การพัฒนาวิธีทดสอบยากลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols ในน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค LC - MS/MS

ลภัส ขาวจัตุรัส เพชรสุรินทร์ หวนจิตร ปารัช พูนขวัญ นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยากลุ่มไนโตรฟูรานส์ (Nitrofurans) ไนโตรอิมิดาโซลส์ (Nitroimidazoles) และแอมฟีนิคอลส์ (Amphenicols) รวม 14 ชนิด ในตัวอย่างน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์ ได้แก่ nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, furaltadone, nifursol, metronidazole, ronidazole, dimetridazole, ipronidazole, ternidazole, ornidazole, chloramphenicol, florfenicol และ thiamphenicol โดยใช้เทคนิค Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) ร่วมกับการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารทั้งหมดได้ภายในการวิเคราะห์เดียว การพัฒนาวิธีดำเนินการโดยปรับสภาวะโครมาโทกราฟีและการตรวจวัดให้เหมาะสม ด้วยคอลัมน์ C18 และใช้เฟสเคลื่อนที่ระหว่าง 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำและ 0.1% กรดฟอร์มิกในอะซีโตไนไทรล์ ผลการพัฒนาพบว่าสามารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสม พร้อมทั้งระบุไอออนตั้งต้น (Precursor ion) และไอออนผลิตภัณฑ์ (Product ion) ของสารเป้าหมายทั้ง 14 ชนิดได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้ การทดสอบความเที่ยงของระบบโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำ 3 ครั้ง ให้ค่าเวลาหน่วง (Retention time) มีความแตกต่างไม่เกิน ±0.1 นาที แสดงถึงความเสถียรและความสม่ำเสมอของระบบภายใต้สภาวะที่พัฒนาขึ้น สรุปได้ว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมและสามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่มดังกล่าวในน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์ด้วยเทคนิค UHPLC-MS/MS โดยพร้อมสำหรับการนำไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) ในขั้นตอนต่อไป เพื่อประเมินสมรรถนะและนำไปใช้ในการเฝ้าระวังสารตกค้างอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: nitrofurans, nitroimidazoles, amphenicols, น้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์, UHPLC–MS/MS

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Development of a Method for the Determination of Nitrofurans, Nitroimidazoles, and Amphenicols in Potable Water for Livestock Farms Using LC - MS/MS

Lapad Khaojaturas Phetsurin Huanjit Paruch Poonkwan Naraya Tangsirisap

Abstract

This study aimed to develop an analytical method for the determination of 14 veterinary drugs belonging to the nitrofurans, nitroimidazoles, and amphenicols groups in livestock farm water samples. The target compounds included nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, furaltadone, nifursol, metronidazole, ronidazole, dimetridazole, ipronidazole, ternidazole, ornidazole, chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol. The analysis was performed using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) coupled with solid phase extraction (SPE) to enable the simultaneous determination of all 14 compounds within a single run. The method development involved optimizing chromatographic and detection conditions using a C18 column with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile. The results demonstrated that optimal conditions were successfully established, allowing the accurate identification of the precursor and product ions for all 14 target analytes. Furthermore, system precision was evaluated by triplicate injections of the standard solution, yielding retention time variations of less than ±0.1 minutes, which confirmed the stability and consistency of the system under the developed conditions. In conclusion, the developed UHPLC-MS/MS method is appropriate and serves as a reliable framework for analyzing these 14 drug residues in livestock farm water. It is fully prepared for subsequent method validation to assess its performance parameters, ensuring its suitability for monitoring and surveillance of residues in livestock water supplies.

Keywords: nitrofurans, nitroimidazoles, amphenicols, Potable Water for Livestock Farms, UHPLC–MS/MS

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

บทนำ

สหภาพยุโรปมีมาตรการว่าด้วยการ เฝ้าตรวจสารและสารตกค้าง ในสัตว์มีชีวิตและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เพื่อคุ้มครองสุขภาพผู้บริโภคและความปลอดภัยของอาหารสัตว์ ก่อนที่จะมีการนำไปขายหรือจำหน่ายในตลาดของสหภาพยุโรป (European Commission, 1996) สารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ chloramphenicol ถูกห้ามใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ จึงต้องดำเนินการเฝ้าระวังสารตกค้างของสารดังกล่าวในสัตว์ที่มีชีวิตและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยน้ำใช้ในฟาร์มปศุสัตว์ ถูกนำมาใช้เพื่อการดื่มของสัตว์ การผสมอาหารให้สัตว์ การทำความสะอาดอุปกรณ์ และกิจกรรมการจัดการฟาร์มต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเลี้ยงสัตว์ หากน้ำมีการปนเปื้อนของยาสัตว์ โดยเฉพาะยาที่ถูกห้ามใช้ อาจเป็นแหล่งกำเนิดของสารตกค้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ อาจทำให้เกิดการดื้อยาของจุลชีพ และความน่าเชื่อถือของระบบความปลอดภัยอาหารเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและเพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดในการส่งออกสินค้าไปยังประเทศคู่ค้าในสหภาพยุโรป (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2559)

การเฝ้าระวังและตรวจสอบสารตกค้างของยากลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicol ในน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์จึงมีความจำเป็น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประเมินความเสี่ยง การควบคุมแหล่งปนเปื้อน และสนับสนุนการปฏิบัติตามข้อกำหนดด้านกฎหมายและมาตรฐานสากลด้านความปลอดภัยอาหาร อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์สารตกค้างของยากลุ่มดังกล่าวในน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์จึงมีความท้าทาย เนื่องจากระดับความเข้มข้นที่ต่ำมาก (ระดับ µg/kg หรือต่ำกว่า) โครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน และความจำเป็นต้องใช้วิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง รวมทั้งสามารถยืนยันชนิดของสารได้อย่างถูกต้องตามเกณฑ์การยืนยันผล (European Commission, 2010)

เทคนิค Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry (UHPLC–MS/MS) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้างของยาสัตว์ เนื่องจากมีความไวสูง ความจำเพาะดี และสามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดพร้อมกันได้ภายในการวิเคราะห์เดียว (multi - residue analysis) อีกทั้งยังสอดคล้องกับข้อกำหนดด้านการยืนยันผลและสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของสหภาพยุโรป (European Commission, 2021)

Ardsoongnearn *et al.* (2014) ได้พัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างจากยาต้านจุลชีพในน้ำใช้สำหรับสัตว์ ได้แก่ กลุ่ม nitrofurans (NFZ, NFT, FZD, FTD), กลุ่ม nitroimidazoles (MNZ, RNZ, DMZ) และ chloramphenicol (CAP) รวมทั้งหมด 8 ชนิดพร้อมกัน (eight multiclass antimicrobial drugs) ด้วยเทคนิค liquid chromatography ion trap mass spectrometry (LC-MS ion trap) โดยใช้ SPE และ มีการใช้ isotope-labeled internal standardsสำหรับสารแต่ละชนิด การวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Prodigy ODS-3 ขนาด 2.0 มม. × 150 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร พร้อม guard cartridge ที่อัตราการไหล 0.2 มล./นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 °C สกัดด้วย SPE สารทั้ง 8 ชนิดสามารถแยกได้ภายใน 18 นาที โดยใช้การอัตราไหลแบบไล่ระดับของอะซีโตไนไทรล์ในน้ำที่ทำให้เป็นกรด (pH 5.0) การตรวจวัดด้วย MS ใช้เครื่อง ion trap MS ควบคู่กับการแตกตัวด้วยสเปรย์ไฟฟ้า (electrospray ionization; ESI) ในโหมดแทนเดมแมสสเปกโตรมิทรี (MS/MS) โดยใช้แรงดันแก๊ส nebulizer 35 psi อัตราการไหลของแก๊สทำให้แห้ง 9 ลิตร/นาที และอุณหภูมิการทำให้แห้ง 325 °C วิธีวิเคราะห์ที่

พัฒนาขึ้นมีความเป็นเชิงเส้นที่ดี (r^2 = 0.979–0.999) ให้ค่าความเที่ยง (precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (%RSD = 3.4–26.6%) และความถูกต้อง (accuracy) อยู่ในช่วง %recovery 88.4–110.1% สามารถตรวจวัดได้ในระดับต่ำมาก โดยมีขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) อยู่ในช่วง 0.002–0.06 ไมโครกรัม/ลิตร และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) อยู่ในช่วง 0.005–0.25 ไมโครกรัม/ลิตร

F. Moragues et al. and Heliyon 10 (2024) ได้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อการตรวจหาสาร non-allowed nitrofurans จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ nifurpirinol และ metabolites ของ furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin, nitrofurazone, nifursol, nitrovin, and nifuroxazide ในเนื้อเยื่อสัตว์ ได้แก่ กล้ามเนื้อ (สัตว์ปีก โค แกะ สุกร กระต่าย และปลา) ไต (โค แกะ และสุกร) และไข่ โดยดำเนินการตามข้อกำหนดของระเบียบสหภาพยุโรป Regulation (EU) 2021/808 วิธีการดังกล่าวอาศัยการทำอนุพันธ์ด้วย 2-ไนโตรเบนซาลดีไฮด์ในสภาวะกรด จากนั้นทำการสกัดของเหลว-ของเหลวโดยช่วยด้วยการเขย่าแบบวอร์เท็กซ์ และทำการสกัดด้วย SPE (solid phase extraction) เพื่อทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) ภายใต้เงื่อนไขที่คัดเลือก วิธีนี้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้โดยให้ผลที่น่าพอใจในด้านผลกระทบของเมทริกซ์สัมพัทธ์ (relative matrix effects; CV ≤ 20%) ความเป็นเชิงเส้น (R^2 ≥ 0.98) ความถูกต้องเชิงจริง (trueness ไม่เกิน 20%) ความแม่นยำ (accuracy 83–120%) ความสามารถในการทำซ้ำ (repeatability 1.7–19.9%) ความสามารถในการทำซ้ำระหว่างสภาวะต่างกัน (reproducibility 1.9–25.7%) ความจำเพาะ (specificity โดยสัญญาณจากตัวอย่าง blank ≤30% ที่ระดับ LCL) และความทนทานของวิธี (ruggedness) ค่าขีดจำกัดการตัดสินใจเพื่อการยืนยันผล (decision limit for confirmation; CCα) ของสารเป้าหมายอยู่ในช่วง 0.27–0.35 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งทั้งหมดต่ำกว่าค่าจุดอ้างอิงสำหรับการดำเนินการ (reference point for action; RPA) ปัจจุบันที่ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Xinyi Wu *et al.* (2021) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ amphenicols และ metabolites ในเนื้อสุกร เนื้อโค เนื้อแกะ เนื้อไก่ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ โดยการใช้ solid-phase extraction (SPE) ร่วมกับเทคนิค UHPLC–MS/MS ทั้งนี้ตัวอย่างถูกสกัดด้วย ethyl acetate และ ammonia (98:2, v/v) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ SPE ชนิด CNW Si ขจัดไขมันด้วย n-hexane ที่อิ่มตัว acetonitrile แล้วนำสารวิเคราะห์ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วย UHPLC–MS/MS ค่าขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของสารวิเคราะห์ในเนื้อปศุสัตว์และสัตว์ปีกอยู่ในช่วง 0.03–1.50 μg/kg และค่าขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) อยู่ในช่วง 0.05–5.00 μg/kg ความเข้มข้นของ chloramphenicol, thiamphenicol และ florfenicol มีความเป็นเชิงเส้นในช่วง 0.50–50 μg/kg (r ≥ 0.9990) และความเข้มข้นของ florfenicol amine มีความเป็นเชิงเส้นในช่วง 5.00–200 μg/kg (r ≥ 0.9990) ค่าการกู้คืนของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอยู่ระหว่าง 72% ถึง 120% ค่าความแปรปรวนสัมพัทธ์ภายในวัน (intraday RSD) อยู่ในช่วง 1% ถึง 9% และค่าความแปรปรวนสัมพัทธ์ระหว่างวัน (interday RSD) อยู่ในช่วง 1% ถึง 12%

ทั้งนี้ Commission Regulation (EU) 2023/411 ได้กำหนด RPA ของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์เมตาบอไลท์เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมเช่นเดิม แต่ครอบคลุมชนิดของสารสำคัญเพิ่มขึ้นเป็น 5 ชนิด โดยสารเมตาบอไลท์ที่เพิ่มขึ้นมา ได้แก่ 3, dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH) ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ของยาไนฟูซอล (nifursol) ซึ่งจัดอยู่ในยากลุ่มไนโตรฟูแรนส์เช่นกัน

การศึกษาการทดสอบหาสารตกค้างกลุ่ม nitrofurans กลุ่ม nitroimidazoles และ chloramphenicol ในน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์ด้วยเครื่อง UHPLC–MS/MS ในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่มีความไว ความถูกต้อง ความแม่นยำ และเพิ่มชนิดสารให้ครอบคลุมสารถูกห้ามใช้ในสัตว์เลี้ยงมากยิ่งขึ้น เพื่อให้เพียงพอสำหรับการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำในฟาร์ม สนับสนุนการควบคุมความปลอดภัยตลอดห่วงโซ่อาหาร และเสริมสร้างความเชื่อมั่นในระบบการผลิตปศุสัตว์ที่ปลอดภัยและยั่งยืน

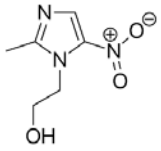


Fig 1. Structure of metronidazole

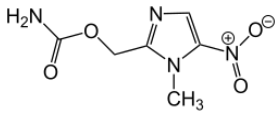


Fig 2. Structure of ronidazole

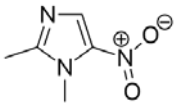


Fig 3. Structure of dimetridazole

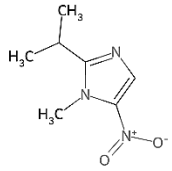


Fig 4. Structure of ipronidazole

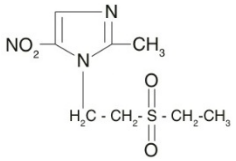


Fig 5. Structure of ternidazole

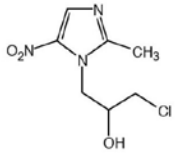


Fig 6. Structure of ornidazole

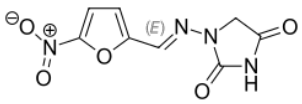


Fig 7. Structure of nitrofurazone

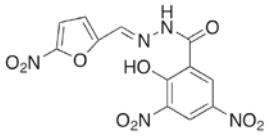


Fig 8. Structure of nifursol

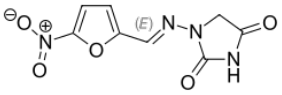


Fig 9. Structure of nitrofurantoin

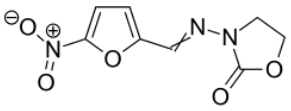


Fig 10. Structure of furazolidone

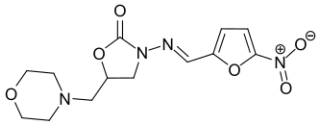


Fig 11. Structure of furaltadone

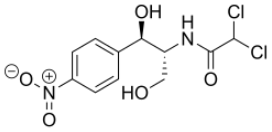


Fig 12. Structure of chloramphenicol

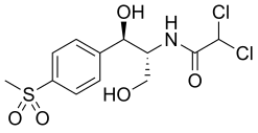


Fig 13. Structure of thiamphenicol

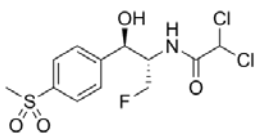


Fig 14. Structure of florfenicol

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารกลุ่ม nitrofurans จำนวน 5 ชนิดสาร (nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, furaltadone และ nifursol) กลุ่ม nitroimidazoles จำนวน 6 ชนิดสาร (metronidazole, ronidazole, dimetridazole ipronidazole, ternidazole และ ornidazole) และกลุ่ม amphenicols จำนวน 3 ชนิดสาร (chloramphenicol, florfenicol และ thiamphenicol) ในน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์ รวมจำนวน 14 ชนิดสาร ในครั้งเดียวกัน โดยเทคนิค ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS)

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับวิเคราะห์ยากลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols จำนวน 14 ชนิดในน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์โดยเทคนิค UHPLC–MS/MS และการสกัดตัวอย่างแบบ Solid phase extraction (SPE)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีทดสอบสำหรับวิเคราะห์ยากลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols จำนวน 14 ชนิดในน้ำใช้สำหรับฟาร์มปศุสัตว์โดยเทคนิค UHPLC–MS/MS และนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 เครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC รุ่น Vanquish UHPLC – TSQ Plus MS/MS

4.1.2 เครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060

4.1.3 ชุดผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูงพร้อมอุปกรณ์ ยี่ห้อ Thermo

4.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XP205DR

4.1.5 ตู้ดูดควัน (fume hood)

4.1.6 vacuum manifold ยี่ห้อ Supelco

4.1.7 เครื่องระเหยตัวอย่างด้วยก๊าซไนโตรเจน ยี่ห้อ Zymark รุ่น TurboVap LV และ ยี่ห้อ Caliper Life Sciences รุ่น Concentration Workstation

4.1.8 beaker ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร

4.1.9 volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

4.1.10 อ่างน้ำอัลตร้าโซนิค

4.1.11 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)

4.1.12 ชุดดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (micropipette) ขนาด 10 – 100, 20 – 200 และ 200 – 1000 µL

4.1.13 คอลัมน์ HPLC ชนิด C_{18} ขนาด 2.1 × 150 mm อนุภาค 1.7 µm ยี่ห้อ phenomenex

4.1.14 solution bottle ขนาด 100 และ 500 mL พร้อมฝา

4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

4.2.1 LC sample filter: nylon syringe filter ขนาด 13 mm, 0.2 µm

4.2.2 SPE column ชนิด polymeric HLB sorbent ขนาด 200mg/6mL

4.2.3 syringe ไม่มีหัวเข็ม ขนาด 1-3 mL Cylinder

4.2.4 พลาสติกขนาด 50 mL

4.2.5 evaporation Tube ขนาด 15 mL

4.2.6 vial ใส with screw cap ขนาด 2 mL

4.2.7 insert ขนาด 350 µL

4.2.8 pasture pipette

4.2.9 ลูกยางแดงและลูกยางซิลิโคน

4.2.10 ช้อนตักสารเคมีและช้อนตักสารมาตรฐาน

4.2.11 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ.cm (น้ำ DI)

4.2.12 acetonitrile (CH_3CN) ชนิด AR grade, HPLC grade และ LC-MS grade

4.2.13 methanol (CH_3OH) ชนิด HPLC grade

4.2.14 formic acid (CHOOH) ชนิด LC-MS grade

4.2.15 sodium thiosulfate pentahydrate ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) ชนิด AR grade

4.3 สารมาตรฐาน

4.3.1 nitrofurazone ($C_6H_6N_4O_4$), reference material grade

4.3.2 nitrofurazone-^{13}C-$^{15}N_2$ ($^{13}CC_5H_6O_4{}^{15}N_2N_2$), reference material grade

4.3.3 nitrofurantoin ($C_8H_6N_4O_5$), reference material grade

4.3.4 nitrofurantoin-$^{13}C_3$ ($^{13}C_3C_5H_6N_4O_5$), reference material grade

4.3.5 nifursol ($C_{12}H_7N_5O_9$) reference material grade

4.3.6 nifursol-$^{13}C_6$ ($C_6{}^{13}C_6H_7N_5O_9$) reference material grade

4.3.7 furazolidone ($C_8H_7N_3O_5$), reference material grade

4.3.8 furazolidone-D_4 ($C_8D_4H_3N_3O_5$), reference material grade

4.3.9 furaltadone ($C_{13}H_{16}N_4O_6$), reference material grade

4.3.10 furaltadone-D_5 ($C_{13}H_{11}D_5N_4O_6$), reference material grade

4.3.11 metronidazole ($C_6H_9N_3O_3$), reference material grade

4.3.12 metronidazole-D_4($C_6D_4H_5N_3O_3$), reference material grade

4.3.13 ronidazole ($C_6H_8N_4O_4$), reference material grade

4.3.14 ronidazole-D_3 ($C_6D_3H_5N_4O_4$), reference material grade

4.3.15 dimetridazole ($C_5H_7N_3O_2$), reference material grade

4.3.16 dimetridazole-D_3 ($C_5D_3H_4N_3O_2$), reference material grade

4.3.17 ipronidazole ($C_7H_{11}N_3O_2$), reference material grade

4.3.18 ipronidazole-D_3 ($C_7D_3H_8N_3O_2$), reference material grade

4.3.19 ternidazole ($C_7H_{11}N_3O_3$), reference material grade

4.3.20 ornidazole ($C_7H_{10}ClN_3O_3$), reference material grade

4.3.21 chloramphenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$), reference material grade

4.3.22 chloramphenicol-D_5 ($C_{11}D_5H_7Cl_2N_2O_5$), reference material grade

4.3.23 thiamphenicol ($C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$), reference material grade

4.3.24 florfenicol ($C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$), reference material grade

4.4 ขั้นตอนการพัฒนาวิธี

4.4.1 เตรียม stock standard solutions แยกกันทั้ง 14 ชนิด ให้มีความเข้มข้นประมาณ 400 – 1,000 mg/L โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดให้ได้เนื้อสารประมาณ 10 – 20 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 10 - 50 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile (เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) รายละเอียด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เตรียม stock standard solutions

ลำดับ	Name	ยี่ห้อ	lot.No	Purity %	Mw	น้ำหนัก mg	ปริมาตรที่เตรียม mL	ความเข้มข้น mg/L
1	metronidazole	HPC	808836	99.87	171.15	20.10	50	401
2	ronidazole	HPC	810670	99.30	200.15	20.12	50	400
3	dimetridazole	HPC	821761	99.60	141.13	20.15	50	401
4	ipronidazole	Dr.Ehrenstorfer	G1281904	99.50	169.18	20.41	50	406
5	nitrofurazone	HPC	825773	99.56	198.14	20.16	50	401
6	nitrofurantoin	Dr.Ehrenstorfer	G1195567	99.20	238.16	20.26	50	402
7	furazolidone	HPC	823933	99.95	225.16	20.06	50	401
8	furaltadone HCL	HPC	810805	99.81	360.75	20.26	50	404
9	chloramphenicol	Dr.Ehrenstorfer	G1399096	99.90	323.13	20.21	50	404
10	nifursol	HPC	804496	93.70	365.21	12.15	25	455
12	ornidazole	Dr.Ehrenstorfer	G139152	99.79	219.63	10.13	10	1011
13	ternidazole HCL	Witega	90216	99.00	185.18	10.15	10	1005
14	thiamphenicol	Dr.Ehrenstorfer	G988144	99.31	356.22	10.17	10	1010
15	florfenfinicol	Dr.Ehrenstorfer	90626	99.00	356.22	10.18	10	1008

4.4.2 optimize mass สารทั้ง 14 ชนิด (nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, furaltadone และ nifursol) กลุ่ม nitroimidazoles จำนวน 6 ชนิดสาร (metronidazole, ronidazole, dimetridazole ipronidazole, ternidazole และ ornidazole) และกลุ่ม amphenicols จำนวน 3 ชนิดสาร (chloramphenicol, florfenicol และ thiamphenicol) โดยเตรียมสารทั้ง 14 ชนิด แยกกันที่ความเข้มข้น 1 mg/L ใน acetonitrile และนำไป optimize

4.4.2.1 optimize mass สารทั้ง 14 ชนิดด้วยเครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC รุ่น Vanquish UHPLC – TSQ Plus MS/MS ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการ optimize mass ของสารทั้ง 14 ชนิด ด้วยเครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC

No.	Compounds	MW	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
1	metronidazole	171.16	positive	172.02	81.967	25.77	111
					127.967	14.45	111
2	ronidazole	200.15	positive	200.98	54.967	23.76	89
					139.967	11.87	89
3	dimetridazole	141.13	positive	141.98	80.72	27.84	117
					95.72	17.32	117
4	ipronidazole	169.18	positive	170.07	108.967	25.98	139
					123.967	18.32	139
5	furazolidone	225.16	positive	225.98	121.883	22.54	127
					138.883	15.81	127
6	furaltadone	324.29	positive	325.03	252.05	16.17	142
					281.05	11.23	142
7	nitrofurazone	198.14	negative	196.88	123.883	8.72	88
					149.883	7.65	99
8	nitrofurantoin	238.16	negative	236.93	123.883	15.81	123
					151.883	12.16	123
9	chloramphenicol	323.13	negative	321.02	151.967	16.39	167
					256.883	10.66	167
10	nifursol	365.21	negative	363.7	181.9	20.0	216
					182.9	28.0	216
11	ternidazole	185.18	positive	185.88	127.8	16.0	130
					81.97	27.3	130
12	ornidazole	219.63	positive	219.88	127.8	17.2	155
					81.88	30.6	155
13	florfenicol	358.21	negative	356.17	335.9	9.0	162
					184.9	19.0	162
14	thiamphenicol	356.22	positive	356.0	307.9	25.0	147
					228.8	16.0	147
15	thiamphenicol	356.22	negative	354.3	290	21.0	191
					184.9	13.0	191

4.4.2.2 optimize mass สารทั้ง 14 ชนิดด้วยเครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060 ได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการ optimize mass ของสารทั้ง 14 ชนิดด้วยเครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060

compound	MW	Polarity	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (ms)	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
metronidazole	171.16	positive	172.05	128.1	47	-20	-15.5	-22
				82.1	47	-19	-23.6	-18
ronidazole	200.15	positive	201.1	140.15	34	-15	-12.6	-22
				55.05	34	-23	-22.1	-21
dimetridazole	141.13	positive	142.1	96.1	34	-10	-30	-28
				81.1	34	-15	-15	-14
ipronidazole	169.18	positive	170.15	109.1	46	-19	-27.1	-21
				124.15	46	-19	-20.8	-23
ornidazole	219.63	positive	220.0	128.1	34	-11	-16	-12
				82.1	34	-11	-29.9	-14
ternidazole	185.18	positive	186.1	128.1	34	-14	-16	-12
				82.1	34	-13	-27	-14
nitrofurazone	198.14	negative	196.8	124	100	21	9.5	20
				149.9	100	22	10.2	10
nitrofurantoin	238.16	negative	236.75	124.1	90	25	13.4	24
				151.9	90	25	12.4	27
furazolidone	225.16	positive	226.05	122.1	34	-17	-20.2	-26
				139.1	34	-16	-14.4	-22
furaltadone	324.29	positive	325.15	252.15	34	-12	-17.1	-25
				281.15	34	-12	-12.4	-13
nifursol	365.21	negative	363.8	181.8	30	18	20.5	18
				182.9	30	18	25	18
chloramphenicol	323.13	negative	321.05	152.05	46	12	16.9	23
				257.05	46	16	10.8	18
thiamphenicol	356.22	positive	356.0	307.9	34	-14	-25	-12
				228.8	34	-13	-16	-14
thiamphenicol	356.22	negative	354.15	185.05	34	13	20	12
				290	34	13	12.6	14
florfenicol	358.21	negative	356.1	336	30	18	9	22
				185	30	18	18	18

4.4.3 ขั้นตอนการปรับ condition สำหรับ HPLC

4.4.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับทดสอบ condition HPLC โดยเตรียมจาก stock standard solutions ข้อ 4.4.2 รายละเอียดดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 เตรียม mixed intermediate standards solution A

ลำดับ	Name	Stock std. solution concentration	Volume of stock std. solution (mL)	Final volume	Intermediate std. solution A concentration (µg/L)
1	metronidazole	401	0.039		625
2	ronidazole	400	0.195		3125
3	dimetridazole	401	0.039		625
4	ipronidazole	406	0.038		625
5	furazolidone	401	0.390	25	6250
6	furaltadone HCL	404	0.116		1875
7	nifursol	455	0.052		937.5
8	ornidazole	1011	0.155		6250
9	ternidazole HCL	1005	0.156		6250
10	florfenfinicol	1008	0.155		6250

ตารางที่ 5 เตรียม mixed intermediate standards solution B และ mixed working standards solution

ลำดับ	Name	Intermediate std. solution B				Mixed working std.		
		Stock& Intermediate std. A conc.(mg/L)	Volume of stock& Intermediate A (mL)	Final volume	concentration (mg/L)	Volume of Intermediate B (mL)	Final volume	concentration (µg/L)
1	metronidazole	625			25			1
2	ronidazole	3125			125			5
3	dimetridazole	625			25			1
4	ipronidazole	625			25			1
5	furazolidone	6250	1 (A)		250			10
6	furaltadone HCL	1875			75			3
7	nifursol	938		25	37.5	1(B)	25	1.5
8	ornidazole	6250			250			10
9	ternidazole HCL	6250			250			10
10	florfenfinicol	6250			250			10
11	nitrofurazone	401	0.047		625			30
12	nitrofurantoin	402	0.016		3125			10
13	chloramphenicol	404	0.015		625			10
14	thiamphenicol	1010	0.062		625			100

4.4.3.2 ฉีด mixed working standards solution ผ่านคอลัมน์ HPLC ชนิด C18 ขนาด 2.1 x 100 mm อนุภาค 1.7 µm โดยใช้ SRM working parameters จากตารางที่ 3 และ 4 และตั้งค่า LC condition และ ion source properties ดังตารางที่ 6 และ 7

ตารางที่ 6 LC condition

parameters		value	
mobile phase:	Time	A:0.1 % Formic acid in water	B:0.1 % Formic acid in acetonitrile
	0.0	88	12
	5.0	20	80
	8.0	20	80
	10.0	88	12
flow rate:	0.3 mL/min		
column temperature:	35 °C		
sample temperature:	15 °C		
injection volume:	10 µL		

ตารางที่ 7 LC condition ที่ทำการปรับสำหรับฉีดด้วยเครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060

parameters		value	
mobile phase:	Time	A:0.1 % Formic acid in water	B:0.1 % Formic acid in acetonitrile
	0.0	88	12
	6.0	20	80
	7.0	20	80
	10.0	88	12
flow rate:	0.3 mL/min		
column temperature:	35 °C		
sample temperature:	15 °C		
injection volume:	10 µL		

ตารางที่ 8 ค่า ion source properties (เครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC รุ่น Vanquish UHPLC – TSQ Plus MS/MS)

parameters	value
Ion Source Type	H-ESI
Spray Voltage	Static
Positive Ion (V)	3500
Negative Ion (V)	2500
Current LC Flow (µL/min)	ไม่ตั้งค่า
Sheat Gas (Arb)	50
Aux Gas (Arb)	10
Sweep Gas (Arb)	1
Ion Transfer Tube Temp (°C)	320
Vaporizer Temp (°C)	300
APPI Lamp	Not in Use
FAIMS Mode	Not Installed

ตารางที่ 9 ค่า ion source properties (เครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060)

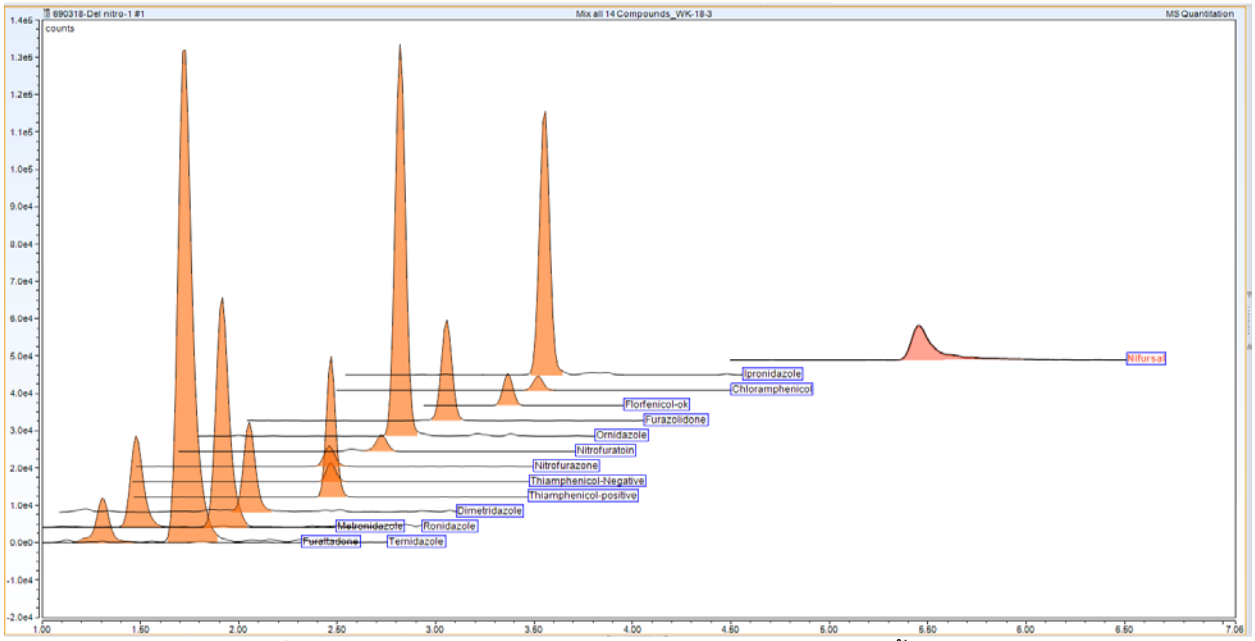
parameters	value
Nebulizing Gas Flow	3.0 L/min
Heating Gas Flow	10.0 L/min
Interface	ESI
Interface Voltage	4.0 kV
Interface Temperature	300 °C
Desolvation Temperature	526 °C
DL Temperature	250 °C
Heat Block Temperature	400 °C
Drying Gas Flow	10.0 L/min

5. ผลการทดลอง

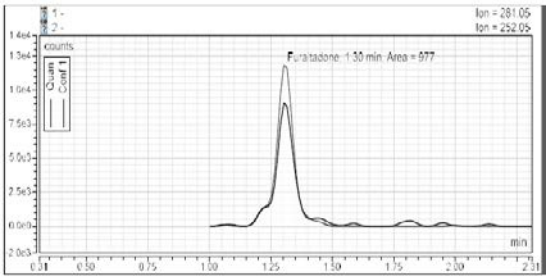
5.1 ผลการทดลองโดยใช้เครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC รุ่น Vanquish UHPLC – TSQ Plus MS/MS

5.1.1 ผลการ optimize mass สารทั้ง 14 ชนิด ได้ค่าตามตารางที่ 3 ซึ่งให้ผลเป็นไปตามเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องยกเว้น thiamphenicol ผลจากการ optimize แบบ negative mode ได้ intensity ต่ำกว่า แบบ positive mode จึงใช้ทั้ง 2 mode ในการพัฒนาวิธีทดสอบต่อไป

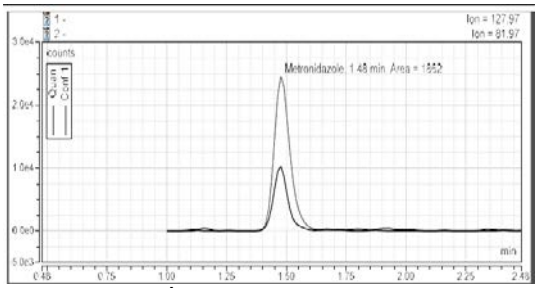
5.1.2 ผลการฉีด mixed working standards solution ผ่านคอลัมน์ HPLC ชนิด C18 ขนาด 2.1 x 100 mm อนุภาค 1.7 µm ตาม MS condition ตามตารางที่ 3 และ LC condition ตามตารางที่ 7 พบ peak precursor และ product ion ของสารทั้ง 14 ชนิด ดังรูปที่ 1 – 16



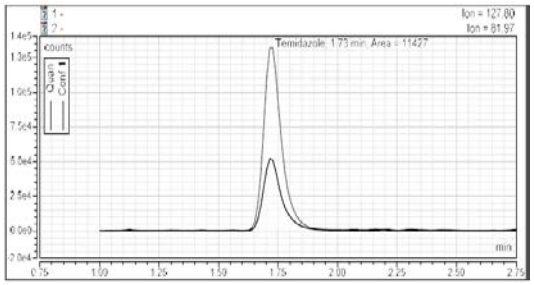
รูปที่ 1 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของสารทั้ง 14 ชนิด



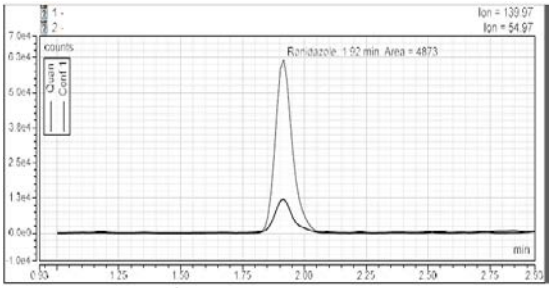
รูปที่ 2 furaltadone



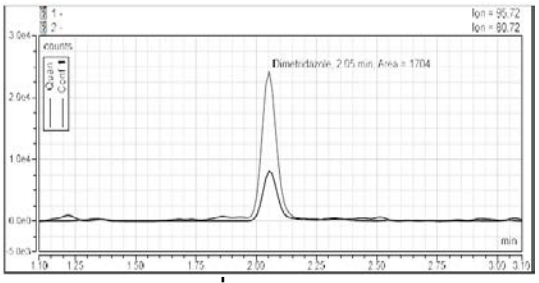
รูปที่ 3 metronidazole



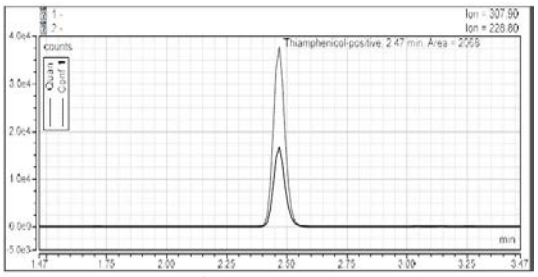
รูปที่ 4 ternidazole



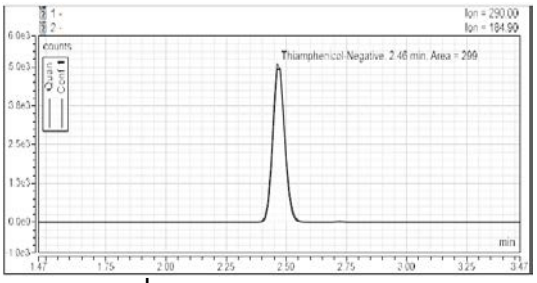
รูปที่ 5 ronidazole



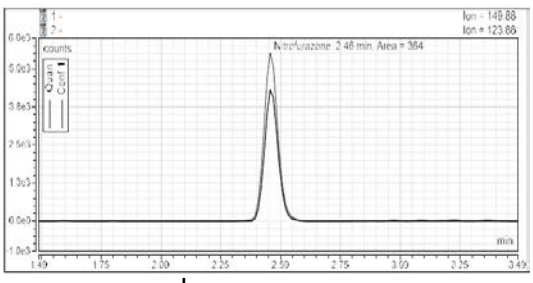
รูปที่ 6 dimetridazole



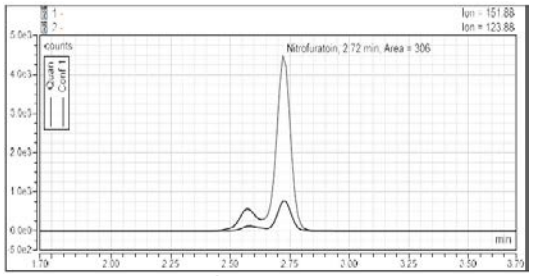
รูปที่ 7 thiamphenicol-positive



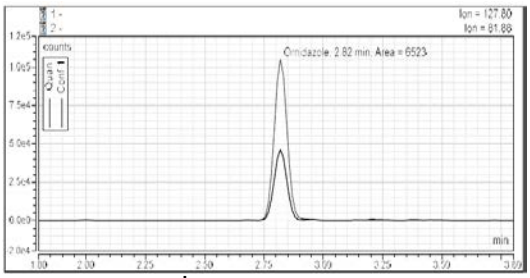
รูปที่ 8 thiamphenicol-negative



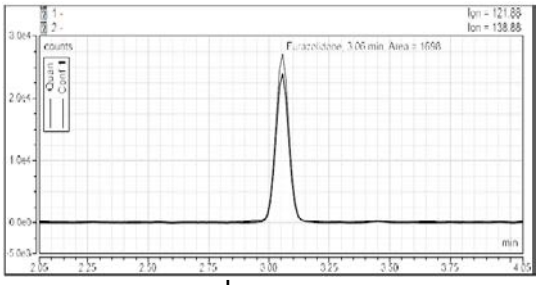
รูปที่ 9 nitrofurazone



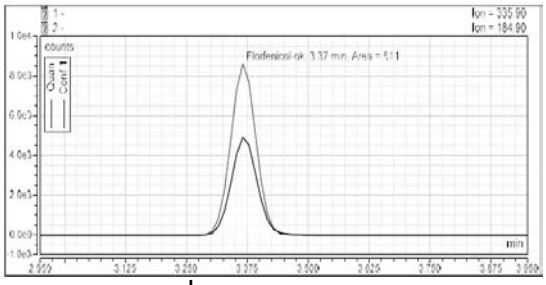
รูปที่ 10 nitrofurantoin



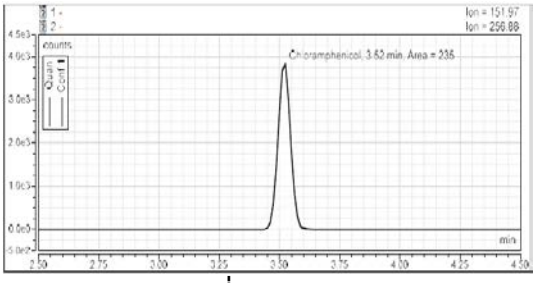
รูปที่ 11 ornidazole



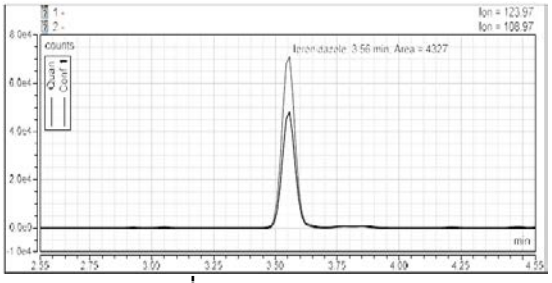
รูปที่ 12 furazolidone



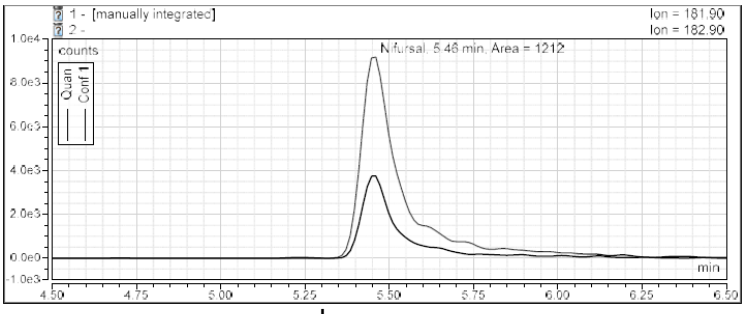
รูปที่ 13 florfenfinicol



รูปที่ 14 chloramphenicol



รูปที่ 15 Ipronidazole



รูปที่ 16 nifursol

5.1.3 ผลการคำนวณ precision ของระบบ โดยการฉีด mixed working standards solution จำนวน 3 ซ้ำ โดย retention time ของการฉีดซ้ำของ 3 injections ต้องไม่เกิน ± 0.1 min

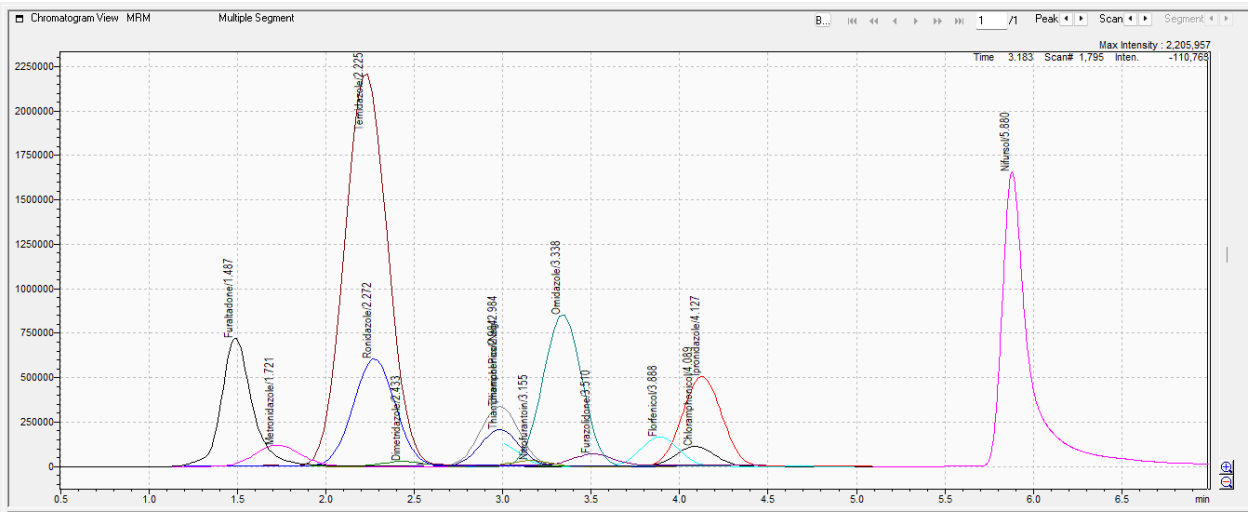
ตารางที่ 10 ผลการฉีด mixed working standards solution จำนวน 3 ซ้ำ

compound	retention time			Δ RT< ± 0.1 min
	1	2	3	
metronidazole	1.477	1.464	1.464	0.013
ronidazole	1.916	1.904	1.903	0.013
dimetridazole	2.053	2.04	2.053	0.013
ipronidazole	3.557	3.554	3.554	0.003
ornidazole	2.819	2.818	2.818	0.001
ternidazole HCL	1.728	1.703	1.715	0.025
nitrofurazone	2.457	2.457	2.457	0.000
nitrofurantoin	2.721	2.721	2.721	0.000
furazolidone	3.057	3.044	3.057	0.013
furaltadone HCL	1.303	1.303	1.303	0.000
nifursol	5.460	5.460	5.460	0.000
chloramphenicol	3.524	3.521	3.524	0.000
thiamphenicol-positive	2.469	2.468	2.468	0.001
thiamphenicol-negative	2.462	2.461	2.461	0.001
florfenfinicol	3.366	3.366	3.365	0.001

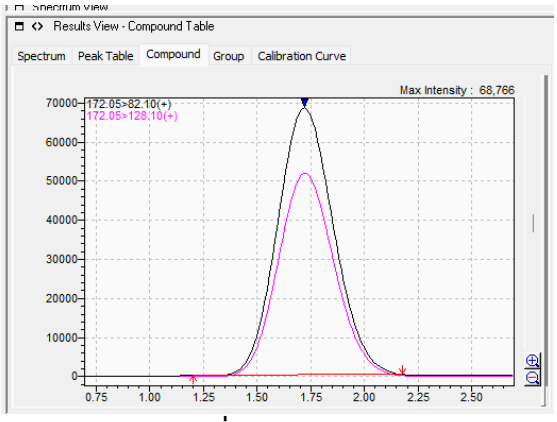
5.2 ผลการทดลองโดยใช้เครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือสำหรับพัฒนาวิธีทดสอบ เนื่องจากเครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC มีการใช้งานตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างตามแผนประจำปี เป็นจำนวนมากทำให้ไม่สามารถดำเนินการต่อได้

5.2.1 ผลการ Optimize mass สารทั้ง 14 ชนิด ได้ค่าตามตารางที่ 4 ซึ่งให้ผลเป็นไปตามเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องโดย thiamphenicol ได้ sensitivity จากการ optimize แบบ negative mode สูงกว่าแบบ positive mode ซึ่งแตกต่างจากการ optimize ด้วยเครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC

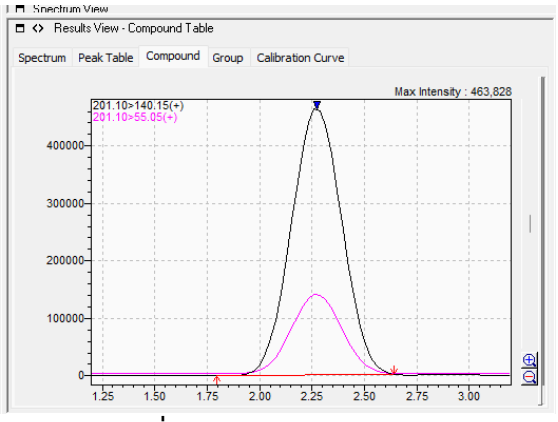
5.2.2 ผลการฉีด mixed working standards solution ผ่านคอลัมน์ HPLC ชนิด C18 ขนาด 2.1 x 100 mm อนุภาค 1.7 µm ตาม MS condition ตามตารางที่ 4 และ LC condition ตามตารางที่ 8 พบ peak precursor และ product ion ของสารทั้ง 14 ชนิด ดังรูปที่ 17 – 32



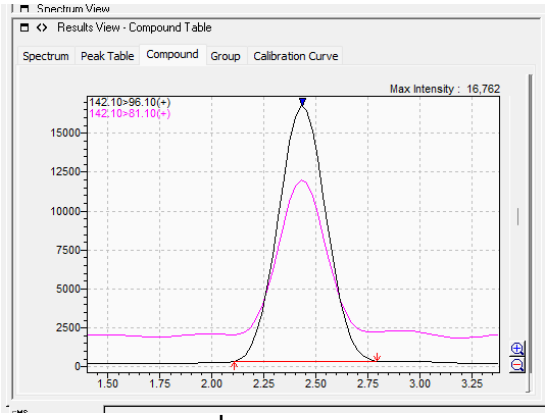
รูปที่ 17 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของสารทั้ง 14 ชนิด



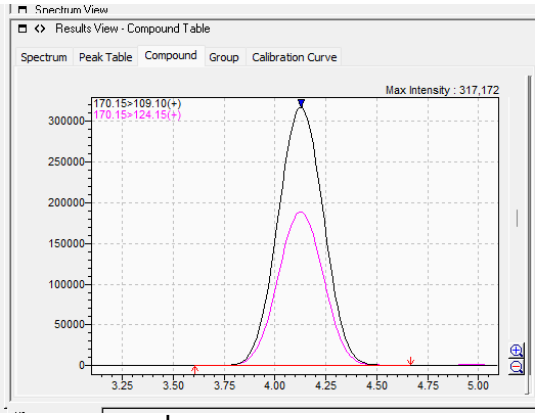
รูปที่ 18 metronidazole



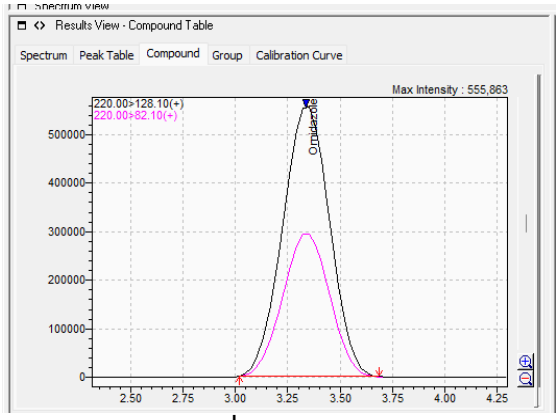
รูปที่ 19 ronidazole



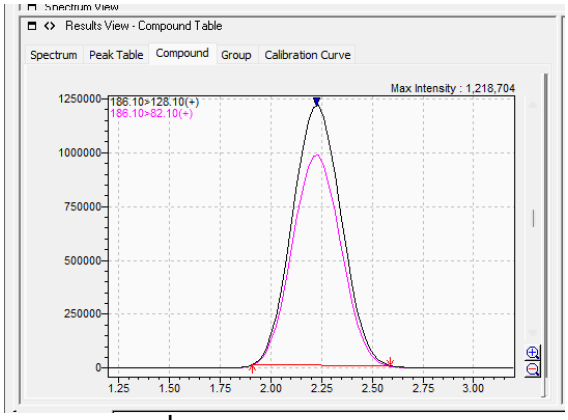
รูปที่ 20 dimetridazole



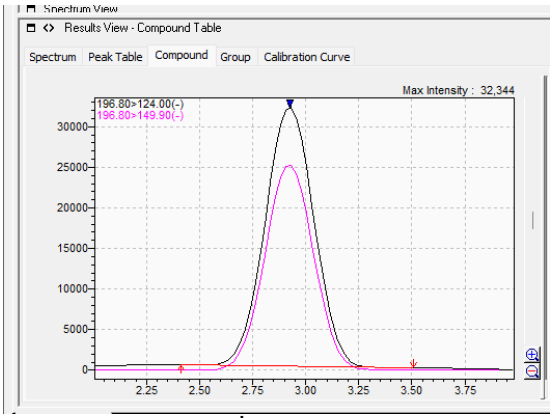
รูปที่ 21 ipronidazole



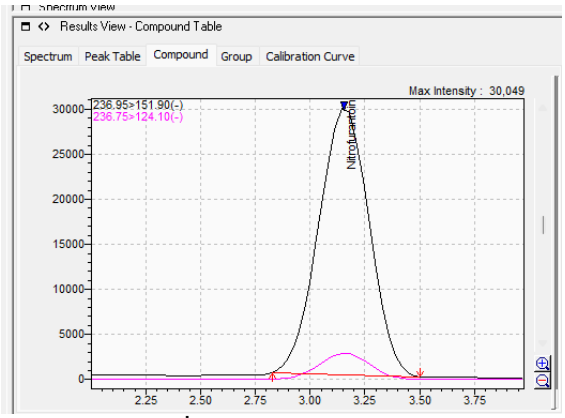
รูปที่ 22 ornidazole



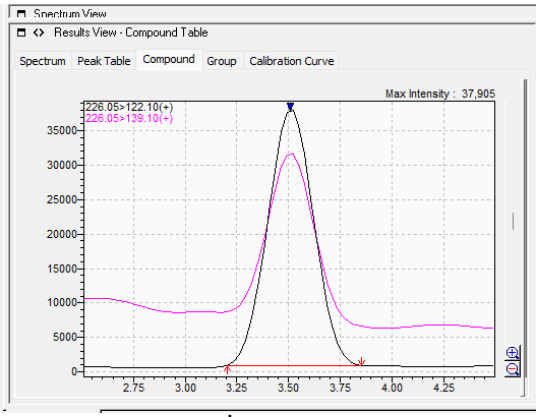
รูปที่ 23 ternidazole



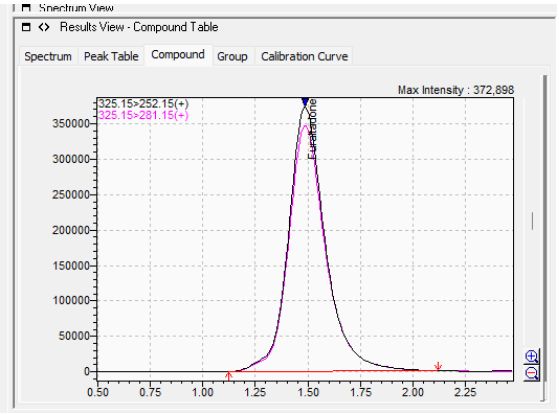
รูปที่ 24 nitrofurazone



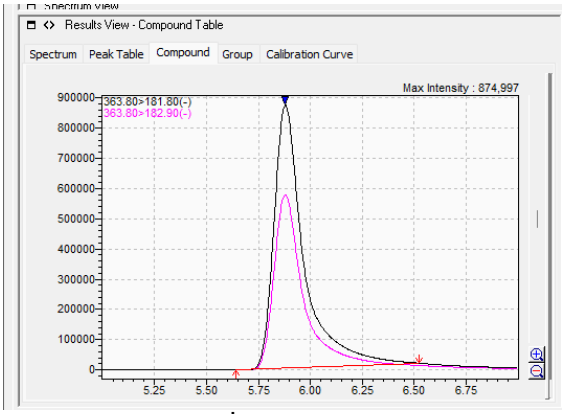
รูปที่ 25 nitrofurantoin



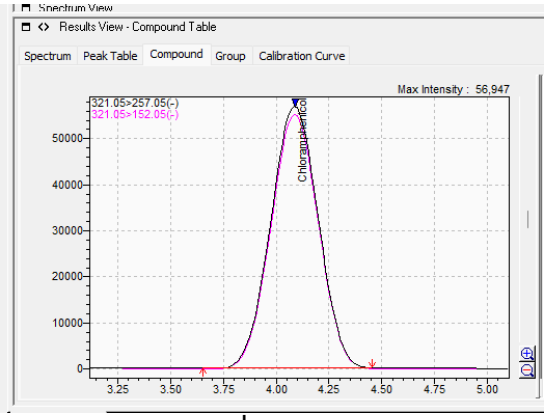
รูปที่ 26 furazolidone



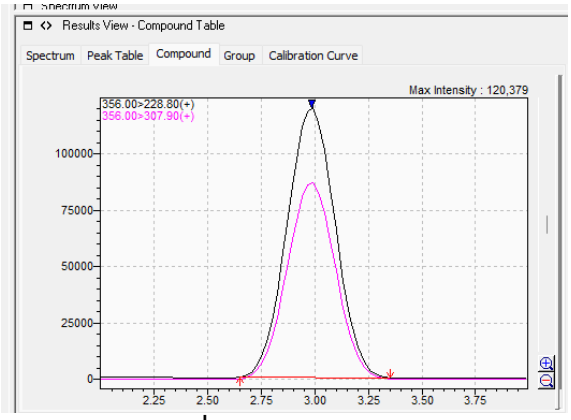
รูปที่ 27 furaltadone



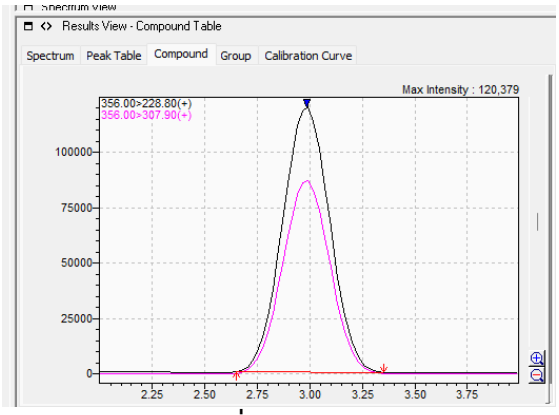
รูปที่ 28 nifursol



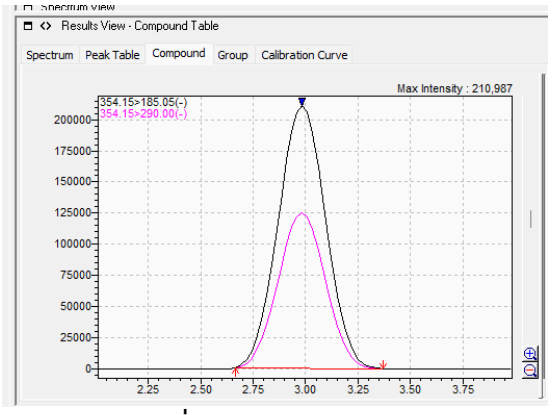
รูปที่ 29 chloramphenicol



รูปที่ 30 florfenfinicol



รูปที่ 31 thiamphenicol-positive



รูปที่ 32 thiamphenicol-negative

6. สรุปผลการทดลอง

6.1 สรุปผลการทดลองโดยใช้เครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC รุ่น Vanquish UHPLC – TSQ Plus MS/MS

6.1.1 ได้วิธี MS condition สำหรับทดสอบสารสารทั้ง 14 ชนิด (nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, furaltadone และ nifursol) กลุ่ม nitroimidazoles จำนวน 6 ชนิดสาร (metronidazole, ronidazole, dimetridazole ipronidazole, ternidazole และ ornidazole) และกลุ่ม amphenicols จำนวน 3 ชนิดสาร (chloramphenicol, florfenicol และ thiamphenicol)

6.1.2 ได้วิธี LC condition สำหรับทดสอบสารสารทั้ง 14 ชนิดข้างต้น อาจต้องมีการปรับอัตราส่วน mobile phase ให้ได้พีคทีสมมาตรมากขึ้น

6.1.3 พารามิเตอร์ของ LC-MS/MS condition มีความเที่ยง โดย retention time ของการฉีดซ้ำของ 3 injections ทั้ง 14 ชนิดสาร ไม่เกิน ± 0.1 min

6.2 สรุปผลการทดลองโดยใช้เครื่อง UHPLC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060

6.2.1 ได้วิธี MS condition สำหรับทดสอบสารสารทั้ง 14 ชนิด (nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, furaltadone และ nifursol) กลุ่ม nitroimidazoles จำนวน 6 ชนิดสาร (metronidazole, ronidazole, dimetridazole ipronidazole, ternidazole และ ornidazole) และกลุ่ม amphenicols จำนวน 3 ชนิดสาร (chloramphenicol, florfenicol และ thiamphenicol)

6.2.2 ได้วิธี LC condition สำหรับทดสอบสารสารทั้ง 14 ชนิดข้างต้น

6.2.3 พารามิเตอร์ของ LC-MS/MS condition มีความเที่ยง โดย retention time ของการฉีดซ้ำของ 3 injections ทั้ง 14 ชนิดสาร ไม่เกิน ± 0.1 min

7. ข้อเสนอแนะ

-

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2569 ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน ผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่ให้คำแนะนำและข้อมูลทางวิชาการที่เป็นประโยชน์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 18 ง วันที่ 22 มกราคม 2559.

Ardsoongnearn, C. , O. Boonbanlu, S. Kittijaruwattana, and L. Suntornsuk. 2014. Liquid Chromatography and Ion Trap Mass Spectrometry for Simultaneous and Multiclass Analysis of Antimicrobial Residues in Feed Water. Journal of Chromatography B. 945 - 946: 31 - 38.

European Commission. (1996). Commission Regulation (EU) 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC

European Commission. (2010). 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, L 15, 1-72.

European Commission. (2021). Commission Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC.

European Commission. (2023). Commission Regulation (EU) 2023/411 of 23 February 2023 amending Regulation (EU) 2019/1871 as regards the application of reference points for action for nitrofurans and their metabolites.

Moragues, F., Miralles, P., Igualada, C., & Coscollà, C. (Year). Determination of nitrofuran metabolites and nifurpirinol in animal tissues and eggs by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry validated according to Regulation (EU) 2021/808.

Xinyi Wu, Xixi Shen, Xiangyue Cao, et al. (2021) Simultaneous Determination of Amphenicols and Metabolites in Animal-Derived Foods Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.