รายงานความก้าวหน้า

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Aminoglycosides ในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

ผู้รับผิดชอบ 1. นางสาวเกศินี ลี้เจริญสุข นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
2. นายธนวัฒน์ ไชยนันท์รดิศ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผู้ควบคุมดูแลโครงการ นางสาววราภรณ์ รักษาพล ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการ
หัวหน้างานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน
กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Aminoglycosides ในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

ขอบข่าย

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Aminoglycosides ในเนื้อสัตว์ จำนวน 8 สาร (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1) โดยเทคนิค LC-MS/MS

ตารางที่ 1 สารมาตรฐาน และ Internal standard ที่จะพัฒนาวิธี

ลำดับ	สารมาตรฐาน	Internal standard
1	Apramycin sulfate	Tobramycin
2	Spectinomycin hydrochloride	
3	Gentamicin sulfate	
4	Kanamycin sulfate	
5	Neomycin sulfate	Ribostamycin
6	Paromomycin sulfate	
7	Dihydrostreptomycin sulfate	N-methyl-dihydrostreptomycin
8	Streptomycin sulfate	

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Aminoglycosides ในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่มดังกล่าว จำนวน 8 สารที่ระดับความเข้มข้น ½ EU MRL หรือต่ำกว่า

วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Aminoglycosides ในเนื้อสัตว์โดยเทคนิค 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 Aminoglycosides ในเนื้อสัตว์ ตามวิธีอ้างอิงที่เลือกมา และปรับเปลี่ยนวิธีสกัดให้เหมาะสม และผ่านเกณฑ์การยอมรับตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป

4. ประมวลผล สรุป และจัดทำรูปเล่ม

ความก้าวหน้าของโครงการ

1. จากการศึกษาเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Aminoglycosides ในเนื้อสัตว์ ผู้วิเคราะห์ใช้ข้อมูลอ้างอิงมาทดลอง และปรับปรุงวิธีสกัด ดังนี้

1.1 Reference: ANSES/LMV/16/01 version 1

1.2 The confirmation and quantification of selected aminoglycoside residues in animal tissue and bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry (Plozza, T., Trenerry, V.C., Zeglinski, P. and et al., 2011, pp.1077-1084)

2. จัดสารเคมี สารมาตรฐาน และวัสดุอุปกรณ์ ที่ต้องใช้ครบถ้วนแล้ว ดังนี้

2.1 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ Acetonitrile, Methanol

2.2 สารเคมีเกรด AR หรือ reagent ได้แก่ Ammonium acetate, Sodium chloride, Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Trichloroacetic acid, Citric acid, Heptafluorobutyric acid, Tri-sodium citrate, Sodium hydroxide, Formic acid, Hydrochloric acid, Pentafluoropropionic acid

2.3 Deionized water (ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ)

2.4 สารมาตรฐาน ซึ่งมีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 80% ได้แก่ Apramycin sulfate, Spectinomycin hydrochloride, Gentamicin sulfate, Kanamycin sulfate, Neomycin sulfate, Paromomycin sulfate, Dihydrostreptomycin sulfate, Streptomycin sulfate

2.5 สาร Internal standard ซึ่งมีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 80% ได้แก่ Tobramycin, Ribostamycin, N-methyl-dihydrostreptomycin

2.6 HPLC column ยี่ห้อ Waters รุ่น ZORBAX SB-C18 ขนาด 4.6 x 150 mm., 3.5 μm

2.7 SPE ยี่ห้อ Waters ชนิด WCX ขนาด 60 mg/3 ml

2.8 เครื่องมือและอุปกรณ์ ดังนี้ เครื่อง LC-MS/MS ซึ่งประกอบด้วย 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+

3. อยู่ในระหว่างดำเนินการหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS และทดสอบวิธีสกัด ดังนี้

3.1 Optimize เครื่อง LC-MS/MS โดยใช้สารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ ได้ผล m/z ของสารดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดของสารกลุ่ม Aminoglycosides

ลำดับ	ชื่อสาร		ชื่อย่อ	Precursor ion	Product ion	
					1°	2°
1	STD	Apramycin	APR	540.38	217.00	378.10
2		Spectinomycin	SPC	351.14	333.20	98.00
3		Gentamicin C1	GEN C1	478.14	322.10	159.80
4		Gentamicin C1a	GEN C1a	450.22	321.90	159.80
5		Gentamicin C2+C2a	GEN C2+C2a	464.23	322.00	160.00
6		Kanamycin	KAN	485.27	163.10	324.00
7		Neomycin	NEO	615.31	160.80	293.10
8		Paromomycin	PAR	616.21	293.00	163.00
9		Dihydrostreptomycin	DHS	584.38	246.20	263.00
10		Streptomycin	STR	351.14	333.20	98.00
11	IS	Tobramycin	TOB	465.200	154.200	-
12		Ribostamycin	RIB	อยู่ในระหว่างดำเนินการ	อยู่ในระหว่างดำเนินการ	อยู่ในระหว่างดำเนินการ
13		N-methyl-dihydrostreptomycin	DHS-Me	อยู่ในระหว่างดำเนินการ	อยู่ในระหว่างดำเนินการ	อยู่ในระหว่างดำเนินการ

ปัญหาอุปสรรค

ไม่สามารถดำเนินการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Aminoglycosides ในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ให้แล้วเสร็จได้ในปีงบประมาณ 2569 เนื่องจากจัดซื้อและได้รับ Paromomycin sulfate, Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate, Ribostamycin sulfate และ N-methyl-Dihydrostreptomycin ซึ่งใช้สำหรับดำเนินการหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS และทดสอบวิธีสกัดล่าช้า (ได้รับ Paromomycin sulfate, Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate, Ribostamycin sulfate เมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2569 และได้รับ N-methyl-Dihydrostreptomycin เมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2569) ทั้งนี้จะดำเนินการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีให้แล้วเสร็จภายในปีงบประมาณ 2569