

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ยาตกค้างกลุ่มควิโนโลนในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค HPLC-FLD

จิราภา อุณหเลขกะ และลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ยาปฏิชีวนะกลุ่มควิโนโลนเป็นยาที่อนุญาตให้ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ที่เสี่ยงเพื่อการบริโภค การใช้ยาอย่างไม่ถูกต้องจะทำให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์ ส่งผลให้เกิดอาการข้างเคียงและการดื้อยาในมนุษย์ได้ จึงได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยาในกลุ่มนี้ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, flumequine และ oxolinic acid โดยเทคนิค HPLC-FLD ยาในกลุ่มนี้จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างด้วยสารละลายผสมของ 0.3% metaphosphoric acid กับ acetonitrile ด้วยอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร กำจัดไขมันโดยใช้เทคนิค liquid-liquid extraction ด้วย hexane ที่อิ่มตัวด้วย acetonitrile และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค solid phase extraction ด้วย HLB C-18 cartridge จากนั้นตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-FLD วิธีดังกล่าวมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linearity of working range) อยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R^2) มากกว่า 0.95 มีความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วยค่าเฉลี่ย % recovery และความเที่ยง (precision) แสดงด้วยค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในช่วง 65.1-97.8% และ 0.3-0.9 ตามลำดับ และจากการทดสอบ matrix effect ทางสถิติด้วย paired t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\mu = 0.05$) การเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญโดยการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการมีค่า $|Z|$ น้อยกว่า 2 วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทดสอบตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 จากนั้นได้สำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในเนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อวัวจำนวนทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในตลาด 11 แห่งในเขตกรุงเทพฯ และนนทบุรี พบว่ามีเนื้อไก่ 1 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ oxolinic acid ปริมาณ 29.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และอีก 2 ตัวอย่าง พบ Enrofloxacin ปริมาณ 16.1 และ 16.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

บทนำ

กลุ่มยาควิโนโลนมีสูตรโครงสร้างหลักที่ประกอบด้วย 1-substituted-1, 4-dihydro-4-oxopyridine-3-carboxylic moiety และ aromatic groups มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สามารถแบ่งตามสูตรโครงสร้างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วย pyridonecarboxylic acid ได้แก่ nalidixic acid, flumequine และ oxolinic acid เป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดแกรมลบได้ดี และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วย piperazinyl ได้แก่ danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, sarafloxacin, ciprofloxacin, difloxacin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กว้าง (broad spectrum antibiotics) ทั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวก แกรมลบ และ mycoplasma โดยยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV ที่จำเป็นต่อการทำซ้ำและแปลรหัส DNA (DNA replication and transcription) ของแบคทีเรีย^(1, 2) ยากลุ่มนี้เป็นยาที่อนุญาตให้ใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ และทางเดินอาหารในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคทั้งสัตว์บกและสัตว์น้ำ⁽³⁾ การใช้ยาอย่างไม่ถูกต้องหรือไม่สมเหตุผลตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมการใช้ยาสัตว์ การกำหนดเกสซ์เคมีภัณฑ์ที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์^(4, 5) หรือตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง ข้อกำหนดการควบคุมการใช้ยาสำหรับสัตว์⁽⁶⁾ รวมไปถึงการไม่ปฏิบัติตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (Good Agriculture Practices; GAP) สำหรับปศุสัตว์หรือสัตว์น้ำ ทำให้เกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์ เมื่อบริโภคจะส่งผลให้เกิดอาการข้างเคียงที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง อาการไม่สบายท้อง คลื่นไส้ ปวดศีรษะ นอนไม่หลับ⁽⁷⁾ และอาจก่อให้เกิดการดื้อยาในมนุษย์ได้เนื่องจากเป็นยากลุ่มเดียวกับที่ใช้ในมนุษย์ มีการรายงานในประเทศไทยกำลังประสบปัญหาการดื้อยากลุ่มนี้ของเชื้อ *E.coli* โดยมีร้อยละการดื้อยาประมาณ 54 ในปี พ.ศ. 2555-2556⁽⁸⁾ เชื้อกลุ่ม nontyphoidal *Salmonella* และ *Shigella* ในภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้ มีช่วงร้อยละการดื้อยา กลุ่มนี้อยู่ที่ 0.2-4 และ 0-82 ตามลำดับ⁽⁹⁾ และจากงานวิจัยพบว่าไก่ฟาร์มดื้อยาด้านเชื้อ *Salmonella* มากกว่าไก่บ้าน สาเหตุเนื่องจากการใช้ยาต้านจุลชีพ เช่น มีอัตราการดื้อยาต่อ nalidixic acid, ciprofloxacin เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 59.2 เป็น 78.3, 0 เป็น 8.7 ตามลำดับ⁽¹⁰⁾

การวิเคราะห์ยากลุ่มนี้ในเนื้อสัตว์นิยมใช้เทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดเป็น UV/VIS, photodiode array (PDA)^(11, 12), fluorescence (FLD)^(13, 14, 15) หรือ MS/MS⁽¹⁶⁾ วิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เริ่มจากการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายและสารละลายกรด กำจัดไขมันด้วย n-hexane ทำให้บริสุทธิ์ (clean up) ด้วย solid phase extraction: SPE แล้ววิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-FLD

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง มีการกำหนดมาตรฐานการตรวจพบยาสัตว์ตกค้างสูงสุด (maximum residue limit, MRL) ของยากลุ่มนี้ไว้เพียง 3 ชนิดเท่านั้น คือ sarafloxacin, danofloxacin และ flumequine โดยตกค้างได้ไม่เกินปริมาณ 10-80, 50-400 และ 500-3,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ⁽¹⁷⁾ และตามประกาศกรมปศุสัตว์ พ.ศ. 2549 เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์กำหนดให้มี enrofloxacin ตกค้างสูงสุดได้ไม่เกิน 100-300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁸⁾ แต่เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่พบการรายงานการเฝ้าระวังยากลุ่มนี้ในอาหารอย่างต่อเนื่อง และกฎหมายไม่ครอบคลุมยากลุ่มนี้ทุกชนิด รวมถึงไม่มีวิธีมาตรฐานในระดับชาติหรือนานาชาติ (AOAC) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนางานวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการ โดยเลือกใช้เทคนิค HPLC-FLD แม้ว่าจะมีความไวน้อยกว่าเครื่องตรวจวัดชนิด MS หรือ MS/MS 15-50 เท่า แต่มีความไวมากกว่าชนิด UV 5 เท่า⁽¹⁹⁾ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการคุ้มครองผู้บริโภค และเป็นข้อมูลในการกำหนดค่าการตกค้างสูงสุด (Maximum residue limits: MRLs) ของประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน : danofloxacin mesylate (purity 93.5%), difloxacin hydrochloride (purity 97.5%), enrofloxacin (purity 98.5%), flumequine (purity 99.0%), oxolinic acid (purity 98.0%), sarafloxacin hydrochloride (purity 95.5%) ผลิตภัณฑ์ Dr. Ehrenstorfer GmbH

สารเคมี : acetonitrile ($C_4H_8O_2$), hexane (C_6H_{14}) และ methanol (MeOH) เป็น HPLC grade, phosphoric acid (H_3PO_4), metaphosphoric acid (HPO_3)_n, sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), sodium dodecyl sulfate ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) และ sodium hydroxide pellets (NaOH) เป็น AR grade

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม และ 0.01 มิลลิกรัม, refrigerated centrifuge, vortex mixer, rotary evaporator, เครื่องบดปั่น (blender), เครื่องผสมเป็นเนื้อเดียว (homogenizer), micro pipette ขนาด 10–200, 20–200 และ 100–1,000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, separating funnel ขนาด 125 มิลลิลิตร, round bottom flask ขนาด 100, 250 มิลลิลิตร, vacuum manifold, SPE HLB cartridge, micro-spin filter tube ชนิด PVDF 0.45 ไมโครเมตร, เครื่อง HPLC Agilent 1,200 series ประกอบด้วย quaternary pump, autosampler, vacuum degasser, thermostat column compartment, detector ชนิด FLD Ex 327/Em 367 nm, Ex 295/Em 446 nm, HPLC column: pHendure C18, 150 × 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร มีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ acetonitrile: 0.05M NaH_2PO_4 (pH 2.5) 35:65 (v/v) ที่มี 3.5 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) ใช้โปรแกรม gradient มี flow rate 1.0–1.2 มิลลิลิตรต่อนาที, inj. vol. 20 ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 20 นาที

ตัวอย่าง

1. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนของกลุ่มเนื้อสัตว์ เนื่องจากเนื้อหมูมีไขมันสูงทำให้เกิดสารรบกวน (Interference) มากกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่น
2. การสำรวจปริมาณยาตกค้างในอาหาร พ.ศ. 2556 ใช้เฉพาะตัวอย่างสัตว์บก เนื่องจากตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขไม่มีเกณฑ์กำหนดในสัตว์น้ำ โดยเก็บเนื้อไก่ 24 ตัวอย่าง เนื้อหมู 24 ตัวอย่าง และเนื้อวัว 12 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง จากตลาดในเขตกรุงเทพฯ และนนทบุรี จำนวน 11 แห่ง

วิธีวิเคราะห์

การสกัด (extraction)

ซึ่งเนื้อสัตว์บดละเอียด 5 กรัม ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 0.3% metaphosphoric acid:acetonitrile 1:10 (v/v), 15 มิลลิลิตร ปั่นด้วย homogenizer นาน 1 นาที vortex mixer นาน 1 นาที นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที 4°C นาน 10 นาที กรองส่วนใสใส่ separating funnel สกัดซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง มาสกัดไขมันด้วย hexane ที่อิ่มตัวด้วย acetonitrile ครั้งละ 25 มิลลิลิตร นาน 5 นาที สกัดซ้ำอีกครั้ง นำชั้น acetonitrile ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง นำมาระเหยแห้งด้วย rotary evaporator

การทำให้บริสุทธิ์ (clean - up)

ละลาย residue ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ 10 มิลลิลิตร นำไป load ผ่าน SPE HLB cartridge ที่ activated ด้วย methanol 5 มิลลิลิตร น้ำ 10 มิลลิลิตร ละลาย residue ซ้ำด้วย 10% methanol 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วนำไป load ผ่าน SPE HLB cartridge จากนั้น elute ด้วยสารละลายผสมของ methanol: 0.05M NaH_2PO_4 (pH 2.5) 7:3 (v/v) 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ละลาย residue ด้วย mobile phase 1 มิลลิลิตร เทสารละลายที่ได้ใส่ micro-spin filter นำไปหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vial สีชา นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-FLD

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)⁽²⁰⁾

การทดสอบช่วงของการวัด (Working range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียม external standard calibration curve ที่ระดับความเข้มข้น 50, 125, 250, 375 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ peak area ของสารมาตรฐาน (แกน y) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination: R^2)

การทดสอบ matrix effect

เตรียม external standard calibration curve และ standard addition calibration curve ที่ระดับความเข้มข้น 50, 125, 250, 375 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบสถิติด้วย paired t-test

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection: LOD)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ แล้วตรวจสอบค่า signal/noise

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % recovery และ HORRAT

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % recovery และ HORRAT

การประกันคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

การเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญโดยการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ แล้วตรวจสอบค่า Z-score

การประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์ยอมรับ^(20, 21)

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination: R^2) > 0.95, ค่า signal/noise > 3, ค่า % recovery อยู่ในช่วง 60 -120, ค่า HORRAT (Horwitz ratio) ≤ 2 , $|Z| \leq 2$

ผล

วิธี HPLC-FLD ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ยาตกค้างกลุ่มควิโนโลน 6 ชนิด ให้ค่า retention time (RT) เรียงลำดับจากน้อยไปมาก ดังนี้ oxolinic acid 3.9 นาที, flumequine 7.1 นาที, danofloxacin 8.3 นาที, enrofloxacin 10.2 นาที, sarafloxacin 12.7 นาที และ difloxacin 13.6 นาที โดยวิธีวิเคราะห์นี้มีช่วงของการวัดที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 10-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงที่แสดงด้วยค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.952-0.991 และจากการทดสอบ matrix effect ทางสถิติด้วย paired t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่าไม่มี matrix effect รบกวน

ตารางที่ 1 การทดสอบช่วงของการวัด (Working range) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และ Matrix effect ของวิธีวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Quinolone group	Linearity		Matrix effect	
	R^2 (n=15)	t cal (n=5)	R^2 external standard (n=5)	R^2 standard addition (n=5)
danofloxacin mesylate	0.971	1.36	0.999	0.978
difloxacin hydrochloride	0.965	1.51	0.999	0.985
enrofloxacin	0.952	2.49	0.999	0.984
flumequine	0.991	1.29	0.998	0.997
oxolinic acid	0.957	1.03	0.956	0.992
sarafloxacin	0.967	2.10	0.997	0.993
เกณฑ์ยอมรับ	> 0.95 $< t_{table} (0.05, 4) = 2.78$ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%			

จากการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ พบว่ามีค่าเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้ค่า signal to noise >3 ในทุกชนิดยา ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 76.8-95.2% และ HORRAT อยู่ในช่วง 0.3-0.9 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีความแม่นยำที่ประเมินด้วย %recovery อยู่ในช่วง 65.1-97.8% และความเที่ยงที่ประเมินด้วย HORRAT อยู่ในช่วง 0.3-0.8 (ตารางที่ 2) และการประกันคุณภาพผลการทดสอบ โดยการเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญโดยการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการรายการทดสอบ Fluoroquinolone group และ Quinolone group ในตัวอย่างกึ่ง ILC 56-06 จัดโดย บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 พบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยมีค่าการประเมิน Z-score (z) อยู่ในช่วง -0.59 ถึง 0.99 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ที่ระดับความเข้มข้น 10 (LOQ), 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ในตัวอย่างเนื้อหมู

Quinolone group	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	% Recovery (n=10)	HORRAT
danofloxacin mesylate	10	83.7	0.7
	50	73.1	0.4
	100	65.9	0.5
difloxacin hydrochloride	10	79.3	0.7
	50	77.2	0.4
	100	69.7	0.5
enrofloxacin	10	76.8	0.9
	50	70.9	0.5
	100	65.1	0.6
flumequine	10	88.3	0.3
	50	80.9	0.3
	100	72.8	0.3
oxolinic acid	10	95.2	0.3
	50	97.8	0.6
	100	74.8	0.8
sarafloxacin	10	77.5	0.7
	50	74.4	0.3
	100	66.7	0.6
เกณฑ์ยอมรับ		60-120	< 2

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

Quinolone group	Assign value ($\mu\text{g/kg}$)	Analytical results ($\mu\text{g/kg}$)	Z
enrofloxacin	55.23 $\pm$ 2.54	66.15, 67.24	0.90, 0.99
difloxacin	90.69 $\pm$ 3.43	95.41, 99.70	0.24, 0.45
flumiquine	134.20 $\pm$ 3.52	139.46, 134.36	0.18, 0.01
oxolinic acid	141.38 $\pm$ 2.88	123.43, 135.34	-0.59, -0.20
เกณฑ์ยอมรับ			$ Z \leq 2$

นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2556 ได้นำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้วนี้มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่จำหน่ายในตลาดเขตกรุงเทพฯ และนนทบุรี จำนวนทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อวัว จำนวน 24, 24 และ 12 ตัวอย่าง ตามลำดับ ผลวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างเนื้อไก่ 1 ตัวอย่าง ตรวจพบ oxolinic acid 29.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเนื้อไก่อีก 2 ตัวอย่าง ตรวจพบ Enrofloxacin 16.1 และ 16.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นมีการตรวจพบการตกค้างของยาในกลุ่มนี้คิดเป็นร้อยละ 5 ของตัวอย่างทั้งหมด

วิจารณ์

เนื่องจากยากลุ่มคริโนโลนจะถูกดูดซับได้โดย ODS reverse phase column ทำให้เกิดหางพีก (peak tailing) ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการตกค้างของ silanol ที่เฟสอยู่กับที่ (stationary phase)⁽¹³⁾ เพื่อเป็นการลดปัญหาดังกล่าวจึงเลือกใช้ pH endure C-18 column แบบ end capping ส่วนเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) มีหลายงานวิจัยที่ใช้ MeOH หรือ CH₃CN ผสมกับ buffer ต่างๆ ที่เป็น ionic หรือ acidic เช่น acetic acid, citric acid และ NaH₂PO₄ ที่ pH 3-4.5^(11, 22, 23) และเติม SDS ซึ่งเป็น ion-pairing reagent เพื่อเพิ่มความสามารถในการแยกสาร เนื่องจาก enrofloxacin, danofloxacin, difloxacin และ sarafloxacin อยู่ในรูป cation ในภาวะกรดจึงมีขั้วสูง และความมีขั้วจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ SDS⁽¹²⁾

ในการวิเคราะห์ยากลุ่มคริโนโลนมีการใช้ detector หลายชนิด ได้แก่ UV, fluorescence และ tandem mass เป็นต้น ยากลุ่มนี้เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการเรืองแสง fluorescence ในงานวิจัยนี้จึงปรับการตรวจวัดสัญญาณของแต่ละช่วงเวลาการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC-FLD ดังนี้ ที่เวลา 0-5 นาที และ 18-20 นาที ใช้ Ex 327/Em 367 nm และที่เวลา 5-18 นาที Ex 295/Em 446 nm ตามงานวิจัยที่ใช้ FLD ในการตรวจวัดสัญญาณ^(15, 22, 24, 25) ทำให้สามารถแยก peak ของแต่ละตัวยาออกจากกันได้ และ peak ที่ได้มี asymmetric factor อยู่ในช่วงที่กำหนด

ยากลุ่มคริโนโลนสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์มีขั้ว เช่น methylene chloride, acetonitrile และ trichloroacetic acid ซึ่งใช้เป็นสารสกัดตัวอย่างในงานวิจัยก่อนหน้านี้⁽¹⁴⁾ ในการทดสอบเบื้องต้นจึงใช้ methylene chloride, m-phosphoric: acetonitrile, 75:25 (v/v) และ 1 M hydrochloric acid ในการสกัดตัวอย่างแต่พบว่าทั้ง 3 สารสกัดให้ % recovery ต่ำ จึงปรับมาใช้ 0.3% metaphosphoric acid: acetonitrile, 1:10 (v/v) แทน ให้ผลสอดคล้องกับ Yorke JC. และ Froc P. ที่พบว่าการสกัดตัวอย่างโดยใช้ CH₃CN และ phosphate buffer ให้ค่า % recovery มากกว่า ethyl acetate หรือ methylene chloride แต่ต้องเพิ่มขั้นตอนการ clean-up เพื่อกำจัด phosphate buffer ด้วย solid phase extraction column นอกจากนี้ pH ยังมีผลต่อการสกัดด้วย เนื่องจากยากลุ่มคริโนโลนที่มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วย piperazinil moiety จะมีค่า pKa₁ ~ 6 และ pKa₂ ~ 9 โดยในภาวะเบส enrofloxacin, danofloxacin, difloxacin และ sarafloxacin จะอยู่ในรูป anion ภาวะกรดอยู่ในรูป cation และภาวะเป็นกลางอยู่ในรูป zwitterion จึงละลายได้น้อยในตัวทำละลายมีขั้ว⁽³⁾ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ภาวะกรดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด และอยู่ในสภาพที่สอดคล้องกับเฟสเคลื่อนที่

โดยทั่วไป hexane จะถูกใช้ในการขจัดไขมันและสารไม่บริสุทธิ์ที่ละลายได้ในไขมันที่อยู่ในตัวอย่างที่สกัดได้ ด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction แต่มีบางงานวิจัยเลือกใช้เทคนิค SPE แทน โดยเติม hexane ลงใน isolute ENV + cartridges ก่อนจะชะคริโนโลนออก ซึ่งให้ค่า %recovery ดีกว่า⁽²⁴⁾ แต่เนื่องจาก cartridges ชนิดดังกล่าวไม่มีตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย และเทคนิค liquid-liquid extraction เป็นที่นิยมมากกว่า คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้เทคนิคนี้ในการพัฒนาวิธี ซึ่งขั้นตอนต่อไปจะทำการปรับปรุงวิธีมาใช้ SPE แทน เพื่อลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และเพิ่มความสะดวกรวดเร็วในการวิเคราะห์ให้มากขึ้น

การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค SPE เป็นที่นิยมในงานวิเคราะห์ยาตกค้างในเนื้อสัตว์ เช่น ในงานวิเคราะห์ยากลุ่มคริโนโลน มีการเปรียบเทียบการใช้ SPE ระหว่าง sulfonic cation exchange, Bond elute certify, SDB-RPS Sep-pack cartridges และ MPC-SD disk cartridges พบว่า Bond elute certify มีประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด⁽¹⁶⁾ และการเปรียบเทียบ Bond Elute (200, 500 mg), Sep Pak (360 mg) และ J.T. Baker (500 mg) แสดงให้เห็นว่าความจุคงค้าง (retention capability) ของคริโนโลนไม่ได้ขึ้นกับปริมาณ sorbent เพียงอย่างเดียว แต่มีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น รูปร่างอนุภาค ขนาดรูพรุน ปริมาณคาร์บอน และ end capping⁽²⁵⁾ แต่จากการทดสอบเบื้องต้น พบว่า HLB ดีกว่า Bond Elute เพราะมีคุณสมบัติ hydrophilic-lipophilic balanced จึงเพิ่มการคงค้างของสารมีขั้ว มีความสามารถเป็น water-wettable ทำให้มีประสิทธิภาพคงเดิมแม้ว่า sorbent แห่งระหว่างขั้นตอน conditioning หรือ loading และไม่มีปฏิกิริยากับ silanol

ในการประกันคุณภาพผลการทดสอบ ห้องปฏิบัติการมีขั้นตอนการดำเนินงานในการควบคุมคุณภาพเพื่อเฝ้าระวังความใช้ได้ของการทดสอบ โดยเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ โดยการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 พบว่า ผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ตามหลักสถิติ แสดงว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ยาในกลุ่มควิโนโลนในเนื้อสัตว์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีของห้องปฏิบัติการอื่นๆ และมีการควบคุมคุณภาพภายในด้วยการวิเคราะห์ method blank, matrix blank, duplicate sample และ spiked sample ทุก 10% ของตัวอย่าง พบว่าผลวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

จากผลการสำรวจตรวจพบ oxolinic acid 29.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม enrofloxacin 16.1 และ 16.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในเนื้อไก่ ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 ไม่ได้กำหนดมาตรฐานการตรวจพบยาตกค้างในเนื้อสัตว์สูงสุดของยา 2 ชนิดนี้ แต่ทั้ง 3 ตัวอย่างผ่านเกณฑ์มาตรฐานของสหภาพยุโรปและสาธารณสุขประชาชนจีนที่กำหนดค่า MRL ของ oxolinic acid และ enrofloxacin ในกล้ามเนื้อไก่อยู่ที่ 100 นาโนกรัมต่อกรัม^(26, 27) อย่างไรก็ตาม ภาครัฐควรมีการเฝ้าระวังยาตกค้างในเนื้อสัตว์อย่างต่อเนื่องจากผลกระทบในระดับโลกเกี่ยวกับปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ เนื่องจากยาส่วนใหญ่ที่ใช้ในการรักษา ป้องกันโรค และเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ เป็นยาในกลุ่มเดียวกับที่ใช้ในคน เช่น ยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน หรือเป็นชนิดที่ไม่ใช้ในคนแต่อยู่ในกลุ่มยาเดียวกับที่ใช้ในคน เช่น enrofloxacin ดังนั้นหากมีการใช้ยาอย่างไม่ถูกต้องในสัตว์จะเพิ่มโอกาสที่เชื้อจะดื้อยามากขึ้น ตลอดจนเกิดการพัฒนาเชื้อดื้อยาแบบข้ามกลุ่ม (cross resistance) จนอาจทำให้เกิดการดื้อยาที่ใช้รักษาโรคในคนได้⁽²⁸⁾ ยา enrofloxacin เป็นยาที่ถูกดูดซึมได้ดีหลังจากผสมให้สัตว์กิน สามารถละลายได้ดีในไขมันของร่างกาย เคลื่อนตัวผ่านชั้น lipoprotein ของ cell membranes ได้ง่ายและรวดเร็ว จากนั้นตัวยาก็จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ⁽²⁹⁾ โดยในประเทศไทยใช้ในการควบคุมโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ เช่น โรคหวัดเรื้อรังในไก่ และโรคติดเชื้อ *E. coli* ทำให้อาจพบการตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ ส่งผลให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน มีอาการเกี่ยวกับระบบประสาท มีความไวต่อแสงผิดปกติ และคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญด้านวัตถุเจือปนอาหารขององค์การอนามัยโลก และองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ กำหนดค่าความปลอดภัยที่ยอมรับได้จากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน enrofloxacin 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว⁽³⁰⁾ ในขณะที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้ประกาศถอนการใช้ยา enrofloxacin ในสัตว์ปีก เนื่องจากเป็นสาเหตุของการดื้อยาของเชื้อ campylobacter ในมนุษย์⁽³¹⁾ ส่วน oxolinic acid เป็นยาที่ใช้ต้านแบคทีเรียชนิดแกรมลบ และ Staphylococcus aureus สามารถแพร่กระจายในเนื้อเยื่อปลาได้ดีกว่ายา oxytetracycline มีผลข้างเคียงในคนอย่างมากต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง และปวดท้อง โดยสารนี้จะถูกดูดซึมได้น้อยแต่รวดเร็วในระบบทางเดินอาหาร ถูกขับออกได้ทางปัสสาวะและน้ำนม⁽²⁹⁾

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่มควิโนโลนได้ 6 ชนิด ได้แก่ oxolinic acid, flumequine, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin และ difloxacin เป็นวิธีที่มีสมรรถนะผ่านเกณฑ์การยอมรับของการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว มีความถูกต้อง แม่นยำ เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์ และมีการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ ตามระบบคุณภาพของ ISO/IEC 17025:2005 จึงสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางกนกพร อธิสุข นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญด้านมาตรฐานของอาหาร ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และตรวจทานต้นฉบับ ตลอดจนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Shen JZ, Xie LJ. Veterinary pharmacology. Beijing, China: China Agricultural University Press; 2000. p. 162-167.
2. Martin AR. Quinolones. In: Gisvold O, Delgado JN, Remers WA, editors. Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 10th ed. New York: Lippincott-Raven; 1998. p.196-202.
3. Yorke JC, Froc P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr A 2000; 882: 63-77.
4. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: ข้อปฏิบัติการควบคุมการใช้ยาสัตว์ ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126 ตอนพิเศษ 187 ง. (ลงวันที่ 28 ธันวาคม 2552).
5. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิด ลักษณะ คุณสมบัติ และส่วนประกอบของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ พ.ศ. 2556. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 189 ง. (ลงวันที่ 25 ธันวาคม 2556).
6. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2275 (พ.ศ. 2540) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ข้อกำหนดการควบคุมการใช้ยาสำหรับสัตว์. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 114 ตอนที่ 76 ง. (ลงวันที่ 23 กันยายน 2540).
7. Juhel-Gaugain M, Abjean JP. Screening of quinolone residues in pig muscle by planar chromatography. J Chromatographia 1998; 47: 101-4.
8. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center of Thailand (NARST). [online]. 2013; [cited 2014 Feb 20]. Available from: URL: <http://narst.dmsc.moph.go.th/ars/box/anti2013.pdf>.
9. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [online]. 2014; [cited 2015 Jul 07]. Available from: URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf.
10. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, มณฑล เลิศทวีปราช และจิโรจ ศศิประยัตน์. รูปแบบการติดต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อซัลโมเนลลาในไก่บ้านและไก่ฟาร์ม. ว สัตวแพทยสาร 2548; 56(1): 33-44.
11. Rao RN, Nagaraju V. Separation and determination of synthetic impurities of difloxacin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal 2004; 36(4): 729-35.
12. Naeem M, Khan K, Rafiq S. Determination of residues of quinolones in poultry products by high pressure liquid chromatography. J Appl Sci 2006; 6(2): 373-9.
13. Stoilova N, Petkova M. Developing and validation of method for detection of quinolone residues in poultry meat. Trakia J Sci 2010; 8(1): 64-9.
14. Zhao S, Jiang H, Li X, Mi T, Li C, Shen J. Simultaneous determination of trace levels of 10 quinolones in swine, chicken and shrimp muscle tissues using HPLC with programmable fluorescence detection. J Agric Food Chem 2007; 55(10): 3829-34.
15. Zhao SJ, Jiang HY, Ding SY, Li XL, Wang GQ, Li C, et al. A reliable LC method with fluorescence detection for quantification of (fluoro)quinolone residues in chicken muscle. J Chromatographia 2007; 65(9): 539-44.

16. van Vyncht G, Janosi A, Bordin G, Toussaint B, Maghuin-Rogister G, De Pauw E, et al. Multiresidue determination of (fluoro) quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2002; 952: 121-9.
17. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (พ.ศ. 2550) เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 124 ตอนพิเศษ 108 ง. (ลงวันที่ 4 กันยายน 2550).
18. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์. (ลงวันที่ 12 กรกฎาคม 2549).
19. Barbosa J, Barron D, Hermo MP, Navalon A, Ballesteros O. Determination and characterization of quinolones in foodstuffs of animal origin by CE-UV, LC-UV, LC-FL, LC-MS and LC-MS/MS. *Ovid Univ Ann Chem* 2009; 20(2): 165-79.
20. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
21. ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization; 2015.
22. Hassouan MK, Ballesteros O, Taoufiki J, Vilchez JL, Cabrera-Aguilera M, Navalon A. Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2007; 852: 625-30.
23. Wright DH, Herman VK, Konstantinides FN, Rotchafer JC. Determination of quinolone antibiotics in growth media by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1998; 709: 97-104.
24. Hassouan MK, Ballesteros O, Zafra A, Vilchez JL, Navalon A. Multiresidue method for simultaneous determination of quinolone antibacterials in pig kidney samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2007; 859(2): 282-8.
25. Su S, Chang M, Chang C, Chang P, Chou S. Simultaneous determination of quinolones in livestock and marine products by high performance liquid chromatography. *J Food Drug Anal* 2003; 11(2): 114-27.
26. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Union* 2010; L15: 1-72.
27. Veterinary drug maximum residue limits in the food of animal origin. *Bulletin of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China* 2002; 235: 12.
28. ไจพร พุ่มคำ. อาหาร (ไม่)ปลอดภัย ผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์. *ว อาหารและยา* 2555; 19(3): 8-11.
29. กรมประมง. ยาด้านจุลชีพ [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 7 ก.ค. 2558]; [12 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.fisheries.go.th/quality/ยาด้านจุลชีพ.pdf>.
30. สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. สารปฏิชีวนะตกค้าง: เอนโรฟลอกซาซิน (Enrofloxacin) [ออนไลน์]. [สืบค้น 7 ก.ค. 2558]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/enrofloxacin_2.pdf.
31. USFDA. Withdrawal of enrofloxacin for poultry [online]. 2005; [cited 2015 Jul 07]. Available from: URL <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/RecallsWithdrawals/ucm042004.htm>.

Development and Validation of Analysis Method for Determination of Quinolone Drug Residues in Meat by HPLC-FLD

Jirapa Unahalekhaka and Ladda Kaewklapanyacharoen

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

ABSTRACT Quinolone antibacterials are employed and allowed for treatment of infectious diseases in food-producing animals. Drug residues in edible tissues are resulted from improperly using. High levels of residues in food could cause side effects and drug resistances in human. Method for determination of 6 quinolones such as danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, flumequine and oxolinic acid by HPLC-FLD technique was developed and validated. These analytes were extracted with 0.3% metaphosphoric acid and acetonitrile at ratio 1:10 v/v, fat was removed by liquid-liquid extraction technique with hexane saturated with acetonitrile and then cleaned up by solid phase extraction with HLB C-18 cartridges. Afterwards, qualitative and quantitative analysis of these compounds was conducted by HPLC-FLD. As a result of method validation, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 5 and 10 µg/kg respectively. The linearity of working range was 10–100 µg/kg with coefficient of determination (R^2) more than 0.95. The accuracy expressed as mean of %recovery and the precision as HORRAT at concentration level 10, 50 and 100 µg/kg were 65.1–97.8% and 0.3–0.9 respectively. The matrix effect was tested by paired t-test and found that there was non-significant difference at level of confidence 95% ($\mu = 0.05$). Participation in proficiency testing program by interlaboratory comparison showed that $|Z|$ less than 2. The characteristics of this method were fit for intended use in testing laboratory for requirement of the notification of Ministry of Public Health (Vol.303) B.E.2550. Moreover, the survey of quinolone drug residues in 60 samples of chicken, pork and beef from 11 markets in Bangkok and Nonthaburi province was performed. It showed that 1 chicken sample was found oxolinic acid 29.59 µg/kg, and 2 samples were found enrofloxacin 16.1 and 16.9 µg/kg.

Key words: Quinolone, HPLC-FLD, edible animal tissues