การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method (MRM) ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS

ปิยฉัตร ชมภูคำ สมใจ ปากดี ธารา ทิพมาน จอมขวัญ ปิจดี พาคร ทรงพระ ภัทรมน สวนอินทร์
ปุษยาพร สวัสดิสรรพ์ นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้เป็นวิธีคัดกรอง (Screening method) ของสารตกค้างยาสัตว์ Multi - Class Residue Method (MRM) จำนวน 12 กลุ่มสาร ได้แก่ Amphenicols, Benzimidazoles, Beta-lactams, Beta-agonists, Carbadox and Olaquindox metabolites, Corticosteroid, Macrolides and Lincosamides, Sulphonamides, Trimethoprim and Dapsone, Nitroimidazoles, Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, Quinolones and Fluoroquinolones และ Tetracyclines ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS สารตกค้างจะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก โดยใช้สารละลาย acetonitrile : DI water (4 : 1) และนำสารละลายที่สกัดได้ มากำจัดสิ่งสกปรก (interferes) ที่อาจรบกวนผลการวิเคราะห์ โดยใช้ bulk packing C18 และกำจัดไขมันด้วย hexane จากนั้นนำไประเหยจนแห้ง โดยใช้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45°C ละลายสารตกค้างที่เหลืออยู่ด้วยสารละลาย 0.1% formic acid ในน้ำ กรองสารละลายโดยใช้ syringe membrane filter ชนิด PVDF ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง 0.1% formic acid ในน้ำ กับ 0.1% formic acid ใน acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบอิเล็กโทรสเปรย์ (ESI+)

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Multi-Class Residue Method เนื้อสัตว์ปีก LC-MS/MS

งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์
สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development of Screening Method for Multi-Class Residue Method (MRM) in Poultry Muscle with LC-MS/MS

Piyachat Chompookam Somjai Pakdee Tara Tipman Jomkhwan Pidjadee
Pakorn Songpra Pattaramon Suan-in Pusayaporn Swasdison Naraya Tangsirisap

Abstract

Screening method for analyzing 12 groups of veterinary drug residues, which are Amphenicols, Benzimidazoles, Beta-lactams, Beta-agonists, Carbadox and Olaquindox metabolites, Corticosteroid, Macrolides and Lincosamides, Sulphonamides, Trimethoprim and Dapsone, Nitroimidazoles, Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, Quinolones and Fluoroquinolones and Tetracyclines, in poultry muscle with LC-MS/MS was developed. The residues were extracted from poultry muscle by using acetonitrile : DI water (4 : 1). Then, the extracted was clean-up by using bulk packing C18 and remove fat by using hexane. The extracted was evaporated to dryness using a mild stream of nitrogen gas at 45°C. The residue was reconstituted in the mixture of 0.1% formic acid in water. The extracted solution was filtered by using a 0.45 µm PVDF syringe membrane filter. The high-performance liquid chromatography (HPLC) separation was performed on a C18 HPLC column with gradient mobile phase of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile. The triple quadrupole mass spectrometer (MS/MS) technique was used to identify and quantify analytes using mass per charge (m/z) in electrospray positive ionization mode (ESI+)

Keywords: method development, Multi-Class Residue Method, Poultry Muscle, LC-MS/MS

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Veterinary Drug and Hormone Residue Analysis Laboratory, Department of Livestock Development

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method (MRM) ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS

ปิยฉัตร ชมภูคำ สมใจ ปากดี ธารา ทิพมาน จอมขวัญ ปิจดี พาคร ทรงพระ ภัทรมน สวนอินทร์ ปุษยาพร สวัสดิสรรพ์ นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทนำ

ในปัจจุบันการพัฒนาและการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ การทำปศุสัตว์เพื่อผลิตเป็นอาหารสำหรับมนุษย์บริโภคมีเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าปัญหาโรคติดเชื้อในสัตว์ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ยังไม่สามารถควบคุมได้ทั้งหมด ดังนั้นการใช้ยาเพื่อรักษาโรคในสัตว์ยังคงมีความจำเป็นต่อเนื่อง และเกิดปัญหาการตกค้างของยาในเนื้อสัตว์ที่ใช้บริโภค ซึ่งถ้าหากผู้บริโภคได้รับสารตกค้างอยู่เป็นประจำหรือได้รับอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานๆ อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ ดังนั้นผู้บริโภคในปัจจุบันจึงตระหนักถึงความปลอดภัยทางด้านสารตกค้างยาสัตว์ในสินค้าปศุสัตว์มากขึ้น อีกทั้งประเทศผู้นำเข้าสินค้าปศุสัตว์มีมาตรการในการตรวจสอบสารตกค้างในสินค้าอย่างเข้มงวด และมีการกำหนดมาตรฐานสารตกค้างยาสัตว์ ทั้งชนิดที่ห้ามไม่ให้มีสารตกค้าง (Zero tolerance) และชนิดที่ยอมให้ใช้และมีสารตกค้างได้ แต่ต้องไม่เกินค่าที่กำหนด (Maximum Residue Limit; MRL) เช่น มาตรฐานของ CODEX และมาตรฐานของสหภาพยุโรป ซึ่งเป็นมาตรฐานสากล

ทางกรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการทำแผนการตรวจสอบสารตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ โดยอ้างอิงตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป Council Directive 96/23/EC ซึ่งแบ่งประเภทของสารตกค้างเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A หมายถึง สารกลุ่มที่มีผลต่อกระบวนการทำงานของร่างกายของผู้บริโภค (Anabolic effect) และสารที่ห้ามใช้ในการผลิตปศุสัตว์ (Unauthorized substances) แบ่งเป็น 6 ประเภท กำหนดไม่ให้มีการตกค้างเลย (Zero tolerance) เช่น Beta-agonists, Amphenicols และ Nitroimidazoles และกลุ่ม B เป็นสารประเภทยาสัตว์และสารที่อาจปนเปื้อนในกระบวนการผลิตปศุสัตว์ อนุญาตให้พบการ

ตกค้างได้ แต่ต้องไม่เกินค่าที่กำหนดไว้สูงสุด หรือค่า MRL (Maximum Residue Limit) เช่น Sulphonamides, Beta-lactams, Quinolones และ Tetracyclines

งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ซึ่งมีหน้าที่รับผิดชอบตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมนในเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Multi-Class Residue Method (MRM) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Multi-Class Residue Method (MRM) ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS เพื่อใช้เป็นวิธีการคัดกรองสารตกค้างกลุ่ม Multi-Class Residue Method (MRM) และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจติดตาม และเฝ้าระวังสารตกค้างยาสัตว์กลุ่มนี้ได้ตามความต้องการของประเทศไทยและประเทศผู้นำเข้าเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการดัดแปลงวิธีมาจากวิธี Screening and Confirmation of Animal Drug Residues by UHPLC-MS-MS (United States Department of Agriculture, 2018)

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method (MRM) ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS สำหรับใช้เป็นวิธีคัดกรอง (Screening method) สารตกค้างยาสัตว์หลายกลุ่มสารในคราวเดียวกัน

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method ในเนื้อสัตว์ปีก (ใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน) โดยเทคนิค LC-MS/MS จำนวนไม่น้อยกว่า 10 กลุ่มสาร รายละเอียดดังนี้

No.	Group	Internal standard
1	Sulphonamides, Trimethoprim and Dapsone	Sulfamethoxypyridazine-D_3
2	Macrolides and Lincosamides	Roxithromycin (IS)
3	Quinolone and Fluorquinolones	Sarafloxacin-D_8
4	Tetracyclines	Demechlocycline
5	Benzimidazoles	Flubendazole-D_3
6	Carbadox and Olaquindox metabolites	Quinoxaline-2-Carboxylic acid (QCA)-D_4

No.	Group	Internal standard
7	Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs	Sulfamethoxypyridazine-D_3
8	Corticosteroids	Sulfamethoxypyridazine-D_3
9	Amphenicols	Chloramchenocols-D_5
10	Beta-lactams	Sulfadimethoxine-D_6
11	Beta-agonists	Sulbutamol-D_3
12	Nitroimidazoles	Sulfamethoxypyridazine-D_3

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method (MRM) ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ได้ไม่น้อยกว่า 10 กลุ่มสารที่ระดับความเข้มข้น ½ MRL หรือ 1 MRL

4. วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ MRM ในเนื้อสัตว์ปีก

2. จัดเตรียมตัวอย่าง สารเคมี สารมาตรฐาน วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็น

3. ดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

3.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060

3.2 ทดลองสกัดสารตกค้างยาสัตว์ MRM ในเนื้อไก่ ตามวิธีอ้างอิงที่เลือกมา และปรับเปลี่ยนวิธีสกัดให้เหมาะสมผ่านเกณฑ์การยอมรับ

4. ประมวลผล สรุป และจัดทำรูปเล่ม

5. ผลการทดลอง

5.1 สามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method ในเนื้อสัตว์ปีก (ใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน) โดยเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 12 กลุ่มสาร ได้แก่ Amphenicols, Benzimidazoles, Beta-lactams, Beta-agonists, Carbadox and Olaquindox metabolites, Corticosteroid, Macrolides and Lincosamides, Sulphonamides, Trimethoprim and Dapsone, Nitroimidazoles, Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, Quinolones and Fluoroquinolones และ Tetracyclines

5.2 วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method (MRM) ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS มีขั้นตอนดังนี้

สารตกค้างจะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก โดยใช้สารละลาย acetonitrile : DI water (4 : 1) และนำสารละลายที่สกัดได้ มากำจัดสิ่งสกปรก (interferes) ที่อาจรบกวนผลการวิเคราะห์ โดยใช้ bulk packing C18 และกำจัดไขมันด้วย hexane จากนั้นนำไประเหยจนแห้ง โดยใช้แก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 45°C ละลายสารตกค้างที่เหลืออยู่ด้วยสารละลาย 0.1% formic acid ในน้ำ กรองสารละลายโดยใช้ syringe membrane filter ชนิด PVDF ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง 0.1% formic acid ในน้ำ กับ 0.1% formic acid ใน acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบอิเล็กโทรสเปรย์ (ESI+)

5.3 เครื่อง LC-MS/MS ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น Nexera X2 30A และ detector ประเภท Triple Quadrupole Mass Spectrometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060

5.4 HPLC Column ที่ใช้ ได้แก่ ยี่ห้อ Shimadzu Shim-pack HR-ODS 3 µm, 3.0 x 150 mm

5.5 สภาวะของเครื่อง HPLC และอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (ตารางที่ 1) มีดังนี้

Mobile phase A : 0.1% formic acid in water (H_2O)

Mobile phase B : 0.1% formic acid in acetonitrile (ACN)

Flow rate : 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

Run time : 15 นาที

Injection volume : 5 ไมโครลิตร

Column oven temperature : 40 องศาเซลเซียส

Auto Sampler temperature : 15 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

ช่วงเวลา (นาที)	Mobile phase A (ร้อยละ)	Mobile phase B (ร้อยละ)
0	95	5
8	5	95
11.5	5	95
11.6	95	5
15	95	5

5.6 เทคนิค LC-MS/MS เป็นเทคนิคที่ทำการวัดไอออนตั้งต้น (precursor ion; ได้ identification point (IP) 1 คะแนน) และไอออนผลผลิต (product ion) 2 ไอออน (ได้ IP 1.5 คะแนน ต่อ ไอออน) คือ ไอออนที่แตกตัวแล้วให้ความเข้มสูงสุด (primary ion) และไอออนที่แตกตัวให้ความเข้มรองลงไป ซึ่งให้ความเข้มน้อยกว่า (secondary ion) รวมได้คะแนน IP 4 คะแนน ผ่านตามเกณฑ์ของแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/808/EC สภาวะเครื่อง MS/MS, retention time, precursor ion และ product ion (ตารางที่ 2) มีดังนี้

MS Parameters ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

Polarity : Positive MRM, Negative MRM

Ion Source : ESI

Nebulizing gas flow : 3 ลิตรต่อนาที

Drying gas flow : 10 ลิตรต่อนาที

Interface temp. : 300 องศาเซลเซียส

DL temp. : 250 องศาเซลเซียส

Heat block temp. : 400 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 Retention time, precursor ion, product ion และ Signal-to-noise ratio ของสารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method (MRM)

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
1	Sulfaguanidine	50.00	3.56±0.1	215.20	156.20	108.25	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	7.26
2	Sulfisomidine	25.00	4.68±0.1	279.20	124.30	186.20	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	89.36
3	Sufacetamide	25.00	5.28±0.1	215.20	156.25	108.25	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	6.41
4	Sulfadiazine	25.00	5.47±0.1	251.20	156.15	108.20	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	162.10
5	Sulfathiazole	25.00	5.43±0.1	256.15	156.20	108.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	35.74
6	Sulfapyridine	25.00	5.60±0.1	250.20	156.25	108.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	30.04
7	Sulfamerazine	25.00	5.82±0.1	265.20	156.25	108.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	97.20
8	Sulfamoxole	25.00	5.77±0.1	268.20	92.30	156.25	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	106.16
9	Sulfamethizole	25.00	5.94±0.1	271.15	156.25	108.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	90.48

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
10	Sulfamethoxypyridazine	25.00	6.00±0.1	281.15	156.25	108.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	103.94
11	Sulfamethazine	25.00	6.08±0.1	279.15	186.20	156.25	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	141.85
12	Sulfameter	25.00	6.12±0.1	281.10	92.30	156.25	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	76.25
13	Sulfamonomethoxine	25.00	6.30±0.1	281.15	156.25	108.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	64.53
14	Sulfachloropyridazine	25.00	6.50±0.1	285.10	156.25	108.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	96.31
15	Sulfadoxine	25.00	6.64±0.1	311.15	156.20	108.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	136.64
16	Sulfamethoxazole	25.00	6.65±0.1	254.15	156.20	108.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	133.37
17	Sulfisoxazole	25.00	6.78±0.1	268.20	156.25	108.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	73.30

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
18	Sulfabenzamide	25.00	7.06±0.1	277.15	156.20	108.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	169.88
19	Sulfaquinoxaline	25.00	7.07±0.1	301.15	156.20	108.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	71.80
20	Sulfadimethoxine	25.00	7.09±0.1	311.15	156.20	108.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	125.61
21	Josamycin	25.00	5.98±0.1	828.55	109.15	174.30	Demechlocycline	4.92±0.1	465.10>154.20	376.28
22	Tylosin A	25.00	5.58±0.1	916.55	174.30	101.25	Demechlocycline	4.92±0.1	465.10>154.20	331.54
23	Erythromycin A	50.00	5.48±0.1	734.50	158.30	576.65	Roxithromycin (IS)	5.77±0.1	837.50>679.50	668.79
24	Gamithromycin	50.00	4.84±0.1	778.50	158.35	620.55	Roxithromycin (IS)	5.77±0.1	837.50>679.50	1094.63
25	Rifampicin	100.00	6.71±0.1	823.40	791.40	151.30	Roxithromycin (IS)	5.77±0.1	837.50>679.50	635.22

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
26	Spiramycin	50.00	4.73±0.1	843.45	174.30	540.35	Demechlocycline	4.92±0.1	465.10>154.20	47.35
27	Tilmicosin	12.50	4.99±0.1	869.65	174.30	696.50	Roxithromycin (IS)	5.77±0.1	837.50>679.50	166.79
28	Virginiamycin	50.00	7.84±0.1	526.40	508.25	354.95	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	80.05
29	Lincomycin	25.00	4.40±0.1	407.30	126.30	359.20	Roxithromycin (IS)	5.77±0.1	837.50>679.50	53.19
30	Ciprofloxacin	25.00	4.65±0.1	332.20	288.15	245.10	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	126.71
31	Enrofloxacin	25.00	4.74±0.1	360.25	316.15	245.10	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	181.27
32	Norfloxacin	12.50	4.63±0.1	320.20	302.05	276.15	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	44.32
33	Danofloxacin	25.00	4.69±0.1	358.20	340.15	314.20	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	9.58

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
34	Difloxacin	75.00	4.90±0.1	400.20	356.15	382.05	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	183.92
35	Flumequine	50.00	7.82±0.1	262.10	202.05	174.05	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	1247.38
36	Marbofloxacin	37.50	4.59±0.1	363.20	320.10	277.05	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	50.70
37	Nalidixic acid	12.50	7.76±0.1	233.20	187.10	159.10	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	361.26
38	Oxolinic acid	100.00	6.91±0.1	262.15	216.00	130.10	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	396.36
39	Sarafloxacin	15.00	4.87±0.1	386.25	342.10	299.10	Sarafloxacin-D_8	4.80±0.1	394.20>350.15	17.36
40	Oxytetracycline	100.00	4.41±0.1	461.50	444.05	426.20	Demechlocycline	4.92±0.1	465.10>154.20	5.71
41	Tetracycline	25.00	4.80±0.1	445.10	410.00	154.25	Demechlocycline	4.92±0.1	465.10>154.20	150.04

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
42	Chlortetracycline	100.00	5.20±0.1	479.10	444.05	462.10	Demechlocycline	4.92±0.1	465.10>154.20	724.17
43	Doxycycline	12.50	4.80±0.1	445.50	154.25	428.05	Demechlocycline	4.92±0.1	465.10>154.20	21.22
44	Levamisole	5.00	4.42±0.1	204.80	178.25	123.20	Flubendazole-D_3	7.33±0.1	316.80>282.25	78.72
45	Flubendazole	12.50	7.38±0.1	313.70	282.20	123.20	Flubendazole-D_3	7.33±0.1	316.80>282.25	154.02
46	Thiabendazole	12.50	4.69±0.1	201.70	175.20	131.30	Flubendazole-D_3	7.33±0.1	316.80>282.25	43.99
47	Methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA)	12.50	7.34±0.1	189.10	145.10	102.10	Quinoxaline-2-Carboxylic acid (QCA)-D_4	6.54±0.1	178.75>133.30	90.85
48	Quinoxaline-2-Carboxylic acid	12.50	6.44±0.1	175.15	129.00	102.00	Quinoxaline-2-Carboxylic	6.54±0.1	178.75>133.30	29.02

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
	(QCA)						acid (QCA)-D_4			
49	Trimethoprim	12.50	4.56±0.1	291.20	230.25	123.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	104.52
50	Dapsone	12.50	6.41±0.1	249.15	156.25	108.25	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	35.11
51	Flunixin	5.00	9.33±0.1	297.15	279.20	264.20	Roxithromycin (IS)	5.77±0.1	837.50>679.50	125.75
52	Phenylbutazone	12.50	9.67±0.1	307.10	279.00	130.90	Chloramphenicol-D_5	6.73±0.1	326.10>157.30	172.05
53	Dexamethasone	3.00	7.44±0.1	393.10	373.20	355.20	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	171.36
54	Testosterone	12.50	8.73±0.1	289.10	97.10	109.10	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	41.06
55	Methyl	12.50	9.13±0.1	303.00	97.10	109.10	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	66.68

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
	Testosterone									
56	17Alpha-Nortestosterone	12.50	8.80±0.1	275.00	109.20	239.20	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	36.37
57	Chloramphenicol	3.60	6.78±0.1	321.00	152.10	257.00	Chloramphenicol-D_5	6.73±0.1	326.10>157.30	842.99
58	Thiamphenicol	12.50	5.74±0.1	354.05	185.35	290.20	Chloramphenicol-D_5	6.73±0.1	326.10>157.30	150.53
59	Florfenicol	25.00	6.66±0.1	356.20	185.10	336.00	Chloramphenicol-D_5	6.73±0.1	326.10>157.30	778.19
60	Florfenicol amine	25.00	1.94±0.1	247.90	130.25	197.10	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	1.30
61	Amoxicillin	100.00	3.77±0.1	366.25	349.25	134.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.01±0.1	317.25>162.35	12.98

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
62	Ampicillin	50.00	4.60±0.1	350.20	106.25	160.20	Sulfadimethoxine-D_6	7.01±0.1	317.25>162.35	152.44
63	Cefazolin	100.00	6.61±0.1	455.00	323.00	156.00	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	65.10
64	Cefapirin	100.00	4.54±0.1	424.25	292.00	152.00	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	5.23
65	Cefalexin	50.00	4.60±0.1	348.15	158.05	174.05	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	192.53
66	Cloxacillin	75.00	8.76±0.1	436.15	277.25	160.25	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	602.09
67	Dicloxacillin	150.00	9.25±0.1	470.05	160.20	311.20	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	137.17
68	Oxacillin	75.00	8.46±0.1	402.10	243.00	160.00	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	187.24
69	Penicillin G	12.50	6.04±0.1	334.60	160.10	114.20	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	18.04

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
70	Penicillin V	5.00	4.56±0.1	351.60	160.25	114.25	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	5.09
71	Brombuterol	5.00	4.99±0.1	367.00	292.85	349.05	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	129.32
72	Cimaterol	5.00	3.92±0.1	220.45	202.25	160.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	8.61
73	Cimbuterol	2.50	4.33±0.1	234.20	160.10	216.25	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	83.67
74	Clenbuterol	5.00	4.83±0.1	276.85	203.00	259.25	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	123.49
75	Hydroxymethyl-clenbuterol	5.00	4.64±0.1	293.15	203.15	168.20	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	16.59
76	Mabuterol	5.00	5.11±0.1	311.10	236.95	217.15	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	62.14

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
77	Mapenterol	2.50	5.30±0.1	325.10	236.90	217.15	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	61.79
78	Ractopamine	5.00	4.65±0.1	301.95	106.90	164.30	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	14.80
79	Salbutamol	10.00	3.81±0.1	240.00	148.25	222.30	Salbutamol-D_3	3.60±0.1	243.40>151.20	182.22
80	Zilpaterol	20.00	3.86±0.1	262.25	185.30	202.25	Sulfadimethoxine-D_6	7.02±0.1	317.25>162.35	94.76
81	Dimetridazole	12.50	5.54±0.1	142.10	96.15	81.20	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	40.86
82	Metronidazole	12.50	4.97±0.1	172.20	128.10	82.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	66.49
83	Hydroxy metronidazole	12.50	4.62±0.1	187.90	126.20	123.30	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	43.44

ลำดับ	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ 0.25 MRL (ng/g)	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion		Internal standard			S/N
					1°	2°	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Transition ion	
84	Ronidazole	12.50	5.34±0.1	200.80	140.10	55.10	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	65.60
85	2-Hydroxymethyl-1- methyl-5-nitroimidazole	12.50	5.05±0.1	158.15	140.10	55.20	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	71.75
86	Ipronidazole	12.50	7.18±0.1	170.20	124.30	109.2	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	15.58
87	Hydroxyipronidazole	12.50	6.19±0.1	186.15	168.20	122.25	Sulfamethoxypyridazine-D_3	5.94±0.1	284.10>156.25	94.85

6. สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Multi-Class Residue Method (MRM) จำนวน 12 กลุ่มสาร ได้แก่ Amphenicols, Benzimidazoles, Beta-lactams, Beta-agonists, Carbadox and Olaquindox metabolites, Corticosteroid, Macrolides and Lincosamides, Sulphonamides, Trimethoprim and Dapsone, Nitroimidazoles, Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, Quinolones and Fluoroquinolones และ Tetracyclines ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง 0.1% formic acid ในน้ำ กับ 0.1% formic acid ใน acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบอิเล็กโทรสเปรย์ (ESI+) ซึ่งเทคนิค LC-MS/MS เป็นเทคนิคการยืนยันผลที่เป็นที่ยอมรับของสากล และได้คะแนน identification points 5 คะแนน ผ่านตามเกณฑ์ของแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/808/EC และวิธีที่พัฒนาขึ้นมีระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีนี้วัดได้ (Lowest calibration level; LCL) เท่ากับ 0.25 MRL ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่มีความไวเพียงพอ และบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

7. ข้อเสนอแนะ

7.1 วิธีที่พัฒนาได้นั้นยังไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

- สาร Sulfaguanidine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Sulphonamides
- Tylosin A, Spiramycin, Virginiamycin และ Lincomycin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Macrolides and Lincosamides
- Flumequine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Quinolones and Fluorquinolones
- Tetracycline และ Doxycycline ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Tetracyclines
- Florfenicol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Amphenicols
- Cefapirin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Beta-lactams
- Cimaterol, Cimbuterol และ Zilpaterol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Beta-agonists
- Ipronidazole ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Nitroimidazoles

เนื่องจาก ค่า %Recovery และค่า R ไม่ผ่านเกณฑ์ จึงควรปรับปรุงวิธีวิเคราะห์เพิ่มเติมในภายหลัง เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ครอบคลุมสารตกค้างยาสัตว์ที่สำคัญได้อย่างครบถ้วน

7.2 ควรทดสอบความใช้ได้ของวิธีเพื่อให้มีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้าง สามารถนำไปใช้เป็นวิธีในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังสารตกค้างยาสัตว์ Multi - Class Residue Method (MRM) ในเนื้อสัตว์ปีกได้

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

9.1 ฉันทนี บูรณะไทย. คู่มือการเก็บตัวอย่างและการปฏิบัติงานกิจกรรมเฝ้าระวังสารตกค้าง. กรุงเทพฯ:กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

9.2 European Commission. 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 (2009) p. 1-72

9.3 United States Department of Agriculture. 2018. Screening and Confirmation of Animal Drug Residues by UHPLC-MS-MS.