

การพัฒนาวิธีของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

มัทนา บุญภักดี ประภาพร แยมบัติ รัตติยา สบู่ทอง ธารา ทิพมาน อภิษฐา สังข์ทอง

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ยืนยันชนิดและปริมาณของสารตกค้างกลุ่ม benzimidazoles จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ albendazole, febantel, fenbendazole, flubendazole, levamisole, mebendazole, oxfendazole และ thiabendazole ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยใช้ internal standard ชนิด deuterated หรือ isotope ที่จำเพาะสำหรับแต่ละสาร ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในปริมาณเท่ากันทุกตัวอย่างตั้งแต่เริ่มต้น ใช้ในการคำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง สารตกค้างจะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างโดยใช้ ethyl acetate และ ขจัดไขมันโดยใช้ hexane ในขั้นตอนสุดท้าย สารตกค้างที่เหลืออยู่จะถูกละลายด้วย methanol จากนั้นนำไปวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง 0.2% formic acid ในน้ำ กับ acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบอิเล็กโทรสเปร์ย์ (ESI+) โดยวิธีนี้มีความไวเพียงพอที่จะตรวจสอบสารกลุ่ม benzimidazoles ที่ระดับครึ่งหนึ่งของค่าสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์ซึ่งระบุปริมาณสารตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) สำหรับสารที่มีการกำหนดค่า MRL หรือค่า performance limit (PL) สำหรับสารที่ไม่มีการกำหนดค่า MRL และผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมการอาหารยุโรป 2002/657/EC

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ benzimidazoles กล้ามเนื้อสัตว์ปีก LC-MS/MS
กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์
กรมปศุสัตว์

Method Development of Benzimidazoles in poultry muscle by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Mathana Boonpakdee Prapaporn Yabdee Rattiya Saboothong Tara Tipman
Apichaya Sungthong

Abstract

This method was developed for qualitative and quantitative analysis of 8 analytes of benzimidazoles in poultry muscle including albendazole, febantel, fenbendazole, flubendazole, levamisole, mebendazole, oxfendazole and thiabendazole together with another 8 deuterated or isotope-labelled internal standards for each analyte. Internal standards were added equally for all samples in the analysis from the beginning of extraction to quantitate amounts of analyte in samples. Extraction solvents were mainly ethyl acetate which extract analytes from sample and then hexane to clear up fat. The final extract was dissolved in methanol and this solution was then introduced to LC-MS/MS. The HPLC column was octadecyl (C18) with gradient elution of 0.2% formic acid in distilled water and acetonitrile. Triple quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization in positive mode was chosen to monitor mass-per-charge (m/z) of precursor ion and product ions. This method met the criteria of European Commission 2002/657/EC and presented performance limit of the method for no permitted MRL compounds and was able to detect at least half of Maximum Residue Limit (MRL) for compounds with MRL permitted.

Keywords: method development, benzimidazoles, poultry muscle, LC-MS/MS

Veterinary public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of livestock Products,
Department of Livestock Development

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

มัทนา บุญภักดี ประภาพร แยมดี รัตติยา สุปุทอง ธารา ทิพมาน อภิษฐา สังข์ทอง

บทนำ

สารตกค้าง benzimidazoles จัดอยู่ในกลุ่ม anthelmintics เป็นยาถ่ายพยาธิ ที่ใช้ในการเลี้ยงปศุสัตว์ รวมถึงสัตว์ปีกด้วย เมื่อผู้บริโภคได้รับสารตกค้างของยาเหล่านี้ อาจเกิดอันตรายจากผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร อาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย หากได้รับยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน สามารถก่อให้เกิดภาวะตับอักเสบชนิด granulomatous hepatitis ผลต่อระบบเลือด/ระบบโลหิตอาจเกิดภาวะโลหิตจาง ผลต่อผิวหนัง อาจมีอาการผื่นคัน ลมพิษ ผลต่อระบบประสาท สามารถพบอาการอ่อนแรงและง่วงนอน อย่างไรก็ตามควรให้ความสำคัญกับการให้ความรู้ในการใช้ยาแก่เกษตรกร และให้อยู่ในการกำกับดูแลของสัตวแพทย์อย่างใกล้ชิดเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาสารตกค้างมาสู่ผู้บริโภค โดยกรมปศุสัตว์ได้ออกประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่องกำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์ซึ่งระบุปริมาณสารตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) ที่กำหนดให้พบได้ในสินค้าปศุสัตว์ สำหรับ flubendazole ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ levamisole ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549) สำหรับสหภาพยุโรป ซึ่งเป็นกลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าปศุสัตว์ไทยรายสำคัญ ได้กำหนดมาตรฐานสารตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ไว้เช่นกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับที่ระบุไว้ในประกาศกรมปศุสัตว์ (European Commission, 2009)

ดังนั้น งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ขึ้น เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจติดตาม และเฝ้าระวังสารตกค้างยาสัตว์กลุ่มนี้ได้ตามความต้องการของประเทศไทย และประเทศผู้นำเข้าเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการดัดแปลงวิธีมาจากวิธีของ De Ruyck และคณะ (2001)

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีกโดยเทคนิค LC-MS/MS

1.2 เพื่อให้มั่นใจได้ว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก และผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมการยุโรป 2002/657/EC

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 8 สาร และใช้ internal standard จำนวน 8 สาร รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารมาตรฐานและ internal standard กลุ่ม benzimidazoles ที่ใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ลำดับ	สารมาตรฐาน	Internal standard
1	albendazole	albendazole-D ₃
2	febantel	febantel-D ₆
3	fenbendazole	fenbendazole-D ₃
4	flubendazole	flubendazole-D ₃
5	levamisole	levamisole-D ₅
6	mebendazole	mebendazole-D ₃
7	oxfendazole	oxfendazole-D ₃
8	thiabendazole	thiabendazole- ¹³ C ₆

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่เหมาะสม

3.2 สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ไปใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมต่างๆ ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ควบคุมการทำงานด้วยโปรแกรม Analyst software ซึ่งประกอบด้วย

- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 20A ประกอบด้วย pump, degasser, autosampler, column oven และ controller

- Detector ประเภท Triple Quadrupole Mass Spectrometer ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น API 4000

4.1.2 เฟสคงที่ (HPLC column) ยี่ห้อ Phenomenex Luna C18 ขนาด 4.60 x 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร พร้อม Guard Column

4.2 สารเคมี

4.2.1 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ acetonitrile (ACN) และ methanol (MeOH)

4.2.2 สารเคมีเกรด AR ได้แก่ sodium hydroxide (NaOH), ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH), hexane, ethanol (EtOH), dimethyl sulphoxide (DMSO) และ formic acid

4.3 น้ำจัดไอออน (Deionized water หรือ น้ำ DI)

4.4 สารมาตรฐาน

4.4.1 สารมาตรฐานกลุ่ม benzimidazoles ได้แก่ albendazole (ความบริสุทธิ์ 99.00%), febantel (ความบริสุทธิ์ 99.00%), fenbendazole (ความบริสุทธิ์ 98.50%), flubendazole (ความบริสุทธิ์ 99.87%), levamisole hydrochloride (ความบริสุทธิ์ 99.00%), mebendazole (ความบริสุทธิ์ 99.70%), oxfendazole (ความบริสุทธิ์ 98.00%) และ thiabendazole (ความบริสุทธิ์ 98.89%) สารทุกตัวยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer

4.4.2 Internal standard เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ได้แก่ albendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.30%), febantel-D₆ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.80%), fenbendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.00%), flubendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.00%), levamisole hydrochloride-D₅ (ยี่ห้อ TRC; ความบริสุทธิ์ 98.00%), mebendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.00%), oxfendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.70%), และ thiabendazole-¹³C₆ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.00%)

4.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (stock solution) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมในตัวทำละลาย dimethyl sulphoxide และเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน (intermediate solution และ working solution) เตรียมโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานตั้งต้นให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ด้วยตัวทำละลาย ethanol โดยการเตรียมสารละลายทุกครั้งจะทำการเจือจางไม่เกิน 100 เท่าและนำสารละลายของแต่ละสารมาเตรียมดังนี้

4.5.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม กลุ่ม Benzimidazoles ได้แก่ Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Flubendazole, Levamisole, Mebendazole, Oxfendazole และ Thiabendazole ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5.2.2 แบ่งสารละลายมาตรฐานออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 : Levamisole และ Thiabendazole ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 : Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Flubendazole, Mebendazole และ Oxfendazole ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4.6 ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างกล้ำเนื้อไก่ปลอดสาร (blank sample) คือตัวอย่างกล้ำเนื้อไก่ที่ไม่พบสัญญาณในช่วง retention time ของสารกลุ่ม benzimidazoles ทั้งนี้ใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างกล้ำเนื้อสัตว์ปีก

4.7 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

4.7.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Applied Biosystems รุ่น API 4000 (DLD 5)

สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Applied Biosystems รุ่น API 4000 (DLD 5) มีรายละเอียดดังนี้

Column	: ยี่ห้อ Phenomenex Luna ชนิด C18 ขนาด 3 μ 150 x 4.60 mm.
Mobile Phase Line A	: 0.2 % Formic acid in H ₂ O
Mobile Phase Line B	: Acetonitrile
Flow rate	: 0.6 ml/min
Run time	: 15 min
Injection Volume	: 30 μ l

ตารางที่ 2 อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับอัตราส่วน A และ B

Time (min)	% A	% B
0.00	90	10
5.00	10	90
10.50	10	90
12.50	90	10
15.00	90	10

MS Parameters

Polarity	: Positive mode
Ion Source	: ESI
Temperature (TEM)	: 450
Collision Gas (CAD)	: 10
Curtain gas	: 20
Ion Spray voltage (IS)	: 5,500

4.7.2 วิธีสกัดในการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ำเนื้อสัตว์ปีกมีขั้นตอนดังนี้

4.7.2.1 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

เติมน้ำ DI ลงในตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เติม 0.1 N NaOH 5 มิลลิลิตร เติม Ethyl acetate 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าแนวนอน ความเร็วรอบ 150 rpm, เป็นเวลา 5 นาที นำไป Centrifuge ความเร็วรอบ 3000 rpm, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส ชั้นบนที่เป็น Ethyl acetate ใส่ลงในหลอด Centrifuge พลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Ethyl acetate

10 มิลลิลิตร ลงในหลอด Centrifuge พลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีตะกอนอยู่เฉยๆ ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าแนวนอน ความเร็วรอบ 150 rpm, เป็นเวลา 5 นาที นำไป Centrifuge ความเร็วรอบ 3000 rpm, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนที่เป็น Ethyl acetate ใส่ลงในหลอด Centrifuge พลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร (ซึ่งรวมกับสารที่ดูดได้ในครั้งแรก) นำไประเหยแห้งด้วย Nitrogen gas ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

4.7.2.2 ขั้นตอนการปรับปริมาตรของสารสกัด

เติม MeOH 1 มิลลิลิตร mix ด้วย vortex ประมาณ 1 นาที ดูดสารละลายที่ได้ใส่ Tube แก้ว ขนาด 15 มิลลิลิตร เติม Hexane 1 มิลลิลิตร mix ด้วย vortex ประมาณ 1 นาที ปิดฝา tube แก้วด้วย foil นำไป Centrifuge ความเร็วรอบ 3000 rpm, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้นของ Hexane (ชั้นบน) ทิ้ง แล้วกรองสาร MeOH (ชั้นล่าง) ผ่าน Syringe filter ซึ่งมีแผ่นกรองชนิด Nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

5. ผลการทดลอง

5.1 วิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก

หลังจากศึกษาข้อมูล เตรียมตัวอย่าง เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ ผู้วิเคราะห์ได้ดำเนินการพัฒนานิ่ววิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก ดังต่อไปนี้

5.1.1 พัฒนานิ่ววิเคราะห์ โดยอ้างอิงและพัฒนานิ่วการวิเคราะห์จากงานวิจัยเรื่อง

Determination of Flubendazole and its metabolites in eggs and Poultry muscle with Liquid chromatography - Tandem Mass Spectrometry (H. De Ruyck และคณะ, 2001)

5.1.2 ความสามารถต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ของ Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Flubendazole, Levamisole, Oxfendazole, Thiabendazole และ Mebendazole ได้แก่ 0.17, 0.15, 0.18, 3.48, 1.01, 0.13, 0.19 และ 1 µg/kg

5.1.3 แบ่งกลุ่มของ Working standard ที่ใช้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 : Levamisole และ Thiabendazole ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 : Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Flubendazole, Mebendazole และ Oxfendazole ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากพบว่าเมื่อเตรียมสารทั้ง 2 กลุ่มรวมกัน มีผลทำให้ค่า correlation coefficient ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ จึงทดลองทำการแยกกลุ่มของ working standard ออกเป็น 2 กลุ่ม ผลการทดลองพบว่าค่า correlation coefficient ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ($r \geq 0.995$) ของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมนทุกสาร

6.สรุปผลการทดลอง

การพัฒนานิ่ววิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS จากวิธีอ้างอิง โดยพัฒนาในเรื่องการแบ่งกลุ่มของสารมาตรฐานที่ใช้ ให้มีความเหมาะสมกับ HPLC column ที่ใช้งาน วิธีดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม Benzimidazoles ได้ 8 ชนิด ได้แก่ Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Flubendazole, Levamisole, Mebendazole, Oxfendazole และ Thiabendazole โดยใช้ Internal standard จำเพาะของแต่ละสาร วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถวิเคราะห์แยกชนิดและระบุปริมาณสารตกค้างกลุ่มดังกล่าวได้ และออกแบบดำเนินการตามแนวทางของ Commission Decision 2002/657/EC สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ได้

7. ข้อเสนอแนะ

วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในครั้งนี้ ยังไม่ครอบคลุม metabolites ของสารในกลุ่มนี้เนื่องจากสหภาพยุโรป กำหนด marker residues เป็นผลรวมของ metabolites และ parent compound ดังนั้นควรมีการพัฒนาวิธีเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารให้ครอบคลุม metabolites ของสาร

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์วรวิชัย วราอัศวปติ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานและบุคลากรของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์. 12 กรกฎาคม 2549.

H. De Ruyck, E.Daeseleire, K.Grijspeerd, H, De Ridder, R.Van Renterghem G.Huyghebaert. 2001. Determination of Flubendazole and its metabolites in eggs and Poultry muscle with Liquid chromatography - Tandem Mass Spectrometry.J.Agric.Food Chem., 49(2), PP610-617

European Commission. 2009. 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. Official Journal of the European Union L15:1-79.