

El porcentaje de recuperación obtenido (promedio) fue de 162 ± 4,7%. El tiempo de retención observado para la detección de tetraciclina en muestras de queso fortificada fue de 5,25 min (FIG. 2).

La prueba ANOVA mostró una diferencia significativa del área bajo la curva por cada valor de concentración de tetraciclina (TABLA I). Los resultados demostraron la sensibilidad del método. No se encontraron diferencias significativas entre las réplicas de cada concentración.

La prueba *t* de Student, con un nivel de confianza del 95% y *n*-2 grados de libertad indica que hay una relación directamente proporcional entre la concentración de tetraciclina y la respuesta instrumental, para el rango establecido de 0,5-2,0 mg/L, y teniendo en cuenta el límite de detección (TABLA II). Se infiere que los errores sistemáticos no afectan la linealidad del método.

TABLA II
RESULTADOS OBTENIDOS PARA LINEALIDAD SEGÚN LA PRUEBA T DE STUDENT (NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%)

	Coefficiente de correlación
Hipótesis	Ho: no hay correlación
	H1: hay correlación
Confianza	0,95
Resultados	$t_{exp} = 119$
	$t_{exp} = 2,08$
Criterio de decisión	Rechazar Ho

Límites de detección y cuantificación

El límite de cuantificación calculado fue de 0,1 mg/L y el límite de detección fue de 0,02 mg/L (TABLA III).

TABLA III
LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN MUESTRAS DE QUESO

Y_{bl}	S_{bl}	M	Factor	Límite de cuantificación
1291,6	793,98	53017	10	0,1 mg/L
				Límite de detección
1291,6	793,98	53017	3	0,02 mg/L

Y_{bl} : estimado del límite de detección del blanco, S_{bl} : desviación del estándar blanco

Precisión: repetibilidad

En la TABLA IV se presentan los resultados obtenidos teniendo en cuenta el factor de respuesta, tomando los límites superior e inferior, y en el punto medio del rango. El método presenta una buena precisión a nivel de la repetibilidad, considerando que el coeficiente de variación de todos los puntos es inferior al 3%.

TABLA IV
FACTORES DE RESPUESTA OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE REPETIBILIDAD

	Límite superior	Punto medio	Límite inferior
Área 1	130,125,25	467,67,52	28, 288,05
Área 2	129,252,36	46,325,25	28, 279,28
Área 3	129,620,195	48,224,24	28, 797,1
Área 4	132,676,21	44,113,86	29, 157,44
Área 5	133,552,25	46,184,20	29, 162,32
Área 6	134,137,54	44,386,74	27, 811,38
Área 7	127,460,58	46,112,49	27, 442,19
Promedio	130,974,912	46,016,331	28, 419,68
DE	2,497,13	1, 405,17	658,38
CV	1,9	3,1	2,3

DE: desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

Exactitud

En la TABLA V se muestran los resultados obtenidos en la recuperación de la tetraciclina en el proceso de extracción y cuantificación. Los resultados indican valores más altos a los esperados y superiores al 90%.

TABLA V
PORCENTAJE DE RECUPERACION OBTENIDO EN EL ENSAYO DE EXCTITUD

Concentración adicionada	Concentración medida	Recuperación (%)
2.0 ± 0,1	3.2 ± 0,1	37 ± 4,7

CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones de corrida en el equipo HPLC para obtener señales de residuos de tetraciclina a partir de muestras de queso, así como algunas condiciones para realizar el proceso de extracción de los residuos de antibióticos en matrices biológicas complejas, como buffer, tiempo y temperatura de centrifugación, tipo de cartucho para purificación y reactivo de recuperación.

Los porcentajes de recuperación fueron adecuados, lo que indica la eficiencia del método para detectar residuos de antibióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ABBASI, M; BABAEI, H; ANSARIN, M; NOURDADGAR, AO; NEMAT, M. Simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk samples by solid phase extraction and HPLC-FL method. **Adv. Pharm. Bull.** 1: 34-39. 2011.

[2] AGUILERA, C; HERRERA, C; PONCE, J. Determinación de oxitetraciclina en salmonídeos Implementación, validación y aplicación de un nuevo método para la determinación de

oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmonídeos. **J. Aquat. Res.** 38: 227-233.2010.

[3] ANDRADE-EIROA, A; CANLE, M; LEROY-CANCELLIERI, V; CERDÀ, V; Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review. part I. **trac-Trend. Anal. Chem.** 80: 641-654. 2016.

[4] BOULTIF, L; ZEGHILET, N; CHEBIRA, B; AGABOU, A; MEKROUD, A. Validation of a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of oxytetracycline residues in milk. **Adv. Anim. Vet. Sci.** 2: 574-581. 2014.

[5] BRANDSTETEROVA, E; KUBALEC, P; BOVANOVA, L; SIMKO, P; BEDNARIKOVA, A; MACHACKOVA, L. SPE and MSPD as pre-separation techniques for HPLC of tetracyclines in meat, milk and cheese. **Z. Lebensm. Unters. F. A.** 205: 311-315. 1997.

[6] DENOBILE, M; NASCIMENTO, E. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Bras. Cien. Farm.** 40: 209-218. 2004.

[7] DLUHOŠOVÁ, S; KANIOVÁ, L; BORKOVCOVÁ, I; VORLOVÁ, L. A study of changes in the concentrations of tetracycline antibiotics in honey. **J. Food Sci. Tech. Mys.** 1: 25-27. 2016.

[8] FRANCO, J; ROMERO, M; TABORDA, G. Determinación de niveles residuales de tetraciclina en canales bovinas por la técnica de ELISA en el frigorífico Friogan (La Dorada). **Biosalud.** 7: 47-55. 2008.

[9] FREITAS, A; BARBOSA, J; RAMOS, F. Multidetecção de antibióticos em tecido de fígado por ultra-alta pressão-liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B.** 22: 49-54. 2015.

[10] FURUSAWA, N. Rapid liquid chromatographic determination of oxytetracycline in milk. **J. Chromatogr. A.** 839: 247-251. 1999.

[11] FURUSAWA, N. Simplified liquid-chromatographic determination of residues of tetracycline antibiotics in eggs. **J. Chromatogr.** 53: 47-50. 2001.

[12] INTERNACIONAL BUSSINES MACHINES (IBM) CORP. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.

[13] KUMAR, V; GUPTA, J. Synthesis of policies among stakeholders to combat antimicrobial resistance in livestock animals: Indian perspective. **J. Pharmacol. Phytoch.** 7: 3649-3653. 2018.

[14] MEINERTZ, JR. Liquid chromatographic determination of oxytetracycline in edible fish fillets from six species of fish. **JAOAC. Int.** 81: 702-708. 1998.

- [15] MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución N.° 00001382 de 2 de mayo de 2013. En Línea : <https://www.minsalud.gov.co/sites/hrid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-1382-de-2013.pdf>. 22 Julio 2020.
- [16] MIRZAEI, R; YUNESIAN, M; NASSERI, S; GHOLAMI, M; JALILZADEH, E; SHOEIBI, S; BIDSHAHI, HS. An optimized SPE-LC-MS/MS method for antibiotics residue analysis in ground, surface and treated water samples by response surface methodology- central composite design. **J. Environ. Health Sci.** 15: 21. 2017.
- [17] NIETO, LE; GIRALDO, R. Tendencias of biotechnology, innovation and development in Colombia. **Luna Azul.** 41:348-364.2015.
- [18] OKA, H; ITO, Y; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **J. Chromatogr. A.** 82: 109-133.2000.
- [19] ORWA, JD; MATOFARI, JW; MULIRO, PS; LAMUKA, P. Assessment of sulphonamides and tetracyclines antibiotic residue contaminants in rural and peri urban dairy value chains in Kenya. **Int. J. Food Contaminat.** 4: 5. 2017.
- [20] PRADO, CK; FERREIRA, FD; BANDO, E; MACHINSKI, M. Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in pasteurised cow's milk commercialised in Brazil. **Food Addit. Contam. B.** 8: 81-84. 2015.
- [21] RAMIREZ - LOPEZ, C. Physical properties of foods View project Physical properties of dairy products View project. 2012. Universidad de las Américas Puebla. On Line: <https://www.researchgate.net/publication/303959697>. 8 Julio 2020.
- [22] SENYUVA, H; OZDEN, T; SARICA, DY. High-performance liquid chromatographic determination of oxytetracycline residue in cured. **Turk. J. Chem.** 4: 395-400. 2000.
- [23] STOLKER, AAM; BRINKMAN, UAT. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. **J. Chromatogr.A.** 1067: 15-53.2015.
- [24] TORRES, M. Determinación de niveles de tetraciclina y oxitetraciclina en leche cruda en la Asociación Copla (corporación productora de leche de Alóag) de la parroquia Alóag del cantón Mejía. Univ. Central del Ecuador. Tesis de Grado .82 pp. 2015.
- [25] BRICEÑO FERREIRA, E; DEL C, BRITO; ECHENIQUE, R.; DÍAZ RIVERA, H; Y, COLINA MARTINEZ; MANIGLIA MÉRIDA, G. C; & ARRIETA MENDOZA, D. 2019. Determinación de residuos de cloranfenicol y sulfamidas en leches de larga duración, en la ciudad de Maracay , Venezuela. Revista Científica De La Facultad De Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia, 28(2), 121 - 128. Recuperado a partir de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/29200>
- [26] VIÑAS, P; BALSALOBRE, N; LÓPEZ-ERROZ, C; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. **J. Chromatogr. A.** 1022: 125-129. 2004.
- [27] WILSON, JS; OTSUKI, T; MAJUMDSAR, B; Balancing food safety and risk: do drug residue limits affect international trade in beef **J. Int. Trade. Econ. Dev.** 2: 37-402. 2003.
- [28] ZHOU, J; XUE, X; LI, Y; ZHANG, J; CHEN, F; WU, L; CHEN, L; ZHAO, J. Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. **Food Chem.** 115: 1074-1080. 2009.