

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Sudan Dyes, Para Red และ Rhodamine B chloride ในไข่แดงด้วยวิธี LC-MS/MS

วิภาดา สิริสมภพชัย สราวุธ ชูกระชั้น สุจิตรา ยศวันทา พนิดา ไกล่กลาง

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์สาร sudan dyes 7 ชนิด ที่ประกอบด้วย sudan I-IV, sudan orange G, sudan red 7B และ sudan yellow สาร para red และ rhodamine B chloride ในไข่แดงด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Triple Quadrupole) ซึ่งสามารถสกัดสารออกจากตัวอย่างไข่ได้โดยการเติมตัวทำละลายผสม acetonitrile : ethyl acetate (1:1) ขจัดสิ่งกีดขวางการตรวจวิเคราะห์โดยทำให้ตกตะกอนด้วยการเติมน้ำ ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะสารชั้นบนไประเหยด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรด้วย 0.1% formic acid in H₂O : 0.1% formic in acetonitrile (8:2) ตรวจวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง 0.1% formic acid in H₂O : 0.1% formic in acetonitrile (8:2) และตรวจวัดชนิดและปริมาณสารด้วยเทคนิค triple quadrupole mass spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของสารที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุแบบ Electrospray ionization (ESI) จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่ามีความสัมพันธ์การตัดสินใจ (R^2) ของการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.9924-0.9995 และมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 2 และ 10 µg/kg ตามลำดับในทุกสาร ยกเว้นสาร Rhodamine B ซึ่งมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 8 และ 25 µg/kg ตามลำดับ

คำสำคัญ : Sudan Dyes Para Red Rhodamine B chloride LC-MS/MS ทดสอบความใช้ได้ของวิธี ไข่แดง

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000; โทรศัพท์ 0-2967-9727

Method Validation of Sudan Dyes, Para Red and Rhodamine B chloride in Egg Yolk by LC-MS/MS

Wiphada Sirisomphobchai Sarawut Chookrachun Sujittra Yoswantha Panida Klaiklang

ABSTRACT

A method for analysis of seven Sudan dyes (Sudan I-IV, Sudan Orange G, Sudan Red 7B and Sudan Yellow), Para red and Rhodamine B chloride in egg yolk was developed by LC-MS/MS (Triple Quadrupole). The seven Sudan dyes, Para red and Rhodamine B chloride in egg yolk were extracted with acetonitrile : ethyl acetate (1:1). Impurities were precipitated from the sample extract by adding water. Kept refrigerated at -20°C for 20 min. The sample extract was centrifuged and the supernatant was evaporated to dryness using a nitrogen evaporator. The residue was reconstituted in the mixture of 0.1% formic acid in H₂O : 0.1% formic in acetonitrile (8:2). The HPLC separation was performed on a C18 column with gradient elution of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile (8:2) as the mobile phase. The triple quadrupole mass spectrometer (MS/MS) technique was used to confirm and quantify analytes using mass per charge (m/z) in electrospray positive ionization mode (ESI+). The recoveries of nine dyes in spiked sample at 100 µg/kg were in the range from 92.03% to 108.43%. Linearity of around 5 orders of the matrix match standard solution was obtained with coefficient of determination (R^2) ranging from 0.9924 to 0.9995. Limit of Detection (LOD) of Rhodamine B and other analytes were 8 and 2 µg/kg, and Limit of Quantitation (LOQ) of Rhodamine B and other analytes were 25 and 10 µg/kg, respectively.

Keywords : Sudan Dyes Para Red Rhodamine B chloride LC-MS/MS Method Validation Egg Yolk

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development, Tivanont Road, Bangkadi Subdistrict, Muang District, Pathum Thani Province, 12000; Tel. 0-2967-9727

การทดสอบความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สาร Sudan Dyes, Para Red และ Rhodamine B chloride ในไข่แดงด้วยวิธี LC-MS/MS

วิภาดา สิริสมภพชัย สราวุธ ชูกระชั้น สุจิตรา ยศวันทา พนิดา ไกล่กลาง

บทนำ

สีซูดาน (sudan dye) คือ กลุ่มสารเคมีย้อมสี (chemical dye) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่ไม่ใช่อาหาร เช่น เป็นตัวละลายในสีน้ำมัน ขี้ผึ้ง น้ำมันเบนซิน น้ำมันขั้วรองเท้า และน้ำยาขัดพื้น เป็นต้น ดังนั้น จึงไม่อนุญาตให้ผสมในอาหารและห้ามนำเข้าสารดังกล่าวในอังกฤษและทั่วทั้งสหภาพยุโรป เนื่องจากเป็นสารเคมีทำให้เกิดพิษ และมีผลต่อการเกิดมะเร็งตามการจัดกลุ่มของสถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ (The International Agency for Research on Cancer, IARC) ที่ได้จัดให้สี sudan I sudan II sudan III และ sudan IV อยู่ในกลุ่ม 3 คือไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (Group 3 : not classifiable as to its carcinogenicity) (Xiaolin *et.al.*, 2010) ด้วยเหตุที่สีในกลุ่มนี้มีราคาถูก ให้สีที่สดใสและคงอยู่ได้นาน จึงยังมีการพบได้ในอาหารสัตว์ปีก (DU and SUN, 2007) เพื่อให้ไข่ของสัตว์ปีกมีสีแดง ดังนั้นห้องปฏิบัติการงานเคมีอาหาร สารตกค้าง และสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จึงได้พัฒนาและทดสอบความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สารให้สี เช่น sudan, para red และ rhodamine B chloride ในไข่แดงด้วยวิธี LC-MS/MS เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจติดตามและเฝ้าระวังสารให้สีที่มีการห้ามใช้

1. วัตถุประสงค์

เพื่อให้ได้วิธีทดสอบที่เชื่อถือได้และเหมาะสมสำหรับการทดสอบสาร sudan dye ในไข่แดงด้วยวิธี LC-MS/MS ของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

2. ขอบข่าย

ดำเนินการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารให้สี sudan จำนวน 7 ชนิด para red และ rhodamine B chloride ในไข่ด้วยวิธี LC-MS/MS ชนิด triple quadrupole ตามแนวทางของ EURACHEM (2014) โดยทดสอบพารามิเตอร์ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรง ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์สาร sudan และ para red ในไข่ด้วยวิธี LC-MS/MS ที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิเคราะห์ เป็นวิธีที่เหมาะสมใช้ในงานทดสอบประจำของห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ในกิจกรรมแผนตรวจเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปี ได้ผลทดสอบที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ทำให้มาตรฐานสินค้าไข่ของประเทศไทยที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ และช่วยเพิ่มมูลค่าการส่งออก

4. วิธีการดำเนินการ

4.1 อุปกรณ์

- เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
- เครื่อง Vortex mixer
- เครื่อง Ultrasonic bath
- อุปกรณ์ลดปริมาตรสารละลายโดยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน (N-Evap)
- เครื่อง LC-MS/MS (Triple Quadrupole) ยี่ห้อ Thermo Scientific ประกอบด้วย LC รุ่น Ultimate 3000 และ Mass spectrometric detector รุ่น TSQ Endura
- LC column ชนิด Accucore Phenyl-Hexyl 2.6 μ m, 3x50 mm.
- หลอดปั่นเหวี่ยงแก้วชนิดมีขีดบอกปริมาตร ขนาด 15 มิลลิลิตร
- หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกชนิดมีขีดบอกปริมาตร ขนาด 15 มิลลิลิตร
- Autosampler vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.2 สารเคมี

- Acetonitrile (AR และ HPLC grade) ethyl acetate (PR grade) formic acid (AR grade)

4.3 สารมาตรฐาน

- Para Red ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C15875000 ความบริสุทธิ์ 98.6%
- Rhodamine B chloride ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16813550 ความบริสุทธิ์ 98.6%
- Sudan I ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986101 ความบริสุทธิ์ 99.0%
- Sudan II ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986102 ความบริสุทธิ์ 99.6%
- Sudan III ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986103 ความบริสุทธิ์ 98.0%
- Sudan IV ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986104 ความบริสุทธิ์ 98.9%
- Sudan Orange G ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986115 ความบริสุทธิ์ 98.6%
- sudan Red 7B ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986120 ความบริสุทธิ์ 97.0%
- Sudan Yellow ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986150 ความบริสุทธิ์ 98.5%

- Sudan I D5 ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986105 ความบริสุทธิ์ 96.0%
- Sudan IV D6 ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Cat No. C16986108 ความบริสุทธิ์ 95.5%

ซึ่งเตรียมให้เป็นสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 200 µg/mL

4.4 ทดสอบหาสภาวะการสกัดสารให้สีในไข่แดง

ชั่งตัวอย่างไข่แดง 1 ± 0.010 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube พลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสาร sudan I D5 และ sudan IV D6 (internal standard) ให้ได้ความเข้มข้น 10 µg/kg เติมตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร ethyl acetate : n-hexane (1:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมสารเข้าด้วยกันโดยใช้ vortex mixer นำไป sonicate ใน ultrasonic bath นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ -9 °C ดูดสารละลายชั้นบนใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างซ้ำอีกรอบ รวมสารละลายชั้นบนไว้ในหลอดเดียวกัน เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร vortex นำสารสกัดไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ -9 °C ดูดสารละลายชั้นบนไประเหยที่เครื่อง N-Evap โดยอุณหภูมิของ water bath ไม่เกิน 50 °C ลดปริมาตรให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วย 0.1% formic acid in H₂O : 0.1% formic in acetonitrile นำไปตรวจวัดชนิดและปริมาณสารด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4.5 การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

ทดสอบปรับตั้งค่าสภาวะต่างๆ ของเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งได้แก่ อัตราการไหลของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วนในการผสมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ ion transfer temperature, vaporizer temperature และศักย์ไฟฟ้าของ collision cell ในการตรวจวัดสารให้สี ซึ่งต้องสามารถแยกพีคสารและคำนวณต่อประจุ (m/z) ของแต่ละสารที่ศึกษาได้

4.6 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)

ตรวจวัด matrix matched standard solution 5 ความเข้มข้น คือ 10, 50, 100, 150 และ 200 ng/mL โดยมีสาร rhodamine B chloride, sudan orange G, para red, sudan yellow และ sudan I ใช้สาร sudan I D5 เป็น internal standard ส่วนสาร sudan II, sudan III, sudan IV และ sudan Red 7B ใช้สาร sudan IV D6 เป็น internal standard สร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของการถดถอย (R^2) เกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.990

4.7 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบ spiked sample blank ที่มีปริมาณสารให้สีแต่ละสารเท่ากับ 10 µg/kg จำนวน 10 ตัวอย่าง นำไปตรวจวัดหาปริมาณสารด้วยเครื่อง LC-MS/MS คำนวณค่า LOD = 3 x S₀' และค่า LOQ = 10 x S₀'

5. ผลการทดลอง

5.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS (Triple Quadrupole)

จากการตรวจสอบ สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องได้ดังนี้

- สภาวะของส่วน LC

Injection volume	: 10 µL
Flow rate	: 0.3 mL/min
Mobile phase A	: 0.1% formic acid in H ₂ O
B	: 0.1% formic in acetonitrile

Gradient :	Time	%A	%B
	00.00	80	20
	00.50	80	20
	08.00	0	100
	12.00	0	100
	13.00	80	20
	15.00	80	20

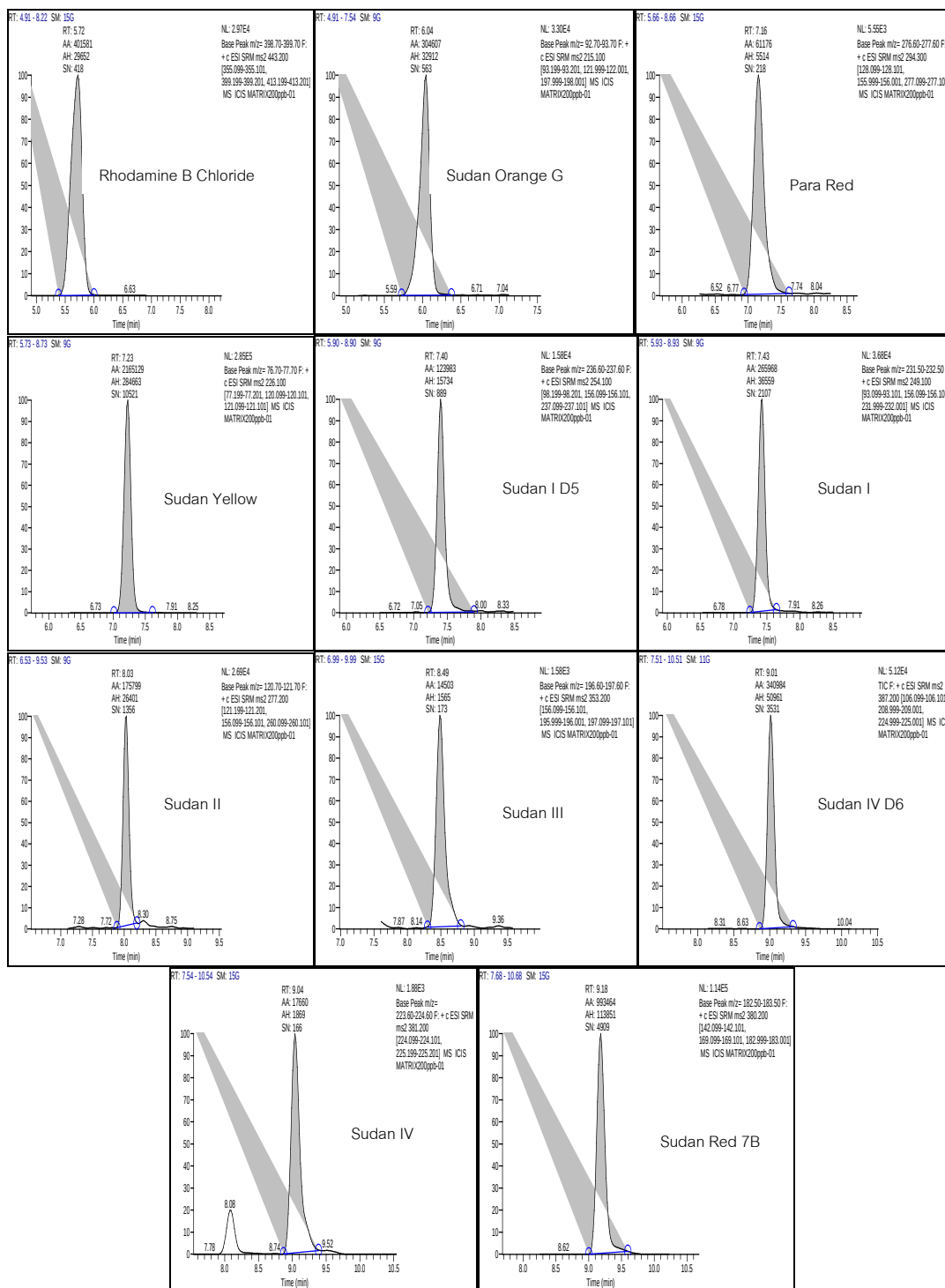
- สภาวะของส่วน Mass Spectrometer

Ion Source: H-ESI (+)	Positive voltage: 3500 V
Sheath gas: 40 Arb	Auxiliary gas: 12 Arb
Sweep gas: 1 Arb	Ion transfer temp. : 333 °C
Vaporizer temp. : 317 °C	

ซึ่งได้ผลการตรวจสอบค่า MS/MS transition ของสารให้สีที่ทำการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 1 และโครมาโทแกรมดังรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า MS/MS transition ของสารให้สีที่ทำการวิเคราะห์

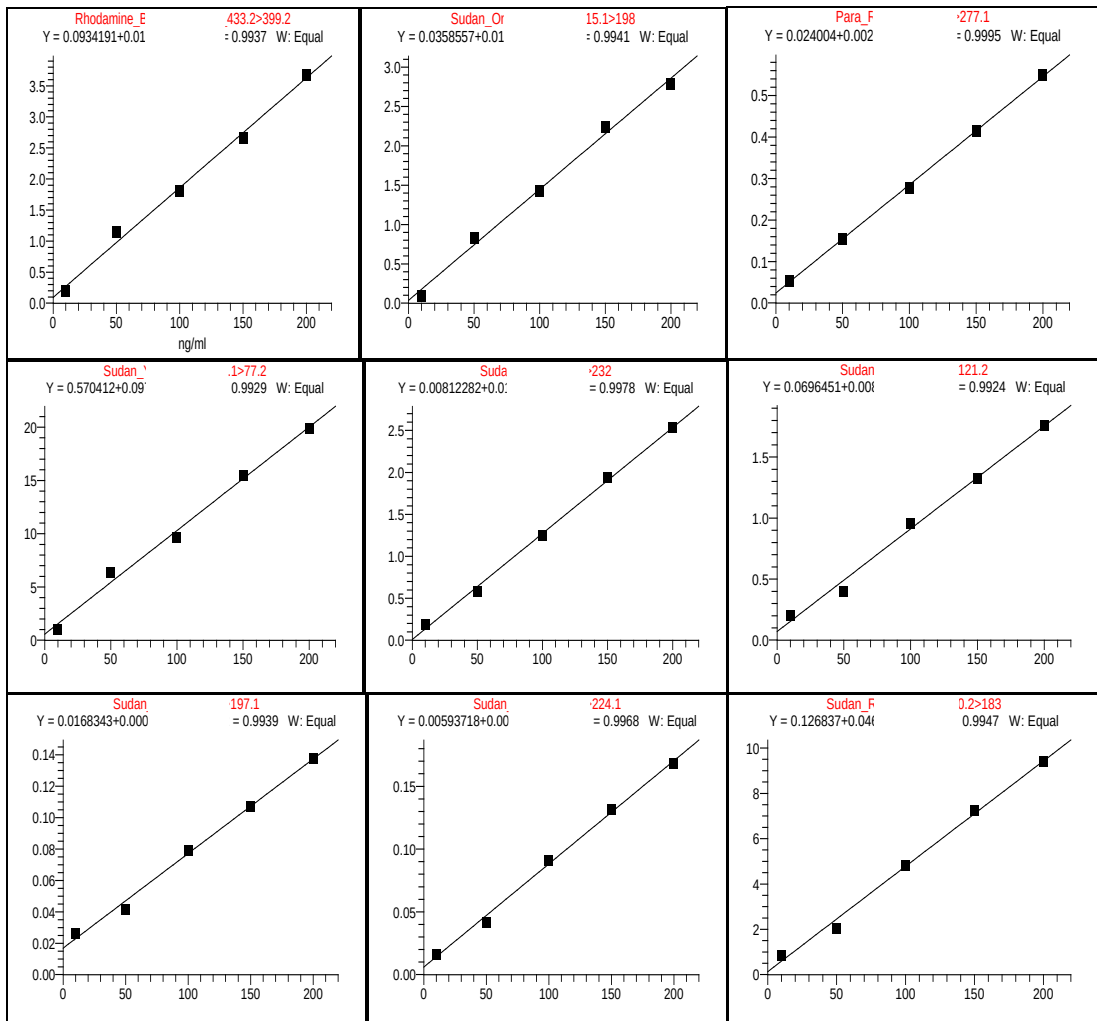
RT (min)	Analyte	Quantification transition (CE; V)	Confirmation transition 1 (CE; V)	Confirmation transition 2 (CE; V)
5.74	Rhodamine B	443.2>399.2 (40)	443.2>355.1 (55)	443.2>413.2 (37)
6.04	Sudan Orange G	215.1>198 (11)	215.1>93.2 (22)	215.1>122 (14)
7.16	Para Red	294.3>277.1 (11)	294.3>128.1 (24)	294.3>156 (14)
7.23	Sudan Yellow	226.1>77.2 (20)	226.1>120.1 (28)	226.1>121.1 (18)
7.40	Sudan I D5	254.1>237.1(10)	-	-
7.43	Sudan I	249.1>232 (10)	249.1>93.1 (21)	249.1>156.1 (12)
8.03	Sudan II	277.2>121.2 (16)	277.2>156.1 (10)	277.2>260.1 (10)
8.49	Sudan III	353.2>197.1 (15)	353.2>156.1 (18)	353.2>196 (19)
9.01	Sudan IV D6	387.2>225 (12)	-	-
9.04	Sudan IV	381.2>224.1(18)	381.2>91.2 (25)	381.2>209.1 (25)
9.18	Sudan Red 7B	380.2>183 (10)	380.2>142.1 (24)	380.2>169.1 (22)



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมของสารให้สี sudan dye ที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่อง LC-MS/MS

5.2 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)

จากการตรวจวัด matrix matched standard solution ของสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น คือ 10, 50, 100, 150 และ 200 ng/mL และสร้างกราฟเส้นตรงได้กราฟเส้นตรงมีค่า R^2 มากกว่า 0.990 คือ 0.9924-0.9995 ทุกสาร ดังรูปที่ 2 ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 2 กราฟเส้นตรงของ matrix matched standard solution

5.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ)

จากการทดสอบ spiked sample ที่เติมสารให้สีแต่ละสารเท่ากับ 10 µg/kg จำนวน 10 ตัวอย่าง คำนวณค่า LOD ($3 \times S'_0$) และ LOQ ($10 \times S'_0$) ได้ 2 และ 10 µg/kg ตามลำดับ ในทุกสาร ยกเว้นสาร Rhodamine B ซึ่งมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 8 และ 25 µg/kg ตามลำดับ

6. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของ EURACHEM (2014) พบว่ามีประสิทธิภาพดีสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์สารให้สี sudan, para red และ rhodamine B chloride ในตัวอย่างไข่แดงด้วยเครื่อง LC-MS/MS (Triple Quadrupole) ได้ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเป็นที่น่าพอใจ มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 2 และ 10 µg/kg ตามลำดับในทุกสาร ยกเว้นสาร Rhodamine B ซึ่งมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 8 และ 25 µg/kg ตามลำดับ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีสมรรถนะประสิทธิภาพบรรลุวัตถุประสงค์สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สารให้สี sudan, para red และ rhodamine B chloride ในไข่แดงด้วยเทคนิค LC-MS/MS ในการเฝ้าระวังสารตกค้างของกรมปศุสัตว์ได้

7. ข้อเสนอแนะ

วิธีวิเคราะห์ที่ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในครั้งนี้ ยังไม่ครอบคลุมการทดสอบช่วงความสามารถของการทดสอบ รวมทั้งควรมีการควบคุมคุณภาพภายนอกห้องปฏิบัติการ โดยการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) หรือจัดกิจกรรมเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison) เพื่อให้ทราบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้อง

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ไพโรจน์ อารังโสภาส ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ช่วยในการศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

- DU Zhenxia and SUN Shuqi. 2007. Determination of Sudan Red I – IV in Duck Egg Yolk Using Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. Chin J Chromatogr. 25(5) : 705 – 710.
- Xiaolin Hou, Yonggang Li, GuojuanWu, LeiWang, Miao Hong and YongninWu. 2010. Determination of Para Red, Sudan Dyes, Canthaxanthin, and Astaxanthin in Animal Feeds Using UPLC. Journal of Chromatographic Science, Vol. 48, January 2010 : 22-25.