การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยเทคนิค LC MS/MS

ปภาวรินท์ ทัศนีย์ ริญญภัสร์ คงวิโรจน์ไชย มัชนา แก้วเหลี่ยม
อังคณา สว่างใจ นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้เป็นวิธียืนยันผล (Confirmatory method) ของสารตกค้างยาสัตว์ กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยเทคนิค LC-MS/MS สารตกค้างจะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยใช้ Ethyl acetate เติมลงในหลอดทดลอง นำไปผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงตกตะกอนตามลำดับ จากนั้นทำการกำจัดไขมัน (Defatting) ด้วย hexane แล้วกำจัดสิ่งสกปรก (interferes) ที่อาจรบกวนผลการวิเคราะห์ โดยใช้ Solid Phase Extraction (SPE) ชนิด C18 ขนาด 500 mg/3 ml และนำสิ่งสกัดไประเหยจนแห้ง โดยใช้แก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 50°C ละลายสารตกค้างที่เหลืออยู่ด้วยสารละลาย MeOH : DI water (1:1) และทำการกรองสารละลายโดยใช้ syringe membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง DI water กับ Acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุลบแบบอิเล็กโทรสเปรย์ (ESI-)

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Amphenicols เนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ LC-MS/MS
งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์
สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development of Confirmatory Method for Amphenicols in Tissues and Animal Products with LC-MS/MS

Paphawarin Thassanee Rinyapat Kongwirotchai Matchana Kaewliam
Angkhana Sawangjai Naraya Tangsirisap

Abstract

Confirmatory method for analyzing Amphenicols in tissues and animal products with LC-MS/MS was developed. The residues were extracted from tissues and animal products by using ethyl acetate. Then, mixing by vortex mixer and centrifuge, subsequently. Next, defatting by using hexane. After that, clean-up the extracted by loading through C18 Solid Phase Extraction (SPE), 500 mg/3 ml. The extracted was evaporated to dryness using a mild stream of nitrogen gas at 50°C. The residue was reconstituted in the mixture of MeOH : DI water (1:1). Finally, the extracted solution was filtered by using a 0.2 µm nylon syringe membrane filter. The high-performance liquid chromatography (HPLC) separation was performed on a C18 HPLC column with gradient mobile phase of DI water and acetonitrile. The triple quadrupole mass spectrometer (MS/MS) technique was used to identify and quantify analytes using mass per charge (m/z) in electrospray negative ionization mode (ESI-)

Keywords: Method development, Amphenicols, Tissues and animal products, 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 Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยเทคนิค LC MS/MS

ปภาวรินท์ ทัศนีย์ ริญญภัสร์ คงวิโรจน์ไชย มัชนา แก้วเหลี่ยม
อังคณา สว่างใจ นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทนำ

การปนเปื้อนสารตกค้างยาสัตว์ในสินค้าปศุสัตว์เป็นปัญหาสำคัญที่พบมากของวงการอุตสาหกรรมการเกษตรและการผลิตอาหารในปัจจุบัน โดยพบว่าแนวโน้มในการตรวจพบสารตกค้างยาในสินค้าปศุสัตว์เพื่อการบริโภคมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็นเท่าตัว ซึ่งตัวเลขนี้สอดคล้องต่ออัตราการเติบโตทางเศรษฐกิจและสังคมภายในประเทศไทย ทำให้เกิดผลกระทบโดยตรงต่อการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ตามกลไกของหลักอุปสงค์และอุปทาน ผู้ผลิตจึงมีการนำยาไปใช้ในฟาร์มเพื่อหวังผลในการควบคุมการติดเชื้อ ลดอัตราการป่วยและตายของสัตว์ ทั้งนี้ การใช้ยาในฟาร์มจำเป็นต้องถูกควบคุมและจำกัดชนิดของยารวมถึงปริมาณการใช้งานให้ถูกต้อง เพื่อป้องกันผลเสียจากการส่งผ่านสารตกค้างยาในสินค้าปศุสัตว์ไปสู่ผู้บริโภค โดยการตกค้างของยาในร่างกายผู้บริโภคก่อให้เกิดผลเสียมากมายต่อสุขภาพ อาทิเช่น การแพ้ยา การเกิดเชื้อดื้อยา การเกิดโรคโลหิตจางหรือการเกิดมะเร็ง 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 จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารให้เป็นไปตามแนวทางข้อกำหนดของสหภาพยุโรป ซึ่งจากเดิมมีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ได้เพียงสาร Chloramphenicol เท่านั้น ปัจจุบันได้

พัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ให้ครอบคลุมได้มากขึ้น โดยสามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม Amphenicols เป็น 3 ชนิด ได้แก่ Chloramphenicol, Florfenicol และ Thiamphenicol ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ได้ เพื่อให้สามารถใช้เฝ้าระวังสารตกค้างยาสัตว์กลุ่มนี้ได้ตามแนวทางข้อกำหนดของสหภาพยุโรปและเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคภายในประเทศไทยอีกด้วย

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์โดยเทคนิค LC-MS/MS

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols จำนวน 3 สาร (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1) ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ (ใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน) โดยเทคนิค LC-MS/MS

ตารางที่ 1 สารมาตรฐาน และ internal standard ที่จะพัฒนาวิธี

ลำดับ	สารมาตรฐาน	internal standard
1	Chloramphenicol	Chloramphenicol-D5
2	Florfenicol	Florfenicol-D3
3	Thiamphenicol	Thiamphenicol-D3

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่มดังกล่าว ที่ระดับความเข้มข้น ½ RPA หรือ ½ EU MRL หรือต่ำกว่าได้

4. วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยวิธี LC MS/MS

2. จัดเตรียมตัวอย่าง สารเคมี สารมาตรฐาน วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็น

3. ดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

3.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060

3.2 ทดลองสกัดสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อไก่ ตามวิธีอ้างอิงที่เลือกมา และปรับเปลี่ยนวิธีสกัดให้เหมาะสมผ่านเกณฑ์การยอมรับ

4. ประมวลผล สรุป และจัดทำรูปเล่ม

5. ผลการทดลอง

5.1 สามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ (ใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน) โดยเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 3 สาร ได้แก่ Chloramphenicol, Florfenicol และ Thiamphenicol

5.2 วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ (ใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน) โดยเทคนิค LC-MS/MS มีขั้นตอนดังนี้

สารตกค้างจะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยใช้ Ethyl acetate เติมลงในหลอดทดลอง นำไปผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงตกตะกอนตามลำดับ จากนั้นทำการกำจัดไขมัน (Defatting) ด้วย hexane แล้วกำจัดสิ่งสกปรก (interferes) ที่อาจรบกวนผลการวิเคราะห์โดยใช้ Solid Phase Extraction (SPE) ชนิด C18 ขนาด 500 mg/3 ml และนำสิ่งสกัดไประเหยจนแห้ง โดยใช้แก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 50°C ละลายสารตกค้างที่เหลืออยู่ด้วยสารละลาย MeOH : DI water (1:1) และทำการกรองสารละลายโดยใช้ syringe membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง DI water กับ Acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุลบแบบอิเล็กโทรสเปรย์ (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 Agilent รุ่น ZORBAX ชนิด Eclipse XDB-C18 ขนาด1.8µm, 4.6x100mm with guard column

5.5 สภาวะของเครื่อง HPLC และอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (ตารางที่ 2) มีดังนี้

Mobile phase A : DI water

Mobile phase B : Acetonitrile

Flow rate : 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

Run time : 10 นาที

Injection volume : 5 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

Step	Total time (min)	Flow rate (µl/min)	Mobile phase Line A (%)	Mobile phase Line B (%)
1	0.50	400	90	10
2	4.00	400	10	90
3	6.00	400	10	90
4	7.00	400	90	10
5	10.00	400	90	10

5.6 เทคนิค LC-MS/MS เป็นการแยกสารด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (LC technique; ได้ identification point (IP) 1 คะแนน) หลังจากนั้นยืนยันชนิดสารด้วยเทคนิคที่ทำการวัดไอออนตั้งต้น (precursor ion; ได้ 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 5 คะแนน ผ่านตามเกณฑ์ของแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 สภาวะเครื่อง MS/MS, retention time, precursor ion และ product ion (ตารางที่ 3) มีดังนี้

MS Parameters ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

Polarity : 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 3 Retention time, precursor ion และ product ion ของสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์

ลำดับ	ชื่อสาร	Retention time (Rt, min)	Precursor ion	Product ion	
				1°	2°
1	Chloramphenicol	5.68±0.1	321.10	152.00	257.10
2	Florfenicol	5.64±0.1	356.05	336.00	184.90
3	Thiamphenicol	5.12±0.1	353.90	290.00	239.80
4	Chloramphenicol-D5	5.68±0.1	326.10	157.10	-
5	Florfenicol-D3	5.64±0.1	359.05	188.00	-
6	Thiamphenicol-D3	5.12±0.1	357.05	188.15	-

6. สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง DI water กับ Acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุลบแบบอิเล็กโทรสเปรย์ (ESI-) ซึ่งเทคนิค LC-MS/MS เป็นเทคนิคการยืนยันผลที่เป็นที่ยอมรับของสากล และได้คะแนน identification points 5 คะแนน ผ่านตามเกณฑ์ของแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 และวิธีที่พัฒนาขึ้นมีระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีนี้วัดได้ (Lowest calibration level; LCL) เท่ากับ 0.5RPA/0.1MRL/1LCL ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่มีความไวเพียงพอ และบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

7. ข้อเสนอแนะ

ควรตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเพื่อให้มีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้าง สามารถนำไปใช้เป็นวิธีในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Amphenicols ในเนื้อเยื่อสัตว์และผลิตภัณฑ์ได้

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

9.1 Gantverg, A., Shishani, I. And Hoffman, M., 2003, Determination of Chloramphenicol in animal tissues and urine Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 483, 125 – 135.

9.2 Verzegnassi, L., Royer, D., Mottier, P. and Stadler, R. H., 2003, Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Food Additives and Contaminants, 20, No. 4, 335 – 342.

9.3 Fabiano Barretoa, Cristina Ribeiroa, Rodrigo Barcellos Hoff a,c, Teresa Dalla Costa, 2016, Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal Chromatography A, 1449, p.48-53.