# การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่มยาต้านการอักเสบ ชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

นางสาวมัฑณา วงษ์วิจารณ์ นางสาววนิตา ทองไพรวรรณ นางสาวจอมขวัญ ปิจดี นายปิยฉัตร ชมภูคำ
นางสาวพิชญา ไผทสิทธิ์ นางสาวนรยา ตั้งศิริทรัพย์

## บทคัดย่อ

ยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ เป็นยาที่ใช้เพื่อระงับปวดและลดการอักเสบที่สำคัญทางสัตวแพทย์ และเนื่องจากมีการห้ามใช้ยาบางชนิดในกลุ่มนี้ รวมถึงการไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้ยาดังกล่าวในสัตว์ปีกด้วย จึงทำให้การตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่มดังกล่าวในเนื้อที่ใช้สำหรับการบริโภคมีความสำคัญด้วยเช่นกัน วิธีนี้ได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ ประกอบด้วย 5 สาร ได้แก่ Flunixin Meloxicam Flufenamic acid Phenylbutazone และ Niflumic acid วิธีสกัด ใช้หลักการ Solid Phase Extraction (SPE) ชนิด C18 และ ascorbic acid ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เพื่อป้องกันการเกิด oxidation ของ pyrazolone ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างสาร phenylbutazone ในขณะเดียวกันที่ไม่เพิ่มความเข้มข้น เพราะจะมีผลต่อความไวของเครื่อง Mass Spectrometer ในการตรวจสารอื่นๆ สภาวะของระบบ LC-MS/MS มีเฟสคงที่ชนิด C18 ในการแยกสารก่อนเข้าเครื่องวิเคราะห์ตามหลักการ Mass Spectrometer และมีเฟสเคลื่อนเป็น ammonium acetate ผสมกับกรดอะซิติก ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ Commission Decision 2002/657/EC ซึ่งสามารถวิเคราะห์แยกชนิดและระบุปริมาณยาสัตว์ตกค้าง flunixin meloxicam flufenamic acid phenylbutazone และ niflumic acid ได้ ให้ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ $r > 0.995$ ของสาร Flunixin และ Meloxicam ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 10 ถึง 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสาร Flufenamic acid Phenylbutazone และ Niflumic acid ได้ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 5 ถึง 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมีช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน ของสาร Flunixin และ Meloxicam 10 ถึง 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสาร Flufenamic acid Phenylbutazone และ Niflumic acid 5 ถึง 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความแม่นและความเที่ยงของยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ ผ่านตามเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของ Commission Decision 2002/657/EC วิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้ในการตรวจตามแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ โดยตรวจยืนยันชนิดและปริมาณของสารตกค้างยาสัตว์ต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ในกล้ามเนื้อไก่ บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

**คำสำคัญ :** การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ NSAIDS กล้ามเนื้อสัตว์ LC-MS/MS

---

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

# Development of confirmatory method of NSAIDs in muscle by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Mattana Wongwijarn Wanita Thongpaiwan Jomkhwan Pidjadee Piyachat Chompookam
Pichaya Phataisit Naraya Tangsirisap

## Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs or NSAIDs are an important drug in veterinary medicine. It is widely used livestock which can lead to veterinary drug residues in product from food-producing animals. However, several drugs are prohibited to use, and these drugs are not authorized for poultry. Therefore, the ability of laboratory to detect these residues in edible muscle is also the key in food safety. The confirmatory method of NSAIDs in chicken muscle by LC-MS/MS was able to analyse 5 compounds including Flunixin Meloxicam Flufenamic acid Phenylbutazone and Niflumic acid based on C18 Solid Phase Extraction (SPE). Ascorbic acid 0.02 molar was used to prevent oxidation of pyrazolone which is a part of phenylbutazone molecular structure. Moreover, concentration of ascorbic acid was controlled due to decreasing sensitivity of mass spectrometer of other compounds. This method was also validated according to Commission Decision 2002/657/EC which can distinguish and quantify each compound in NSAIDs group. This method can detect the compounds including flunixin, meloxicam, flufenamic acid, phenylbutazone and niflumic acid in the range of 10-30 or 5-15 microgram per kilogram with correlation coefficient greater than 0.995. Precision and accuracy of the method were satisfied according to Commission Decision 2002/657/EC criteria. This research can be applied to national residue monitoring program of Department of Livestock Development for determination and quantitatively confirmation of NSAIDs in chicken muscle, which fulfils the objective of this experiment.

**Keywords:** Method development Method Validation NSAIDs muscle LC-MS/MS

---

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products

# การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่มยาต้านการอักเสบ ชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

นางสาวมัฑณา วงษ์วิจารณ์ นางสาววนิตา ทองไพรวรรณ นางสาวจอมขวัญ ปิจดี นายปิยฉัตร ชมภูคำ
นางสาวพิชญา ไผทสิทธิ์ นางสาวนรยา ตั้งศิริทรัพย์

## บทนำ

ยาที่ใช้เพื่อระงับปวดและลดการอักเสบที่สำคัญทางสัตวแพทย์ประกอบด้วยกลุ่มยาหลายชนิด โดยหนึ่งในนั้นได้แก่ยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ หรือ Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (ศิรินทร, 2550) และเป็นกลุ่มยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในทางปศุสัตว์ งานวิจัยพบว่าสัตวแพทย์ในประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวนถึง 60% ใช้ยาในกลุ่มนี้มากกว่า 1 ครั้งต่อสัปดาห์ (Smith et al., 2008) โดยมีการใช้ยาต้านอักเสบในกลุ่มนี้อย่างแพร่หลายในโค ทั้งโคเนื้อและโคนม และในสุกร ซึ่งยาดังกล่าวนั้น ถูกเลือกใช้เพื่อรักษาในกรณีที่สัตว์เป็นไข้ ใช้ในการลดปวด และใช้ในการลดการอักเสบ เช่นในกรณีเต้านมอักเสบ อย่างไรก็ตาม แม้ว่ายาต้านการอักเสบจะมีประสิทธิภาพดีในการรักษา แต่ก็มีผลข้างเคียงของยาด้วยเช่นกัน โดยมีผลต่อระบบกระเพาะและลำไส้ ระบบเลือด และมีผลต่อไต (Van Pamel and Daeseleire, 2015) สำหรับในสัตว์ปีก ถึงแม้ว่าจะไม่ได้มีการใช้ยาในกลุ่มนี้เหมือนกับปศุสัตว์ชนิดอื่น แต่เนื่องจากทางสหภาพยุโรปไม่อนุญาตให้ใช้ยากลุ่มนี้ในสัตว์ปีก ตามข้อกำหนด European Commission Regulation 37/2010 และสัตว์ปีกเป็นสินค้าส่งออกสำคัญของประเทศไทยไปยังประเทศคู่ค้าอื่นๆ ซึ่งสหภาพยุโรปได้กำหนดว่าประเทศที่จะส่งสินค้าปศุสัตว์ไปยังสหภาพยุโรป จะต้องมีแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีที่ผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมาธิการยุโรป ตามข้อกำหนด Council Directive 96/23/EC (European Commission, 1996) โดยรวมถึงสารตกค้างของยากลุ่ม NSAIDs (กลุ่ม B2e) ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีกด้วย ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับข้อกำหนดของประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Food and Drug Administration, Center of Veterinary Medicines ซึ่งห้ามใช้ยาบางชนิดในกลุ่มนี้สำหรับสัตว์ที่เลี้ยงไว้เพื่อการบริโภคเช่นกัน

สำหรับประเทศไทย ตามประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การกำหนดโรคหรือลักษณะของสัตว์หรือเนื้อสัตว์ที่ไม่เหมาะสมที่จะใช้เนื้อสัตว์นั้นเป็นอาหารตามพระราชบัญญัติควบคุมการฆ่าสัตว์เพื่อการจำหน่ายเนื้อสัตว์ พ.ศ. 2559 กำหนดให้สัตว์หรือเนื้อสัตว์ที่มีสารตกค้าง หรือสงสัยว่ามีสารตกค้าง ซึ่งรวมถึงสารพิษตกค้างที่มีปริมาณเกินกว่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่กำหนดตามกฎหมายว่าด้วยมาตรฐานสินค้าเกษตร ให้ถือว่าไม่เหมาะสมที่จะใช้เนื้อสัตว์นั้นเป็นอาหาร (กรมปศุสัตว์, 2560) รวมถึงยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ด้วย

จากการศึกษาเอกสารทางวิชาการ พบว่าการวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ในกล้ามเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่นิยมเลือกใช้เทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ในการวิเคราะห์ยืนยันชนิดและปริมาณสาร แต่มีความหลากหลายในเรื่องเทคนิคการเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนการสกัด เช่น Van Pamel and Daeseleire (2015)

ได้นำเสนอการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ sodium sulfate ($Na_2SO_4$) และ acetronitrile (ACN) และผ่านการสกัดโดยไม่มีการใช้ Solid Phase Extraction (SPE) ซึ่งวิธีดังกล่าวมีความรวดเร็วและง่ายต่อการทำงาน และสามารถวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ได้ 15 ชนิด ในตัวอย่างกล้ามเนื้อโคและนม นอกจากนั้น Jedziniak et al. (2016) ได้เลือกใช้เทคนิค LC-MS/MS ในการวิเคราะห์เช่นกัน โดยทำการพัฒนาวิเคราะห์การตรวจสารตกค้างยาสัตว์ กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ พร้อมทั้ง Glucocorticosteroids ในกล้ามเนื้อสัตว์ และทำการสกัดด้วย acetate buffer (sodium acetate และ ascorbic acid) และมีการใช้ขั้นตอน enzyme hydrolysis ด้วย $\beta$-glucoronidase ในการสกัดด้วย ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ที่กล่าวถึงได้จำนวน 16 ชนิด นอกจากนี้ ทางห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านสารตกค้างยาสัตว์แห่งสหภาพยุโรป ได้นำเสนอขั้นตอนการสกัดสารตกค้างกลุ่มนี้เช่นกัน โดยมีการใช้เอนไซม์ hydrolysis ด้วย $\beta$-glucoronidase การสกัดด้วย buffer ร่วมกับการใช้ SPE ในการทำให้ตัวอย่างสะอาดขึ้น (clean up)

ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างยาสัตว์ กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีกโดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อรองรับการทำงานด้านสารตกค้างยาสัตว์ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์กรมปศุสัตว์ โดยจากการทดลองเบื้องต้น ผู้วิจัยได้เลือกใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ในการตรวจยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างยาสัตว์กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ในกล้ามเนื้อสัตว์ และขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการสกัดได้ทำการดัดแปลงมาจากวิธีของห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านสารตกค้างยาสัตว์แห่งสหภาพยุโรป (Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, 2016) เนื่องจากเป็นวิธีที่ครอบคลุมขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่หลากหลาย และมีการเลือกใช้ SPE ในการเตรียมตัวอย่าง จึงทำให้ตัวอย่างที่จะนำเข้าไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สะอาดมากยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นการบำรุงรักษาเครื่อง LC-MS/MS อีกด้วย และการศึกษาในครั้งนี้วางแผนวิเคราะห์ยาในกลุ่มนี้จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ flunixin, meloxicam, flufenamic acid, niflumic acid และ phenylbutazone เพื่อเป็นตัวแทนในการตรวจสารตกค้างยาสัตว์ NSAIDs ซึ่งการพัฒนาและการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีนี้ จะส่งผลดีต่อการคุ้มครองผู้บริโภคภายในประเทศ และช่วยในการสนับสนุนการส่งออกเนื้อสัตว์ปีกหรือการส่งออกเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ ในอนาคตต่อไป

**1. วัตถุประสงค์**

1.1 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

1.2 เพื่อให้มั่นใจได้ว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างสารตกค้างยาสัตว์กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS และผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC

**2. ขอบข่าย**

พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 5 สาร รายละเอียดดังนี้

| ลำดับ | สารมาตรฐาน (Standard) | Internal standard |
|---|---|---|
| 1 | Flunixin | Flunixin-$D_3$ |
| 2 | Meloxicam | Meloxicam-$D_3$ |
| 3 | Flufenamic acid | Flufenamic acid-$^{13}C_6$ |
| 4 | Phenylbutazone | Phenylbutazone-$^{13}C_{12}$ |
| 5 | Niflumic acid | Niflumic acid-$^{13}C_6$ |

**3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

3.1 ได้วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

3.2 สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ไปใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมต่างๆ ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

**4. วิธีดำเนินการ**

4.1 ศึกษาข้อมูลในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่

4.2 จัดเตรียมตัวอย่าง สารเคมี สารมาตรฐาน วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็น

4.3 ดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.3.1 ศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารตกค้างกลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) จากตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่จากต่างแหล่งที่มา

4.3.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น 8050 (DLD 8)

4.4 ประมวลผล สรุป และจัดทำรูปเล่ม

**5. ผลการทดลอง**

5.1. ผลการศึกษาข้อมูลในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่

ผู้วิเคราะห์ได้ศึกษาข้อมูลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่ โดยอ้างอิงและพัฒนาวิธีการวิเคระห์จากวิธีวิเคราะห์เดิมที่มีอยู่แล้ว จากวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการอ้างอิงแห่งสหภาพยุโรป และจากงานวิจัยเรื่อง Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using QuEChERS and liquid chromatography

coupled to mass spectrometry: triple quadrupole versus Q-Orbitrap mass analyzer (Rubies et al. 2016)

5.2 ได้จัดเตรียมตัวอย่าง สารเคมี สารมาตรฐาน วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็น ดังนี้

5.2.1 สารเคมี

1. สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) และ formic acid

2. สารเคมีเกรด AR หรือ reagent ได้แก่ acetic acid, Bovine albumin serum 98%, hydrochloric acid (HCl) 37%, diethyl ether, L-ascorbic acid, n-Hexane, potassium hydroxide (KOH), sodium acetate anhydrous และ ammonium acetate

3. เอนไซม์ beta-glucuronidase/aryl sulfatase จาก Helix pomatia

4. น้ำขจัดไอออน (Deionized water หรือ น้ำ DI)

5.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่อง LC-MS/MS ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่

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

-Detector ประเภท Triple Quadrupole Mass Spectrometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8050

2. HPLC column ยี่ห้อ Agilent ชนิด Zorbax SB-C18 ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 3.5 ไมโครเมตร

3. SPE ชนิด C18 ยี่ห้อ Vertical ขนาดบรรจุ 3 มิลลิลิตร น้ำหนักเฟสของแข็ง 500 มิลลิกรัม

5.3 ผลการดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม ยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ในกล้ามเนื้อไก่

5.3.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น 8050 (DLD 8) มีรายละเอียดดังนี้

Column : ยี่ห้อ Agilent ชนิด ZORBAX SB-C18 ขนาด 3 µm 150 x 4.60 mm.

Mobile Phase Line A : 5 mM Ammonium acetate in $H_2O$ + 0.05 % Acetic acid

Mobile Phase Line B : Mobile phase A: Acetonitrile (0.5:99.5)

Flow rate : 0.6 ml/min

Run time : 12 min

Injection Volume : 10 µl

| **ช่วงเวลา (นาที)** | **อัตราส่วนสารละลายผสม ขวด A (ร้อยละ)** | **อัตราส่วนสารละลายผสม ขวด B (ร้อยละ)** |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 1.5 | 95 | 5 |
| 5 | 45 | 55 |

| | | |
|---|---|---|
| 6 | 5 | 95 |
| 9 | 5 | 95 |
| 9.5 | 95 | 5 |

**MS Parameters**

Polarity : Negative mode
Ion Source : ESI
Nebulizing gas : 3 litre per minute
Heating gas : 10 litre per minute
Drying gas : 10 litre per minute
Interface temp. : 300 °C
DL temp. : 250 °C
Heat block temp. : 400 °C

5.3.2 วิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม NSAIDs ในกล้ามเนื้อสัตว์
หลังจากศึกษาข้อมูล เตรียมตัวอย่าง เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ ผู้วิเคราะห์ได้ดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม NSAIDs ในกล้ามเนื้อสัตว์ ดังต่อไปนี้

- เพิ่มจำนวนสารตกค้างกลุ่ม NSAIDs Benzimidazoles ที่สามารถวิเคราะห์ได้ให้มีจำนวนมากขึ้น ซึ่งปัจจุบันสามารถวิเคราะห์ได้ 5 สาร
- พัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้เหมาะสมเพื่อเปลี่ยนเครื่อง LC-MS/MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นรุ่นใหม่

5.4 วิธีสกัดในการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม NSAIDs ในกล้ามเนื้อสัตว์มีขั้นตอนดังนี้

5.4.1 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

- ชั่งน้ำหนัก 2 กรัม ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร
- เติมสารละลายมาตรฐาน flunixin และ meloxicam ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ flufenamic acid, phenylbutazone และ niflumic acid ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ internal standard รวม 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
- เติม sodium acetate buffer ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 5
- เติมเอนไซม์ glucuronidase ที่ผ่านการเจือจางด้วย bovine serum albumin
- บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ 2

- เติม ACN ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ sodium acetate buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- เทส่วนใสลงในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ เติม ACN และ sodium acetate buffer และนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง
- นำส่วนใสมารวมกันแล้วเติม n-Hexane นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำสองรอบ
- ดูดของเหลวส่วนบนที่เป็นส่วนของ n-Hexane ทิ้ง แล้วนำส่วนที่เหลือไประเหยด้วยแก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้เหลือปริมาตร 9 มิลลิลิตร
- เติม ascorbic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างไปสกัดด้วย Solid Phase Extraction (SPE) ชนิด C18
- ชะสารตกค้างออกจาก SPE ด้วยสารละลายผสมระหว่าง hexane และ diethyl ether อัตราส่วนโดยปริมาตร 1 ต่อ 1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายผสมระหว่าง ACN และ MeOH อัตราส่วนโดยปริมาตร 9 ต่อ 1 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร
- เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาสเซลเซียส
- เติมสารละลายผสมระหว่าง ACN และ MeOH อัตราส่วนโดยปริมาตร 9 ต่อ 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปกรองก่อนบรรจุลงใน HPLC vial สีชา ชนิดที่มี insert เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ต่อไป

**6. สรุปผลการทดลอง**

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม NSAIDs ในกล้ามเนื้อไก่ จากวิธีอ้างอิง โดยพัฒนาในเรื่อง mobile phase ให้มีความเหมาะสมกับ HPLC column ที่ใช้งานโดยใช้ สารผสมระหว่างสารละลาย acetic acid ร้อยละ 0.05 และสารละลาย ammonium acetate ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายน้ำ และสาร ACN และใช้ปริมาณสาร n-Hexane 10 มิลลิลิตร และ ascorbic acid ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ในขั้นตอนการสกัด เพื่อกำจัดไขมันออกจากสารละลายและเพิ่มความไวของวิธีวิเคราะห์ วิธีดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม NSAIDs ได้ 5 ชนิด ได้แก่ flunixin, meloxicam, flufenamic acid, phenylbutazone และ niflumic acid โดยใช้ internal standard จำเพาะของแต่ละสาร ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ อยู่ที่ระดับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมสำหรับ flunixin และ meloxicam และ 5ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ flufenamic acid, phenylbutazone และ niflumic acid และวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวได้ผ่านการยืนยันประสิทธิภาพโดยการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Decision 2002/657/EC สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมานี้ สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตามแผนสารตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ โดยตรวจยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างกลุ่ม NSAIDs ในกล้ามเนื้อไก่ได้ ซึ่งเป็นภารกิจหลักในการสนับสนุนด้านความปลอดภัยอาหารในการส่งออกเนื้อไก่ต่อไปยังสหภาพยุโรปและประเทศคู่ค้าอื่นได้ ซึ่งบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

**7. ข้อเสนอแนะ**

ผู้วิจัยเสนอว่าในอนาคตควรศึกษาความเสถียรของสารกลุ่ม NSAIDs 5 ชนิด ได้แก่ flunixin, meloxicam, flufenamic acid, phenylbutazone และ niflumic acid เพิ่มเติมในสารละลาย ในตัวอย่างเติมสาร (spiked sample) และตัวอย่างกล้ามเนื้อสัตว์ที่ตรวจพบสารตกค้างกลุ่มนี้ และควรพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของสารตกค้างกลุ่มนี้ในกล้ามเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น โค สุกร และด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ LC-MS/MS เครื่องอื่นๆ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง

**8. กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิงพัชรี ทองคำคูณ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

**9. เอกสารอ้างอิง**

กรมปศุสัตว์. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การกำหนดโรคหรือลักษณะของสัตว์หรือเนื้อสัตว์ที่ไม่เหมาะสมที่จะใช้เนื้อสัตว์นั้นเป็นอาหารตามพระราชบัญญัติควบคุมการฆ่าสัตว์เพื่อการจำหน่ายเนื้อสัตว์ พ.ศ. 2559. 30 มิถุนายน 2560.

ศิรินทร หยิบโชคอนันต์. 2550. ยาระงับปวดและบรรเทาการอักเสบในสัตว์ พิมพ์ครั้งที่ 2 (ฉบับปรับปรุงใหม่). ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผล และวิธีคัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. ปทุมธานี.

Corley, J. 2003. Best Practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. John Wiley & Sons, New York.

European Commission. 1996. Council Directive 96/23/EC of 23 May 1996: laying down analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animals and animal products (Revision of Commission Decision 93/256/EC). **Official Journal of the European Community**. L125, 10-32.

European Commission. 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). **Official Journal of the European Communities** L221/8.

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** L15:1-72.

European Medicines Agency and European Food Safety Authority. 2013. Joint Statement of EMA and EFSA on the presence of residues of phenylbutazone in horse meat. Parma, Italy.

Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL). 2016. European Reference Laboratory for Residues. NSAIDs in fresh and lyophilized milk from bovine with LC-MS/MS; NSAI_007. Berlin, Germany.

Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T., Pietruk, K., Sledzinska, E., and Zmudzki, J. 2012. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** 403:2955-2963.

Jedziniak, P., Olejnik, M., Pietruk, K., Protasiuk, E., Szprengier-Juszkiewicz, T., and Zmudzki, J. 2016. Simultaneous determination of residues of non-steroidal anti-inflammatory drugs and glucocorticosteroids in animal muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Food Analytical Methods, 9:1837-1848.

Reddersen K, Heberer T (2003) Short communication. Formation of an artifact of diclofenac during acidic extraction of environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, 1011:221–226

Rubies, A., Guo, L., Centrich, F., and Granados, M. 2016. Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry: triple quadrupole versus Q-Orbitrap mass analyzer, **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** 408(21):5769-5778.

Smith, G. W., Davis, J. L., Tell, L. A., Webb, A. I., and Riviere, J. E. 2008. Extralabel use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cattle, **FARAD Digest: Journal of the American Veterinary Medical Association,** 232(5):697-700.

United States Department of Agriculture. 2005. National Residue Program Data – "Red Book". Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture.

Van Pamel, E. and Daeseleire, E. 2015. A multiresidue liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the detection and quantitation of 15 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in bovine meat and milk, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 407:4485-4494.