

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC MS/MS

พัทธ์ธีรา อินธระประดิษฐ์ ลินดา พุทศรี ชนิกรณ์ สุนขุนทด ขนิษา พุทศรี
วรารกรณ์ รักษาพล นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้เป็นวิธียืนยันผล (Confirmatory method) ของสารตกค้างยา สัตว์ กลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS สารตกค้างจะถูกสกัด ออกมาจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก โดยใช้ 5% Trichloro acetic acid เติมลงในหลอดทดลอง นำไปเขย่า และปั่นเหวี่ยงตกตะกอนตามลำดับ จากนั้นทำการกำจัดไขมัน (Defatting) ด้วย hexane แล้วกำจัดสิ่ง สกปรก (interferes) ที่อาจรบกวนผลการวิเคราะห์ โดยใช้ Solid Phase Extraction (SPE) ชนิด HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced) ขนาด 60 mg/3 ml และนำสิ่งสกัดไประเหยจนแห้ง โดยใช้แก๊ส ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 45°C ละลายสารตกค้างที่เหลืออยู่ด้วยสารละลาย 0.1% Formic acid in H₂O: ACN: MeOH (6:3:1) และทำการกรองสารละลายโดยใช้ syringe membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง 0.1% formic acid ในน้ำ กับ 0.1% formic acid ใน acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสาร ด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบอิเล็กโตรสเปย์ (ESI+)

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Tetracyclines และ epimer เนื้อสัตว์ปีก LC-MS/MS
งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์
สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development of Confirmatory Method for Tetracyclines and epimer in Poultry Muscle with LC-MS/MS

Phatthira Intharapradist Linda Putthasri Chaniphon Sunkhunthod Khanisa puttasri

Varaporn Raksaphon Naraya Tangsirirap

Abstract

Confirmatory method for analyzing Tetracyclines and Epimer in poultry muscle with LC-MS/MS was developed. The residues were extracted from poultry muscle by using 5% Trichloro acetic acid. Then, mixing by shaker and centrifuge, subsequently. Next, defatting by using hexane. After that, Clean-up the extracted by loading through Hydrophilic-Lipophilic Balanced (HLB) Solid Phase Extraction (SPE), 60 mg/3 ml. 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 H₂O: ACN: MeOH (6:3:1). Finally, the extracted solution was filtered by using a 0.2 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, Tetracyclines and Epimer, 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

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines และ epimer

ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC MS/MS

พัทธ์ธีรา อินระประดิษฐ์ ลินดา พุทธรศรี ชนิภรณ์ สุนขุนทด ชนิษา พุทธรศรี
วรารณ รัชชาพล นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทนำ

การปนเปื้อนสารตกค้างยาสัตว์ในสินค้าปศุสัตว์เป็นปัญหาสำคัญที่พบมากของวงการอุตสาหกรรมเกษตรและการผลิตอาหารในปัจจุบัน โดยพบว่าแนวโน้มในการตรวจพบสารตกค้างยาในสินค้าปศุสัตว์เพื่อการบริโภคมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็นเท่าตัว ซึ่งตัวเลขนี้สอดคล้องต่ออัตราการเติบโตทางเศรษฐกิจและสังคมภายในประเทศไทย ทำให้เกิดผลกระทบโดยตรงต่อการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ตามกลไกของหลักอุปสงค์และอุปทาน ผู้ผลิตจึงมีการนำไปใช้ในฟาร์มเพื่อหวังผลในการควบคุมการติดเชื้อ ลดอัตราการป่วยและตายของสัตว์ ทั้งนี้ การใช้ยาในฟาร์มจำเป็นต้องถูกควบคุมและจำกัดชนิดของยารวมถึงปริมาณการใช้งานให้ถูกต้อง เพื่อป้องกันผลเสียจากการส่งผ่านสารตกค้างยาในสินค้าปศุสัตว์ไปสู่ผู้บริโภค โดยการตกค้างของยาในร่างกายผู้บริโภคก่อให้เกิดผลเสียมากมายต่อสุขภาพ อาทิเช่น การแพ้ยา การเกิดเชื้อดื้อยา หรือการเกิดมะเร็ง เป็นต้น

กรมปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ มีหน้าที่รับผิดชอบตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาในสินค้าปศุสัตว์ โดยอ้างอิงรายการสารตกค้างฯที่ต้องตรวจวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป Commission Delegated Regulation (EU) 2022/1644 ซึ่งแบ่งประเภทของสารตกค้างเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A หมายถึง สารกลุ่มที่มีผลต่อกระบวนการทำงานของร่างกายของผู้บริโภค (Anabolic effect) และสารที่ห้ามใช้ในการผลิตปศุสัตว์ (Unauthorized substances) และกลุ่ม B เป็นสารประเภทยาสัตว์และสารที่อาจปนเปื้อนในกระบวนการผลิตปศุสัตว์ อนุญาตให้พบการตกค้างได้ แต่ต้องไม่เกินค่าที่กำหนดไว้สูงสุด หรือค่า Maximum Residues Limit (MRL)

จากปัญหาและข้อกำหนดข้างต้น งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ซึ่งมีหน้าที่รับผิดชอบตรวจวิเคราะห์ และพัฒนาวิธีเพื่อตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมนในเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์

สารให้เป็นไปตามแนวทางข้อกำหนดของสหภาพยุโรป ซึ่งจากเดิมมีการตรวจวิเคราะห์ได้เพียงแค่สารตกค้างยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines 4 ชนิด ได้แก่ Chlortetracycline, Doxycycline, Oxytetracycline และ Tetracycline เท่านั้น ปัจจุบันได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ให้ครอบคลุมได้มากขึ้น โดยสามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม Tetracyclines ทั้ง 4 ชนิด และ epimer ได้แก่ 4-epi-chlortetracycline, 4-epi-oxytetracycline และ 4-epi-tetracycline ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ได้ เพื่อให้สามารถใช้เฝ้าระวังสารตกค้างยาต้านจุลชีพกลุ่มนี้ได้ตามแนวทางข้อกำหนดของสหภาพยุโรปและเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคภายในประเทศไทยอีกด้วย

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines และ epimer จำนวน 7 สาร (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1) ในเนื้อสัตว์ปีก (ใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน) โดยเทคนิค LC-MS/MS

ลำดับ	สารมาตรฐาน	internal standard
1	Oxytetracycline	Demeclocycline
2	Tetracycline	
3	Chlortetracycline	
4	Doxycycline	
5	4-Epi-oxytetracycline	
6	4-Epi-tetracycline	
7	4-Epi-chlortetracycline	

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาต้านจุลชีพกลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาต้านจุลชีพกลุ่มดังกล่าว จำนวน 7 สารที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ EU MRL หรือต่ำกว่า

4. วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS
2. จัดเตรียมตัวอย่าง สารเคมี สารมาตรฐาน วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็น
3. ดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ดังนี้
 - 3.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ SCIEX รุ่น Triple Quad 6500+
 - 3.2 ทดลองสกัดสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อไก่ ตามวิธีอ้างอิงที่เลือกมา และปรับเปลี่ยนวิธีสกัดให้เหมาะสม และผ่านเกณฑ์การยอมรับ
3. ประมวลผล สรุป และจัดทำรูปเล่ม

5. ผลการทดลอง

- 5.1 สามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีก (ใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน) โดยเทคนิค LC-MS/MS
- 5.2 วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS มีขั้นตอนดังนี้

สารตกค้างจะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก โดยใช้ 5% Trichloro acetic acid เติมลงในหลอดทดลอง นำไปเขย่าและปั่นเหวี่ยงตกตะกอนตามลำดับ จากนั้นทำการกำจัดไขมัน (Defatting) ด้วย hexane แล้วกำจัดสิ่งสกปรก (interferes) ที่อาจรบกวนผลการวิเคราะห์ โดยใช้ Solid Phase Extraction (SPE) ชนิด HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced) ขนาด 60 mg/3 ml และนำสิ่งสกัดไประเหยจนแห้ง โดยใช้แก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 45°C ละลายสารตกค้างที่เหลืออยู่ด้วยสารละลาย 0.1% Formic acid in H₂O: ACN: MeOH (6:3:1) และทำการกรองสารละลายโดยใช้ syringe membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 ไมครอนเมตร 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) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบอิเล็กโตรสเปย์ (ESI+)

5.3 เครื่อง LC-MS/MS ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น 40 และ detector ประเภท Triple Quadrupole Mass Spectrometer ยี่ห้อ SCIEX รุ่น Triple Quad 6500+

5.4 HPLC Column ที่ใช้ ได้แก่ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Poroshell 120 SB-C18 ขนาด 2.1 x 100 mm., 2.7 μ m

5.5 สภาพของเครื่อง HPLC และอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (ตารางที่ 1) มีดังนี้

Mobile phase A : 0.1% formic acid in water (H₂O)
Mobile phase B : 0.1% formic acid in acetonitrile (ACN)
Flow rate : 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที
Run time : 14 นาที
Injection volume : 3 ไมโครลิตร

Column oven temperature : 40 องศาเซลเซียส
Auto Sampler temperature : 25 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

Total Time (min)	Flow rate (μ L/min)	Mobile A (%)	Mobile B (%)
0.00	300	95	5
5.00		80	20
10.00		35	65
12.00		35	65
13.00		90	10
14.00		90	10

5.6 เทคนิค LC-MS/MS เป็นเทคนิคที่ทำการวัดไอออนตั้งต้น (precursor ion; ได้ identification point (IP) 1 คะแนน) และไอออนผลผลิต (product ion) 2 ไอออน (ได้ IP 1.5 คะแนนต่อ ไอออน) คือ ไอออนที่แตกตัวแล้วให้ความเข้มสูงสุด (primary ion) และไอออนที่แตกตัวให้ความเข้มรองลงไป ซึ่งให้ความเข้มน้อยกว่า (secondary ion) รวมได้คะแนน IP 4 คะแนน ผ่านตามเกณฑ์ของแนวมติคณะกรรมการวิชาการยุโรป Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 สภาวะเครื่อง MS/MS, retention time, precursor ion และ product ion (ตารางที่ 2) มีดังนี้

MS Parameters ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

Polarity : Positive MRM

Ion Source : ESI

ตารางที่ 2 Retention time, precursor ion และ product ion ของสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีก

ลำดับ	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Precurs or ion	Product ion	
				1°	2°
1	Oxytetracycline	3.56±0.1	461.000	426.10	443.20
2	Tetracycline	4.68±0.1	445.200	410.10	427.10
3	Chlortetracycline	5.28±0.1	470.100	444.00	426.00
4	Doxycycline	5.47±0.1	445.300	428.10	154.20
5	4-Epi-oxytetracycline	5.43±0.1	461.000	426.10	443.20
6	4-Epi-tetracycline	5.60±0.1	445.200	410.10	427.10
7	4-Epi-chlortetracycline	5.82±0.1	470.100	444.00	426.00
8	Demeclocycline	5.77±0.1	465.200	154.20	-

6. สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines และ epimer 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) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบอิเล็กโตรสเปร์ย์ (ESI+) ซึ่งเทคนิค LC-MS/MS เป็นเทคนิคการยืนยันผลที่เป็นที่ยอมรับของสากล และได้คะแนน identification points 5 คะแนน ผ่านตามเกณฑ์ของแนวมติคณะกรรมการอาหารยุโรป Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 และวิธีที่พัฒนาขึ้นมีระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีนี้วัดได้ (Lowest calibration level; LCL) เท่ากับ 0.2 MRL ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่มีความไวเพียงพอ และบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

7. ข้อเสนอแนะ

7.1 สาร Demeclocycline ที่ถูกนำมาใช้เป็น Internal Standard ยังไม่ถือเป็นสารที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ที่สุด เนื่องจากสาร Demeclocycline จัดเป็นตัวยาชนิดหนึ่งในสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines อาจทำให้เกิดความสับสนในความสามารถของการแยกออกจากตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ รวมถึงอาจเป็นองค์ประกอบหรือพบได้ในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์อยู่แล้ว ดังนั้น จึงควรหาสาร internal standard ที่มีความเหมาะสมมากกว่านี้มาใช้ในการปฏิบัติงานแทน

7.2 ควรตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเพื่อให้มีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้าง สามารถนำไปใช้เป็นวิธีในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Tetracyclines และ epimer ในเนื้อสัตว์ปีกได้

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

9.1 Anna, G. and Andrzej, P., (2015), Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ten tetracycline residues in muscle samples, Bull Vet Inst Pulawy59, 345-352,2515 DOI:10.1515/bvip-2015-0051

9.2 Dominique, H.P., Sophie, G., Murielle, J.G., Eric, V.,(2008) , Screening of veterinary antibacterial residues in muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method validation, EuroResidueVI, P.1316-1321.

9.3 Aurelien Desmarchelier, Sebastien Anizan, Mai Minh, Marie-Claude Savoy & Cindy Bion (2018): Determination of five tetracyclines and their epimers by LC-MS/MS based on a liquid-liquid extraction with low temperature partitioning, Food Additives & Contaminants: Part A, DOI: [10.1080/19440049.2018.1427894](https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1427894)