รายงานจากห้องปฏิบัติการ

ว กรมวิทย พ 2556; 55 (2) : 94-106

# การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง

**ปุษยา แสงวิรุฬห์ และสุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิวงศ์**

*สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000*

**บทคัดย่อ** การวิเคราะห์ปริมาณตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งโดยวิธี tandem solid phase extraction ตัวอย่างน้ำผึ้งถูกสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ EDTA-McIlvaine pH 4.0 แล้วกำจัดสารรบกวนอื่นออกจากตัวอย่างโดยวิธี tandem solid phase extraction ด้วย SPE 2 ชนิดร่วมกันคือ C18 และ PRS ตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC – UV detector จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) พบว่ามีค่า Limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า Limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (Linear working range) เท่ากับ 0.02 – 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.9991 และตลอดช่วง Linear working range มีความแม่น (accuracy) แสดงด้วย % Recovery 87 – 96 ค่าความเที่ยง (precision) แสดงด้วยค่า %RSD 6.44 – 8.93 และค่า HORRAT 0.47 – 0.59 เมื่อประเมินผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามพารามิเตอร์ต่าง ๆ แล้ว พบว่าวิธีนี้เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างชนิดออกซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง และได้นำวิธีวิเคราะห์นี้ตรวจน้ำผึ้งจำนวน 62 ตัวอย่าง ซึ่งมีแหล่งผลิตในประเทศและนำเข้า ผลไม่พบการตกค้างของสารออกซีเตตราซัยคลินทุกตัวอย่าง

## บทนำ

น้ำผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่ได้จากผึ้งซึ่งสร้างขึ้นเพื่อเลี้ยงตัวอ่อน มนุษย์นิยมนำมาบริโภคเพราะน้ำผึ้งมีสารอาหารที่มีคุณค่าให้ประโยชน์ต่อร่างกาย และเชื่อว่าน้ำผึ้งมีสรรพคุณเป็นยา ความต้องการบริโภคน้ำผึ้งจึงสูงและเป็นที่แพร่หลาย จนน้ำผึ้งที่ได้จากธรรมชาติไม่เพียงพอต่อความต้องการจึงมีการเลี้ยงผึ้งเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตต่าง ๆ จากผึ้ง น้ำผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง แต่เนื่องจากในการเลี้ยงผึ้งมักพบกับปัญหาการระบาดของโรคต่าง ๆ จากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส เช่น การระบาดของโรค American foulbrood (AFB) และ European foulbrood (EFB) จึงทำให้มีการใช้ยาสัตว์ และสารเคมี ในการป้องกัน ควบคุม หรือรักษาโรคของผึ้ง ออกซีเตตราซัยคลิน (OTC) เป็นยาในกลุ่มเตตราซัยคลินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีจึงนิยมนำมาใช้[1, 2] แต่ถ้านำมาใช้อย่างไม่ระมัดระวังหรือศึกษาวิธีการใช้ เกี่ยวกับระยะเวลาของการหยุดใช้ (withdrawal period) ก่อนนำมาบริโภคอาจมีการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์จากผึ้ง หากผู้บริโภคได้รับยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง ร่างกายอาจเกิดอาการแพ้หรือดื้อยาดังกล่าวเมื่อใช้ยานี้รักษาอาการเจ็บป่วย คณะกรรมการพิจารณามาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ สาขาสารตกค้างจากยาสัตว์ในอาหาร (Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, CCRVDF) รวมถึงในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (พ.ศ. 2550) เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง[3] กำหนดค่า Maximum Residue Limit

*Accepted for publication, 1 May 2013*

(MRL) ของออกซีเตตราซัยคลิน ในกล้ามเนื้อ (0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ตับ (0.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ไต (1.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ของโค สุกร แกะ สัตว์ปีก ในน้ำนม ของโค สุกร แกะ (0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ในไข่ ของสัตว์ปีก (0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และในกล้ามเนื้อของปลา และกุ้งกุลาดำ (0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) แต่ยังไม่มีค่ากำหนดในน้ำผึ้ง และผลิตภัณฑ์จากผึ้ง[3, 4] ในต่างประเทศมีบางประเทศที่มีข้อกำหนดเฉพาะค่า MRL ของออกซีเตตราซัยคลิน เช่น EU กำหนด 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศแคนาดา ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น กำหนด 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นต้น[5, 6, 7] มีรายงานพบการตกค้างของสารนี้ในน้ำผึ้งที่จำหน่ายในประเทศอินเดีย และกรีซ [7, 8]

ห้องปฏิบัติการได้ทดสอบวิธีวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลินในกุ้งและได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 แล้ว โดยสกัดออกซีเตตราซัยคลินออกจากตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ EDTA-McIlvaine pH 4.0[9, 10, 11, 12, 13] กำจัดสารรบกวนอื่นออกจากตัวอย่าง ด้วย SPE C18 แล้วจึงตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC-UV detector ต่อมาจึงได้ขยายขอบข่ายวิธีดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์น้ำผึ้ง แต่เนื่องจาก matrix ตัวอย่างน้ำผึ้งแตกต่างจากกุ้ง เมื่อนำวิธีนี้มาใช้กับน้ำผึ้งซึ่งมีสารรบกวนทำให้การแยกสารไม่ชัดเจน ส่งผลให้เมื่อใส่สารละลายออกซีเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้งระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ในกุ้ง แสดง %Recovery มีค่าระหว่าง 35 - 90 ซึ่งไม่อยู่ช่วงที่ยอมรับของวิธี คือ 70 - 110 ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษา ปรับปรุง และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งโดยสกัดออกซีเตตราซัยคลินออกจากตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ EDTA-McIlvaine pH 4.0[9, 10, 11, 12, 13] และใช้วิธี tandem solid phase extraction กำจัดสารรบกวนอื่นออกจากตัวอย่าง โดยการเพิ่มขั้นตอนการใช้ SPE - C18 ร่วมกับ SPE-PRS column[14] เพื่อกำจัดสิ่งรบกวนทำให้สารละลายที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC-UV detector วิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือเดิมที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ การขยายขีดความสามารถนี้จะเป็นการเตรียมความพร้อมในการรองรับมาตรฐานที่จะเกิดขึ้นและเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคด้วย

## วัสดุและวิธีการ

### สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: oxytetracycline hydrochloride (Sigma) ความบริสุทธิ์ 97%

สารเคมี: acetronitrile HPLC, methanol HPLC, oxalic acid dihydrate AR, citric acid AR, anhydrous dibasic sodium phosphate AR, di-sodium ethylenediaminetetraacetic acid dihydrate (EDTA) AR, ethyl acetate AR, น้ำกลั่น

### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (stock solution) โดยละลายสารมาตรฐาน oxytetracycline hydrochloride 0.1032 กรัม และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วย methanol

- สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วย methanol

- สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วย methanol

- สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (calibration curve solution) โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วย 50%methanol ในน้ำกลั่น

**การเตรียมสารละลาย**

- Oxalic acid 1 M: ชั่ง oxalic acid dihydrate 12.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

- Oxalic acid 0.01 M: ชั่ง oxalic acid dihydrate 1.26 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

- McIlvaine buffer:

- สารละลายที่ 1: ชั่ง anhydrous dibasic sodium phosphate 28.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

- สารละลายที่ 2: ชั่ง citric acid 21.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

- ผสมสารละลายที่ 2 ปริมาตร 1 ลิตร กับ สารละลายที่ 1 ปริมาตร 625 มิลลิลิตร ปรับค่า pH สารละลายเป็น 4.0

- McIlvaine buffer-EDTA : ชั่ง EDTA 60.5 กรัม ละลายใน McIlvaine buffer 1625 มิลลิลิตร

**เครื่องมือ และอุปกรณ์**

เครื่องชั่ง 3 และ 4 ตำแหน่ง, เครื่องหมุนเหวี่ยง, เครื่องเขย่า, vortex mixer, ชุด vacuum manifold, HPLC system (WATERS alliance 2695) ประกอบด้วย helium degasser, quaternary pump, thermostatted column compartment, UV detector, HPLC คอลัมน์ชนิด C8 (Vertical) ขนาด 250 × 4.6 มิลลิเมตร id., 5 ไมโครเมตร, SPE ชนิด C18 500 มิลลิกรัม (Varian) ปรับสภาพด้วย methanol 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และชนิด PRS 500 มิลลิกรัม (Varian) ปรับสภาพด้วยสารละลายผสม ethyl acetate : methanol (90:10), 10 มิลลิลิตร, กระดาษกรองเบอร์ 1, syringe filter ชนิด nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

**การศึกษาวิธีการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ (Clean up) ด้วย SPE - C18[9] เทียบกับวิธี tandem solid phase extraction[14]**

ตัวอย่างน้ำผึ้ง 4 ตัวอย่าง จากต่างผู้ผลิต (honey 1, 2, 3 และ 4)

วิเคราะห์น้ำผึ้ง (blank honey) และน้ำผึ้งที่เติม OTC (spiked honey) ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยสกัดและ clean up ด้วย SPE - C18 ตามวิธี[9] ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ OTC ในกุ้ง และวิเคราะห์ด้วยวิธี tandem solid phase extraction[14]

**วิธีการวิเคราะห์น้ำผึ้งโดยสกัดและ clean up ด้วย SPE - C18[9]**

ตัวอย่างน้ำผึ้ง 5 กรัม สกัดด้วย 30 มิลลิลิตร McIlvaine buffer-EDTA pH 4.0 โดยนำไป

เขย่าด้วยเครื่องเขย่า และ centrifuge นาน 10 นาที จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วยกระดาษกรองใส่ใน Erlenmeyer flask แล้วทำให้บริสุทธิ์ (clean up) ด้วย SPE - C18 และชะ OTC ด้วย methanolic oxalic acid และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายตัวอย่างด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวด และฉีดเข้าเครื่อง HPLC

**การตรวจวัดชนิดและปริมาณ ด้วยเครื่อง HPLC** ใช้สภาวะดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Analytical column | : | C8 (Vertical); 5 ไมโครเมตร ขนาด 250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร id. |
| Mobile phase | : | methanol : acetonitrile : 0.01 M oxalic acid ( 1 : 2 : 7) |
| Flow rate | : | 1.2 มิลลิลิตร/นาที |
| Column oven | : | 30 องศาเซลเซียส |
| Injection volume | : | 60 ไมโครลิตร |
| Detector | : | UV ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร |

เมื่อสภาวะของเครื่อง HPLC พร้อมใช้งาน ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) โดยการฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ซ้ำ คำนวณ %RSD ของ retention time และ peak area เกณฑ์ยอมรับค่าการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ ดังนี้

| | |
|---|---|
| %RSD ของ retention time | ≤ 1.0 |
| %RSD ของ peak area | ≤ 2.0 |

**วิธีการวิเคราะห์น้ำผึ้งสกัดและ clean up ด้วย tandem solid phase extraction**[14]

ตัวอย่างน้ำผึ้ง 10 กรัม สกัดด้วย 30 มิลลิลิตร McIlvaine buffer-EDTA pH 4.0 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า และ centrifuge นาน 10 นาที จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วยกระดาษกรองใส่ใน Erlenmeyer flask แล้วทำให้บริสุทธิ์ (Clean up) ด้วยวิธี tandem solid phase extraction ดังนี้ นำสารละลายตัวอย่างผ่านคอลัมน์ SPE - C18 จนหมด แล้วนำ SPE - C18 ต่อเข้าที่ด้านบนของคอลัมน์ SPE - PRS เติมสารละลายผสม ethyl acetate : methanol (90:10) 50 มิลลิลิตร ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านทั้งสองคอลัมน์จนหมด จากนั้นนำ SPE C18 ออก แล้วชะ OTC ออกจากคอลัมน์ SPE - PRS ด้วยสารละลายผสม methanol : acetonitrile : 1.0 M oxalic acid (1:1:8) 5 มิลลิลิตร รองรับสารที่ชะได้ด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตรและปรับปริมาตร กรองสารละลายตัวอย่างด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวด และฉีดเข้าเครื่อง HPLC การตรวจวัดชนิดและปริมาณ ด้วยเครื่อง HPLC ใช้สภาวะเดียวกับวิธีวิเคราะห์ด้วย SPE – C18

**การทดสอบความถูกต้อง (Method Validation)**[15, 16, 17] **ของวิธี tandem solid phase extraction**[14]

ตัวอย่างน้ำผึ้ง 1 ตัวอย่าง (honey 4)

**ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)**

**- การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)**

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน 50% methanol อย่างน้อย 6 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ นำมาวัดสัญญาณจากเครื่องมือสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีค กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ระดับต่างๆ และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r)

**- วิเคราะห์ Matrix Effect**

วิเคราะห์ spiked honey ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ นำค่ามาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับความเข้มข้นของ spiked honey ประเมิน matrix effect และทดสอบว่า slope เท่ากับ 1 หรือไม่ โดยการหาช่วงของความเชื่อมั่น (CI) ของ slope (b) จากสมการ

Confidence interval ของ slope,

$$CI_{slope} = b \pm t_{(n-2)} S_b$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - x_{mean})^2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum(y_i - y_{predicted})^2}{(n-2)}}$$

$CI_{slope}$ คือ ช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval) ของ slope

b คือ slope ของเส้นตรง

t คือ ค่าจากตาราง t (t-distribution) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ (n-2) degree of freedom

$S_b$ คือ standard deviation ของ slope

$x_i$ คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

$x_{mean}$ คือ ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐาน

$y_i$ คือ ค่าสัญญาณที่ได้จากการวัด

$y_{predicted}$ คือ ค่าสัญญาณที่ได้จากการคำนวณ

ถ้า $CI_{slope}$ ผ่าน 1 แสดงว่าไม่มี matrix effect

**การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)**

ทดสอบโดยการวิเคราะห์ ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงค่าต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย, SD แล้วจึงนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

LOD = 3SD

LOQ = 6SD

ยืนยันความแม่นและความเที่ยงของค่า LOQ ที่คำนวณได้ โดยเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตามที่คำนวณได้จากสูตร 10 ซ้ำ แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย, %Recovery และ %RSD

**การทดสอบความความแม่นและความเที่ยง (Accuracy and Precision)**

ทดสอบความความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ระดับ 0.05, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ %Recovery และ %RSD

**การประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี**

ผลการทดสอบที่ได้จะถูกประเมินดังนี้

%Recovery ของยาสัตว์ตกค้างในอาหารตามที่ Codex[17, 18] ระบุไว้ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงที่ยอมรับได้คือ 70 – 120 และที่ระดับ ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงที่ยอมรับได้คือ 70 – 110, %RSD เปรียบเทียบกับค่า Predicted RSDr ตาม Horwitz's equation โดยใช้ HORRAT (Horwitz ratio)

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSD}_r}{\text{Predicted RSD}_r}$$

เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT ตามที่ Codex และ EU กำหนดค่าไว้ที่ ≤ 2

**การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty)[19]**

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย โดยใช้ k = 2 ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดปริมาณสารที่พบคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณ OTC ที่พบ (mg/kg)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ OTC อ่านจากกราฟมาตรฐาน (µg/ml)} \times \text{ปริมาตรที่ปรับ (ml)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

**สำรวจปริมาณการตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งโดยวิธี tandem solid phase extraction[14]**

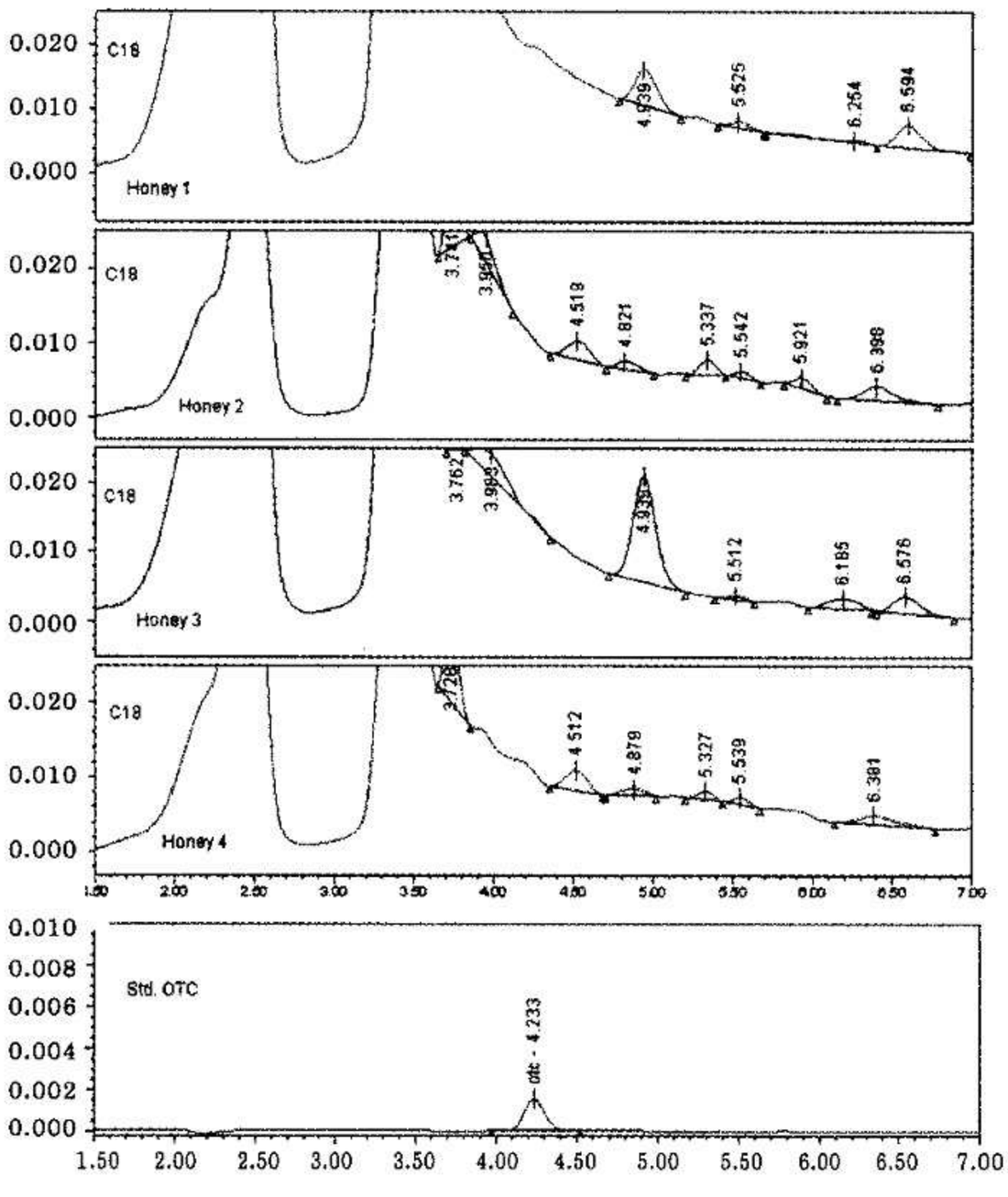
ตัวอย่างน้ำผึ้ง ที่วางจำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตพื้นที่ต่างๆ ดังนี้ บางบอน ธนบุรี-ปากท่อ ลาดหญ้า บางพลัด จรัญสนิทวงศ์ ท่าพระ สุขุมวิท รัชดาภิเษก ลาดพร้าว บางเขน แจ้งวัฒนะ จำนวน 62 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์ในประเทศ 58 ตัวอย่าง จากฟาร์มผึ้งในภาคเหนือ เชียงใหม่โครงการหลวงดอยคำ ฟาร์มผึ้งลพบุรี เอราวัณ โครงการส่วนพระองค์จิตรลดา และน้ำผึ้งนำเข้า 4 ตัวอย่าง จากประเทศออสเตรเลีย และฝรั่งเศส ส่งวิเคราะห์โดยกองอาหาร (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็นสำนักอาหาร) สำนักคณะกรรมการอาหารและยา ในปี 2552 – 2553

## ผล

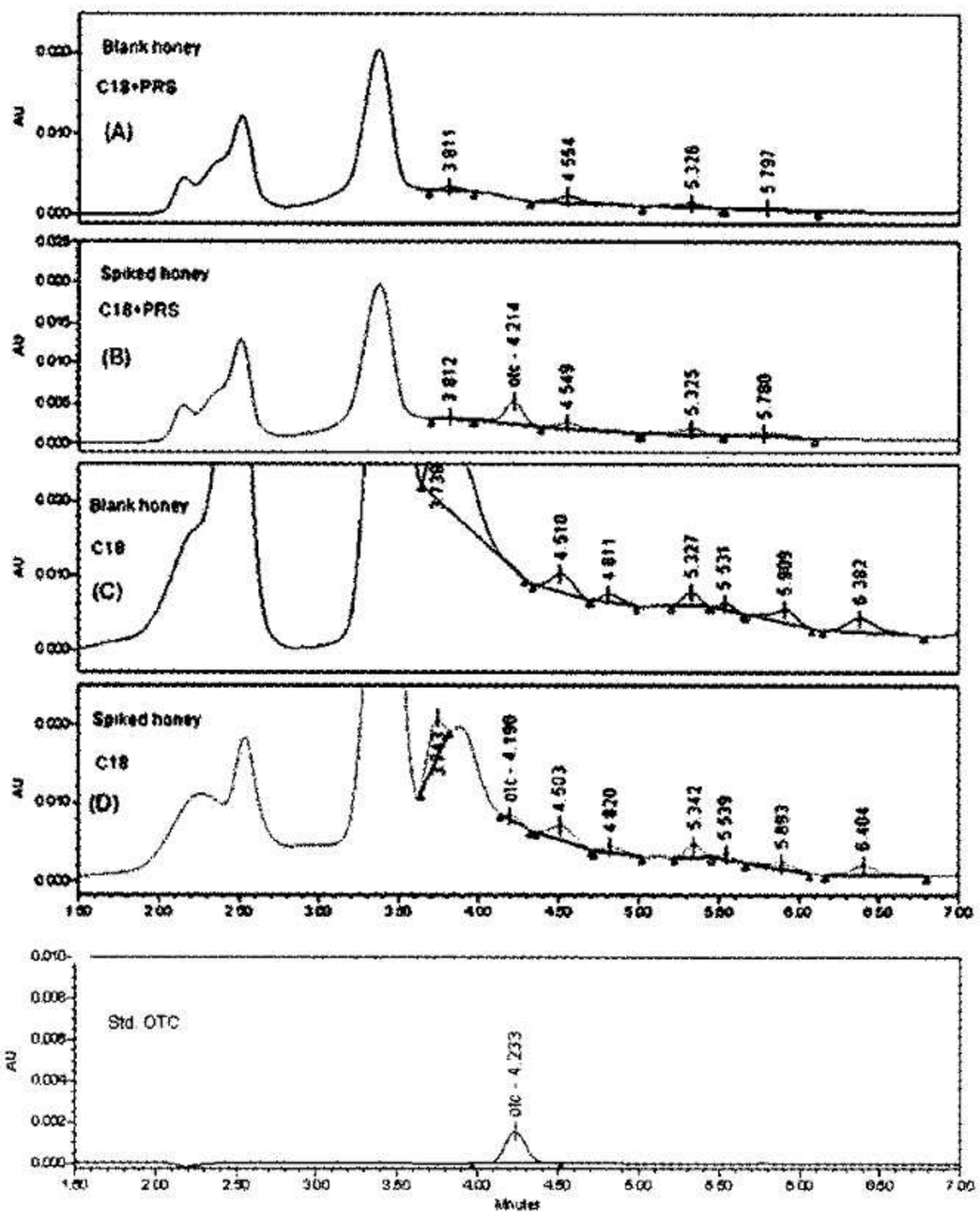
**การศึกษาวิธีการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ (Clean up) ด้วย SPE – C18[9] เทียบกับวิธี tandem solid phase extraction[14]**

จากโครมาโทแกรมการวิเคราะห์น้ำผึ้ง 4 ตัวอย่าง (blank honey) ที่ clean up ด้วย SPE - C18 ตามวิธี[9] เทียบกับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน OTC พบว่าการ clean up ด้วย SPE - C18 มี baseline ที่สูงและมีพีครบกวนที่มี RT ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน OTC (ภาพที่ 1) และโครมาโทแกรมของ (A) blank honey, (B) spiked honey ที่ clean up ด้วย tandem solid phase extraction (C18 + PRS) เทียบกับโครมาโทแกรมของ (C) blank honey, (D) spiked honey ที่ clean up ด้วย SPE - C18 (ภาพที่ 2)

ผลทดสอบ Recovery ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ spike OTC 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าวิธี SPE - C18 ได้ % Recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 35 - 90 และวิธี tandem solid phase extraction ได้ %Recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 87 - 96 (ตารางที่ 1)




**ภาพที่ 1** โครมาโทแกรมของ blank honey 4 ตัวอย่าง ที่ clean up ด้วย SPE-C18



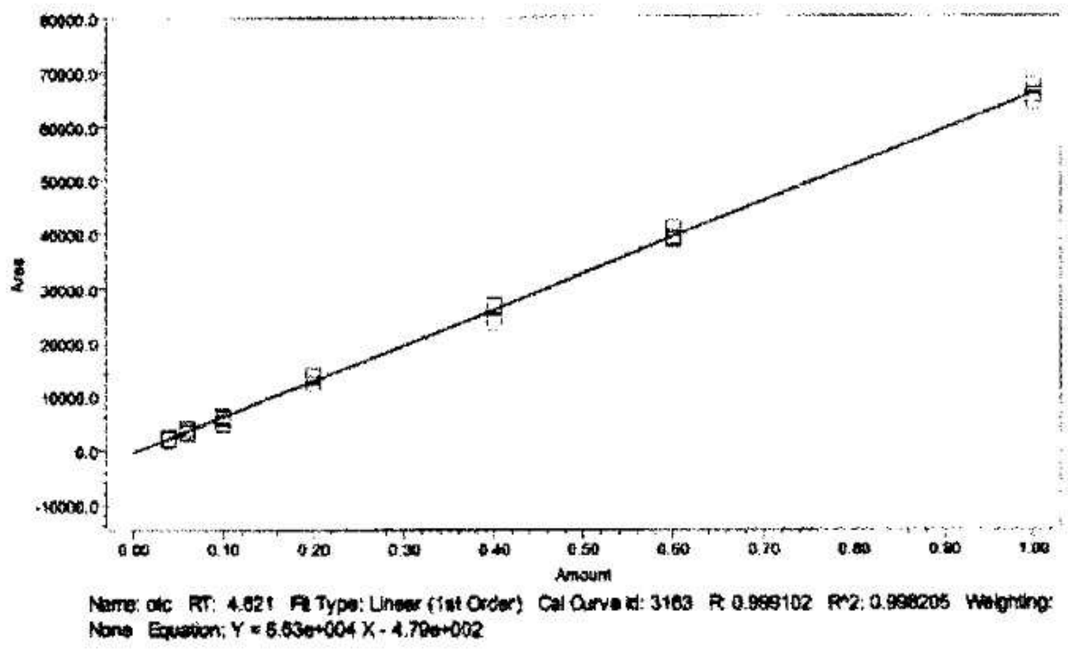

**ภาพที่ 2** โครมาโทแกรมของ (A) blank honey และ (B) spiked honey ที่ clean up ด้วย tandem solid phase extraction (C18 + PRS), (C) blank honey และ (D) spiked honey ที่ clean up ด้วย C18

**ตารางที่ 1** แสดง %Recovery ของการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ spike OTC 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยวิธี SPE-C18 เทียบกับวิธี tandem solid phase extraction (SPE C18+PRS)

| N | Recovery,% - วิธี SPE- C18 | | Recovery,% - วิธี SPE C18+PRS | |
|---|---|---|---|---|
| | Honey-1 | Honey-4 | Honey-1 | Honey-4 |
| 1 | 93 | 36 | 96 | 78 |
| 2 | 87 | 31 | 93 | 92 |
| 3 | 75 | 44 | 96 | 92 |
| 4 | 63 | 28 | 93 | 77 |
| 5 | 110 | 40 | 103 | 93 |
| 6 | 108 | 30 | 97 | 93 |
| ค่าเฉลี่ย | 90 | 35 | 96 | 87 |

## การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) โดยวิธี tandem solid phase extraction

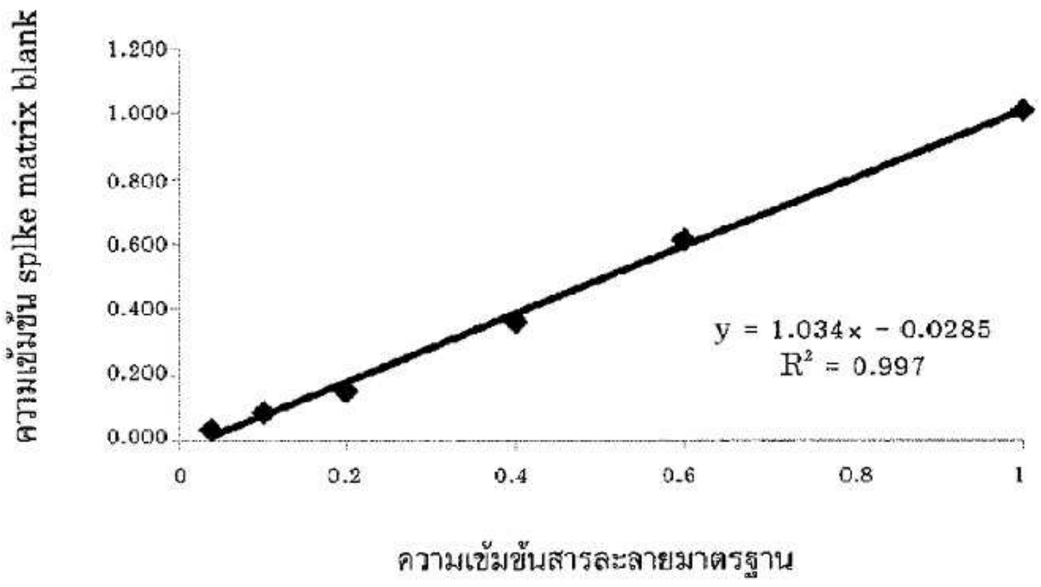
วิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ จากสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.04 – 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.02 – 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่างน้ำผึ้ง) ระดับละ 3 ซ้ำ ได้กราฟเส้นตรงที่มีค่า r = 0.9991 (ภาพที่ 3)




**ภาพที่ 3** วิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์จากกราฟสารมาตรฐาน OTC ที่ระดับความเข้มข้น 0.04-1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 3 ซ้ำ

ทดสอบ matrix effect ของ blank honey โดยเติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0.04, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60 และ 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่าง) นำค่ามาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับความเข้มข้นของ spiked honey (ภาพที่ 4) และทดสอบค่า slope ได้ดังนี้

$CI_{slope}$ = 1.0347 ± 0.08




**ภาพที่ 4** กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน OTC กับความเข้มข้นของ OTC ที่วิเคราะห์ได้จาก spiked honey ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เพื่อทดสอบ matrix effect ของน้ำผึ้งที่ clean up ด้วยวิธี tandem solid phase extraction

นั่นคือ slope มีช่วงของความเชื่อมั่น ตั้งแต่ 0.96 ถึง 1.11

วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เติมสารมาตรฐาน OTC ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 10 ซ้ำ คำนวณค่า 3SD ได้ค่า LOD เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ ทดสอบค่า LOD โดยวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เติมสารมาตรฐาน OTC ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 10 ซ้ำ ได้ค่า signal to noise มากกว่า 3 เท่า และคำนวณค่า LOQ จาก 6SD เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ ทดสอบค่า LOQ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เติม OTC ที่ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ 10 ซ้ำ ได้ %Recovery เฉลี่ย 112 และได้ค่า %RSD เท่ากับ 4.25 เมื่อคำนวณค่า Predicted RSDr ตาม Horwitz'equation พบว่าค่าที่ได้น้อยกว่า 2 (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ผลทดสอบความแม่นและความเที่ยงเมื่อเติมสารมาตรฐาน OTC ที่ LOQ ในน้ำผึ้งโดยวิธี tandem solid phase extraction

| Spiked level (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) | Mean, conc (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) | Mean Recovery, % | RSD, % | HORRAT |
|---|---|---|---|---|
| 0.02 (n=10) | 0.022 | 112 | 4.25 | 0.23 |

ทดสอบความความแม่นและความเที่ยง โดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ พบว่า % Recovery มีค่า เฉลี่ยอยู่ในช่วง 87 - 96 และ %RSD อยู่ในช่วง 6.44 - 8.93 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Predicted RSDr ตาม Horwitz'equation พบว่าค่า HORRAT ที่ได้น้อยกว่า 2 (ตารางที่ 3)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์ได้แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนจากการชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง การเตรียมสารมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ความแม่น (%Recovery) และความเที่ยง (Repeatability) เมื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่า LOQ คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายได้เท่ากับ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4)

**สำรวจปริมาณการตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งโดยวิธี tandem solid phase extraction**[14]

ผลการตรวจวิเคราะห์ OTC ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ส่งตรวจระหว่างปี 2552 - 2553 จำนวน 62 ตัวอย่าง ไม่พบการตกค้างของ OTC ในตัวอย่างดังกล่าว

**ตารางที่ 3** ผลทดสอบความแม่นและความเที่ยงเมื่อเติมสารมาตรฐาน OTC ที่ระดับต่างๆ ในน้ำผึ้งโดยวิธี tandem solid phase extraction

| Spiked level (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) | Mean, conc (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) | Mean Recovery, % | RSD, % | HORRAT |
|---|---|---|---|---|
| 0.05 (n=7) | 0.048 | 96 | 8.93 | 0.54 |
| 0.10 (n=7) | 0.093 | 93 | 8.93 | 0.59 |
| 0.20 (n=7) | 0.174 | 87 | 6.44 | 0.47 |

**ตารางที่ 4** แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ OTC ในน้ำผึ้งโดยวิธี tandem solid phase extraction

| Components | Value, Xi | Standard uncertainty, U (xi) | Relative standard uncertainty, U (xi)/xi | $(U(xi)/xi)^2$ |
|---|---|---|---|---|
| 1. Sample | | | | |
| -Sample weight | 10 g. | 0.0012728 g. | 0.0001273 | 0.00000002 |
| -Final volume | 5 ml. | 0.0173656 | 0.0034731 | 0.00001206 |
| 2. Standard | | | | |
| - purity | 97% | 0.8660254 % | 0.0086603 | 0.00007500 |
| -Std. weight | 0.1032 g. | 0.0001131 g. | 0.0010959 | 0.00000120 |
| -Volume | 100 ml. | 0.1734388 | 0.0017344 | 0.00000301 |
| Intermediate std. | | | | |
| -Volume (flask) | 10 ml | 0.0175784 ml. | 0.0017578 | 0.00000309 |

**ตารางที่ 4** แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ OTC ในน้ำผึ้งโดยวิธี tandem solid phase extraction (ต่อ)

| Components | Value, Xi | Standard uncertainty, U (xi) | Relative standard uncertainty,U (xi)/xi | $(U(xi)/xi)^2$ |
|---|---|---|---|---|
| -Volume (pipette) Working std. | 1 ml | 0.0017321 ml. | 0.0017321 | 0.00000300 |
| -Volume (flask) | 10 ml. | 0.0175784 ml | 0.0017578 | 0.00000309 |
| -Volume (pipette) Calibration std. | 1 ml. | 0.0017321 ml. | 0.0017321 | 0.00000300 |
| -Volume (flask) | 10 ml.x6 | 0.0467942 ml. | 0.0046794 | 0.00001854 |
| -Volume (pipette) | 1 ml. | 0.0017321 ml. | 0.0017321 | 0.00000300 |
| | 0.6 ml. | 0.0008660 ml. | 0.0014433 | 0.00000208 |
| | 0.4 ml. | 0.0008660 ml. | 0.0021650 | 0.00000469 |
| | 0.2 ml. | 0.0004330 ml. | 0.0021650 | 0.00000469 |
| | 0.1 ml. | 0.0001732 ml. | 0.0017320 | 0.00000300 |
| | 0.04 ml | 0.0000866 ml. | 0.0021650 | 0.00000469 |
| 4. Co | 0.044 µg/ml | 0.0028480 | 0.0647273 | 0.00418962 |
| 5. Precision | 1 | 0.0134397 | 0.0134397 | 0.00018062 |
| 6. Recovery | 90.24% | 1.7872000 | 0.0198050 | 0.00039224 |
| Combine standard uncertainty, Uc (B)/(B) | | | | 0.07004737 |
| Standard uncertainty Uc (B) x 0.02 mg/kg | | | | 0.00140095 |
| Expanded uncertainty U (B), k = 2, 2 × 0.0014 mg/kg | | | | 0.00280189 |

## วิจารณ์

ห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารมีวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์ออก-ซีเตตราซัยคลินในกุ้งโดยวิธี HPLC แล้ว จึงได้ขยาย matrix เพื่อใช้วิธีดังกล่าววิเคราะห์ปริมาณออก-ซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง ขั้นตอนการกำจัดสารรบกวน (clean up) ในวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวนี้ใช้ SPE - C18 จากผลการทดลองโครมาโทแกรมของ blank honey มี baseline สูง และพีคที่พบมี RT ใกล้เคียงกับ RT ของสารมาตรฐาน และค่า % Recovery ที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับ LOQ ของกุ้ง มีบางค่าที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์กำหนด (ตารางที่ 1, ช่วงที่ยอมรับได้คือ 70 – 110%) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการรบกวนของ matrix ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ จึงทำให้ ผลที่ได้มีค่าผิดพลาด SPE-C18 มีคุณสมบัติเป็น non – polar มี silica เป็นส่วนประกอบ สามารถใช้ได้กับตัวอย่างที่ละลายในน้ำ หรือตัวทำละลายที่มี polarity สูง[20] น้ำผึ้งมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบและมีค่าความเป็นกรด การใช้ SPE-C18 เพียงชนิดเดียว อาจไม่เพียงพอ จึงได้เพิ่มการใช้ SPE - PRS ร่วม กับ SPE - C18 เนื่องจาก SPE – PRS มีคุณสมบัติเป็น strong cation exchange sorbent มีค่า pKa ต่ำ[21] จึงเหมาะกับตัวอย่างที่มีค่าเป็นกรด ผลการทดสอบ matrix effect ของการใช้ SPE - C18 ร่วมกับ SPE - PRS (tandem solid phase extraction) ค่า slope ที่ได้มีช่วงของ

ความเชื่อมั่น ตั้งแต่ 0.96 ถึง 1.11 ซึ่งค่าที่ได้เข้าใกล้ 1 นั่นแสดงว่าไม่มีการรบกวนจาก matrix กับสารที่ต้องการวิเคราะห์

การทดสอบขีดจำกัดของปริมาณการตรวจพบ (LOQ) มีค่า เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และมี LOQ ต่ำกว่าการตรวจวิเคราะห์ OTC ในกุ้ง (0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และเมื่อทำการทดสอบ %Recovery ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าได้ค่าเฉลี่ย 87–96 ดีกว่าการใช้เฉพาะ SPE – C18 ซึ่งได้ค่า %Recovery เฉลี่ย 35 – 90 โดยมีบางค่าไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ หากนำ C18 และ PRS มาใช้ร่วมกันในการวิเคราะห์ตัวอย่างกุ้งเพื่อให้ LOQ ต่ำลงอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากคอลัมน์ SPE – PRS ใช้กับตัวอย่างที่อยู่ในสภาพกรด อย่างไรก็ตาม SPE – PRS อาจนำไปใช้ร่วมกันกับ C18 ในตัวอย่างนมผึ้ง (royal jelly) ซึ่งเป็นอีกผลิตภัณฑ์หนึ่งที่ได้จากผึ้ง มีความเป็นกรดอ่อน ๆ และมีสารรบกวนมาก เช่นเดียวกับน้ำผึ้ง

ในปัจจุบัน Codex[4] ยังไม่มีการกำหนดค่า MRL ของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง มีเพียงบางประเทศที่มีการกำหนดขึ้นเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคภายในประเทศ เช่น EU กำหนดค่า 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศแคนาดา ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น กำหนด 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม[4, 5, 6, 7] เป็นต้น ซึ่งค่า LOQ ที่ได้จากวิธีที่ปรับปรุงนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ทั้งนี้เมื่อนำวิธีนี้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีแหล่งผลิตในประเทศและนำเข้า พบว่าสามารถใช้ได้โดยไม่มีสารรบกวนในการแปลผล ดังนั้นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับแล้วยังเหมาะสมกับการนำไปใช้การตรวจวิเคราะห์น้ำผึ้งอีกด้วย ถึงแม้ว่าไม่พบการตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินใน 62 ตัวอย่างนี้ อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจติดตามเพื่อเฝ้าระวังต่อไป

## สรุป

ผลจากการศึกษาและปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง โดยวิธี tandem solid phase extraction ได้ค่าขีดจำกัดของปริมาณการตรวจพบ (LOQ) เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามพารามิเตอร์ต่าง ๆ สรุปได้ว่ามีความถูกต้องและเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค และวิธีนี้ยังมีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยากอีกด้วย นอกจากนี้วิธีดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการขยายขอบข่ายการวิเคราะห์ โดยเพิ่มชนิดของสารในกลุ่มของเตตราซัยคลินได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวจันทร์ฉาย แจ้งสว่าง ที่ให้คำปรึกษา และเจ้าหน้าที่ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ส่งเสริมและสนับสนุนให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Oxytetracycline HCl in the beekeeping industry. Food & Agriculture, Department of Primary Industries, Parks, Water and Environment. Agdex 481, 44-12/1990.
2. Plavša N, Stojanović D, Stojanov I, Puvača N, Stanaćev V, Đuričić. Evalution of oxytetracycline in the prevention of American foulbrood in bee colonies. African Journal of Agricultural Research; 18 March, 2011; 6(6): 1621 – 1626.
3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2552 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (พ.ศ. 2550) ราชกิจจานุเบกษาเล่ม 124 ตอนพิเศษ 108 ง. (วันที่ 4 กันยายน 2550)
4. Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990.

5. Piro R, Mutinelli F. The EU legislation for honey residue control. APIACTA 2003; 38: 15-20.
6. The Japan Food Chemical Research Foundation. Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Food. The Japanese positive list system for agricultural chemicals residues in foods; May 29, 2006.
7. Johnson S, Jadon N. Antibiotic residues in honey. Centre for Science and Environment; September, 2010. http://www.cseindia.org/userfiles/factsheet2.pdf
8. Saridaki-Papakonstadinou M, Andredakis S, Burriel A, Tsachev I. Determination of tetracycline residues in Greek honey. Trakia Journal of Sciences, 2006; 4(1): 33 – 36.
9. AOAC Official Method 995.09. In: Horwitz W, editor. Official Method of Analysis of AOAC International. 18 th ed. Gaitherburg, MD : AOAC International; 2005: 22-26.
10. Oka H, Patterson. Chapter 10, Chemical analysis of tetracycline antibiotics. AOAC International: 386-406.
11. Pena A, Pelantova N, Lino C.M, Silveira N, Solich P. Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. Journal of agricultural and food chemistry 2005; 53: 3784-3788.
12. Gunes M.E, Gunes N, Cibik R. Oxytetracycline and sulphonamide residues analysis of honey samples from southern Mamara region in Turkey. Bulgarian Journal of Agricultural Science 2009; 15 (2): 163-167.
13. Vinas P, Balsalobre N, Lopez-Erroz C, Hernandez-Cordoba M. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. Journal of Chromatography A, 1022 2004: 125-129.
14. Geertsen G, Pederson B. Determination of residual tetracyclines in honey by HPLC-UV; Optimizing and validation. In proceedings of Euroresidue IV conference. Residues of veterinary drugs in food, 2000: 460-464.
15. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้อง ปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
16. Eurachem Guide. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, 1st edition; 1998: 5-24.
17. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food products animals; CAC/GL 71-2009.
18. Codex alimentarius commission, Procedural Manual, Twentieth edition, 2011.
19. สุวรรณา จารุนุช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
20. WATERS: Sep-Pak SPE. http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513158 สืบค้น 12 เมษายน 2555
21. Agilent Technologies. Agilent products for solid phase extraction: 8,14

# Method Validation of Determination of Oxytetracycline in Honey

**Pusaya Sangvirun and Suthatip Vitchaivutivong**

*Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand*

**ABSTRACT** : A technique to detect residual by HPLC-UV detector was validated for oxytetracycline (OTC) in honey. OTC was extracted from honey samples with EDTA-McIlvaine buffer pH 4.0 The extracted solutions were cleaned up by tandem solid phase C18 and PRS SPE columns. The eluates were quantitated by HPLC with UV detection. The limit of detection is 0.01 mg/kg and limit of quantitation is 0.02 mg/kg. Linear working range is 0.02 – 0.50 mg/kg and the correlation coefficient is 0.9991 Accuracy of the method shown by % recovery of spiking OTC standard to sample matrix is 87 - 96. Precision shown by % relative standard deviation (%RSD) is 6.44 - 8.93 and HORRAT is 0.47 -0.59. On conclusion this method is valid and fit for using as analytical method for oxytetracycline residue in honey. Analytical results of 62 honey samples from local and imported products were not detected.

**Key word : Oxytetracycline, Honey, Tandem SPE**