พัฒนาวิธีวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม Nitrofurans, Nitroimidazoles และ Amphenicols ในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์โดยเทคนิค LC - MS/MS

นางสุนันท์ กิตติจารุวัฒนา นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน นายองอาจ บุญบรรลุ

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม nitrofurans (nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone และ furaltadone), nitroimidazoles (metronidazole, ronidazole, dimetridazole, ipronidazole, ternidazole และ ornidazole) และ amphenicols (chloramphenicol, florfenicol และ thiamphenicol) จำนวน 13 ชนิดในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC - MS/MS) สกัดตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์ และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ solid - phase extraction ชนิด Hydrophilic - Lipophilic Balance (HLB) คำนวณปริมาณสารโดยใช้ matrix - matched standard calibration curve ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตาม Commission Decision 2002/657/EC ทดสอบ linearity and range ที่ระดับความเข้มข้น 0.0015 - 1.3440 ไมโครกรัมต่อกรัมลิตร ได้ค่า coefficient of determination (r^2) อยู่ในช่วง 0.9954 - 0.9995 การทดสอบความแม่น (accuracy) ประเมินจากค่า %recovery และความเที่ยงจากการทำซ้ำระหว่างวัน (intermediate precision) อยู่ในช่วง 92.21 - 110.92% และ 1.33 - 10.24% ตามลำดับ คำนวณความเข้มข้นที่ระดับ decision limits (CCα) และ detection capabilities (CCβ) อยู่ในช่วง 0.0005 - 0.0411 ไมโครกรัมต่อลิตรและ 0.0007 - 0.0575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าวิธีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นและความเที่ยง สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols ในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ได้อย่างเหมาะสม

คำสำคัญ : Nitrofurans, Nitroimidazoles, Amphenicols, การทดสอบความใช้ได้, LC - MS/MS, น้ำเลี้ยงสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development and Validation for Simultaneous Determination of Nitrofurans, Nitroimidazoles and Amphenicols group in Animal Drinking Water from Livestock Farm by LC - MS/MS

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsoongnearn, Ongart Boonbanlu

Abstract

Method development and validation for simultaneous determination of 13 compounds of nitrofurans (nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone), nitroimidazoles (metronidazole, ronidazole, dimetridazole, ipronidazole, ternidazole and ornidazole) and amphenicols (chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol) in animal drinking water from livestock farm was conducted using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC - MS/MS). Animal drinking water samples were extracted and purified using solid - phase extraction (SPE) Hydrophilic - Lipophilic Balance (HLB). The amount of analytes were quantified by mean of the matrix - matched standard calibration curves. The developed method was validated according to Commission Decision 2002/657/EC. The linearity and range were evaluated over the concentration range of 0.0015 - 1.3440 µg/L. The coefficient of determination (r^2) were between 0.9954 - 0.9995. The accuracy in term of percent recovery and intermediate precision were between 92.21 - 110.92% and 1.33 - 10.24% %RSD, respectively. The decision limits (CCα) and detection capabilities (CCβ) ranged from 0.0005 - 0.0411 and 0.0007 - 0.0575 µg/L, respectively. The results showed that the validated method is sensitive, accurate and suitable for quantitative determination of nitrofurans nitroimidazoles and amphenicols group in animal drinking water from livestock farm.

Keywords: Nitrofurans, Nitroimidazoles, Amphenicols, Validation, LC - MS/MS, Animal drinking water

---

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

พัฒนาวิธีวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม Nitrofurans, Nitroimidazoles และ Amphenicols ในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

นางสุนันท์ กิตติจารุวัฒนา นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน นายองอาจ บุญบรรลุ

บทนำ

Nitrofurans เป็นยาต้านจุลชีพที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วย 5 - nitrofuran ring (Rupp et al, 1994) nitrofurans ที่มีการใช้ในวงการปศุสัตว์ คือ furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin และ nitrofurazone โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการรักษา และป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวในสุกร โค สัตว์ปีก กระต่าย และปลา นอกจากนี้ยังใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตในรูป feed additive อีกด้วย (Kumar et al, 1994) เพราะนอกจาก nitrofurans จะมีประสิทธิภาพในการรักษาอย่างดีแล้ว ยังมีโอกาสน้อยที่จะเกิดการดื้อยา

ปัจจุบันยากลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (nitrofurans) ถูกห้ามใช้ในสัตว์ที่ให้ผลผลิตเพื่อการบริโภค (food - producing animal) (Rupp et al, 1994) ทั้งนี้เนื่องจากผลของการศึกษาพบว่าตัวยาในรูป parent drugs เป็นสารที่สามารถก่อมะเร็งหรือเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมได้ (carcinogenic or mutagenic compound) นอกจากนี้ AOZ (3 - amino - 2 - oxazolidinone) ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลท์ของ furazolidone ยังสามารถเปลี่ยนแปลง (Biotransformation) ไปเป็น (β - hydroxyethyl) hydrazine ซึ่งเป็นทั้ง mutagenic และ carcinogenic compound จึงทำให้ยาในกลุ่ม nitrofurans ทุกชนิดจัดอยู่ในประเภทยาที่ไม่สามารถนำไปใช้ในสัตว์ที่ให้ผลผลิตเพื่อการบริโภคได้ (Ban compound: zero tolerance for residues) โดย furazolidone เป็นยาชนิดสุดท้ายที่สหภาพยุโรปประกาศห้ามใช้ในปี 1997 หลังจากที่ nitrofurans ชนิดอื่นถูกห้ามไปก่อนหน้านั้น (Kennedy et, al 2000) ในปัจจุบันประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกาจะทำการตรวจสอบยาสัตว์ตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ที่นำเข้าประเทศซึ่งรวมถึงยาในกลุ่ม nitrofurans ด้วย แต่จากความไม่เสถียรของยากลุ่มนี้คือเมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์แล้วจะเกิดการสันดาปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นเมตาบอไลท์อย่างรวดเร็วทำให้มักตรวจไม่พบ parent drugs ของ nitrofurans ในระยะเวลาอันสั้น (Rupp et al, 1994) ต่อมาสหภาพยุโรปได้

พัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้เมตาบอไลท์เป็น marker residue ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ เช่น LC - MS/MS สำเร็จ จึงทำการตรวจสารเมตาบอไลท์ในสินค้าที่นำเข้าจากประเทศต่างๆ

Nitroimidazole ถูกนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะสำหรับต่อต้านเชื้อโปรโตซัวรวมถึงเชื้อแบคทีเรีย โดยตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ได้แก่ metronidazole, dimetridazole, ronidazole และ tinidazole ยากลุ่ม nitroimidazole มีกลไกการออกฤทธิ์โดยตัวยาจะต่อต้านเชื้อโรคที่ตอบสนองกับยานี้โดยก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารพันธุกรรมหรือสารดีเอ็นเอ (DNA) ในเชื้อโรคเหล่านั้น ส่งผลให้เชื้อโรคเหล่านั้นหยุดการเจริญเติบโต หมดความสามารถของการแพร่พันธุ์และตายลง ยากลุ่ม nitroimidazole สามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบอวัยวะต่างๆ ของร่างกายได้ดังนี้ เช่น ผลต่อระบบประสาท ผลต่อระบบทางเดินอาหาร ผลต่อระบบหายใจ เป็นต้น

Chloramphenicol เป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกนำมาใช้ในฟาร์มปศุสัตว์และสัตว์ปีกเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด chloramphenicol ถูกนำมาใช้แพร่หลายในปี ค.ศ. 1949 (พ.ศ. 2492) หลายประเทศที่พัฒนาแล้วมักไม่ค่อยจะใช้ยาตัวนี้ ด้วยผลข้างเคียงที่รุนแรงอย่างเช่น กดการเจริญเติบโตของไขกระดูก ก่อให้เกิดโรคโลหิตจางชนิด Aplastic anemia เป็นต้น แต่สำหรับประเทศที่ยังไม่พัฒนา chloramphenicol ยังเป็นที่ยอมรับด้วยมีราคาถูกและออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด

Florfenicol และ thiamphenicol เป็นยาปฏิชีวนะที่เป็นอนุพันธ์ (analog) ของ chloramphenicol และมีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกันกับ chloramphenicol โดยทั้งสองชนิดนี้ได้มีการแทน p - nitro group บนวงแหวน aromatic ด้วย sulfonylmethyl group และไม่มีความเป็นพิษข้างเคียงเช่นเดียวกับ chloramphenicol และ florfenicol เป็น fluorinated analogue ของ thiamphenicol โดยมี fluorene แทนที่ hydroxyl group ที่ตำแหน่ง C - 3 จึงทำให้มีความปลอดภัยจากผลข้างเคียงจากการใช้ เนื่องจากยาตัวนี้เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง จึงมีผู้นำมาใช้ในวงการเลี้ยงสุกร ทั้งเป็นยาฉีดและยาผสม นำมาใช้รักษาโรคทางเดินหายใจเนื่องมาจากการติดเชื้อร่วมกันของ *Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Salmonella choleraesuis* และ *Streptococcus suis Type2E* และยังใช้ในการรักษาโรคปลาในหลายประเทศ ปัจจุบัน florfenicol เป็นยาเพียงชนิดเดียวในกลุ่ม amphenicols ที่ได้รับการยกเว้นตามคำสั่งกระทรวงสาธารณสุข ที่ 1222/2558 ณ วันที่ 29 กรกฎาคม 2558 โดยสามารถนำมาใช้ในสัตว์ที่ใช้บริโภคได้

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols ในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์โดยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC - MS/MS)

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับวิเคราะห์สารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิดในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์โดยเทคนิค LC - MS/MS และการสกัดตัวอย่างแบบ Solid phase extraction (SPE)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีแล้ว สามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols พร้อมกัน 13 ชนิด ในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์โดยเทคนิค LC - MS/MS

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1. เครื่องมือ

- liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC - MS/MS) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LCMS-8050
- pH meter ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น SevenExcellence
- เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XP205DR
- เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ ยี่ห้อ Thermo รุ่น Genpure
- Vacuum manifold ยี่ห้อ Supelco

4.2. วัสดุวิทยาศาสตร์

4.2.1. สารมาตรฐาน

- Metronidazole ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Metronidazole-$^{13}C_2$-$^{15}N_2$ ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Ronidazole ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Ronidazole-D_3 ยี่ห้อ witega
- Dimetridazole ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer

- Dimetridazole-D_3 witega
- Ipronidazole ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Ipronidazole-D_3 witega
- Furaltadone ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Furaltadone-D_5 witega
- Ternidazole ยี่ห้อ Sigma
- Ornidazole ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Nitrofurazone ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Nitrofurazone-^{13}C-$^{15}N_2$ witega
- Nitrofurantoin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Nitrofurantoin-$^{13}C_3$ witega
- Furazolidone ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Furazolidone-D_4 witega
- Chloramphenicol ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Chloramphenicol-D_5 ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Thiamphenicol ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Florfenicol ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer
- Florfenicol-D_3 ยี่ห้อ TRC

4.2.2. สารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์

- Acetonitrile, HPLC grade
- Acetonitrile, AR grade
- Methanol, AR grade
- Formic acid, AR grade
- SPE ชนิด Oasis® HLB 6 cc 200mg ยี่ห้อ Waters
- คอลัมน์ Kinetex C18 2.6 µm 150×3 mm ยี่ห้อ Phenomenex

5. วิธีดำเนินการ

5.1. ทดสอบสภาวะของระบบ mass spectrometer ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิด และ internal standard อีก 10 ชนิด

5.2. ทดสอบสภาวะของระบบ LC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิด

5.3. จัดทำแผนและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยใช้แนวทางตาม Commission Decision 2002/657/EC.

5.3.1. ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ ตามรูปที่ 1

Condition SPE ด้วย methanol 4 mL

⇩

Equilibrate SPE ด้วยน้ำ deionized 4 mL

⇩

Load ตัวอย่าง 50 mL

⇩

Elute ด้วย acetonitrile 4 mL

⇩

TurboVap ที่ 30 °C จนแห้ง และเติม 20% acetonitrile in water 0.5 mL

⇩

Mix ด้วย vortex mixer 15 วินาที นำไป sonicate 1 นาที

⇩

กรองผ่าน nylon filter ขนาด 13 mm, 0.22 µm ลงใน vial

⇩

วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

รูปที่ 1 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี SPE

5.3.2. การเตรียมสารละลายละลายมาตรฐาน

5.3.2.1. Stock standard solution ความเข้มข้น 500 mg/L (metronidazole, ronidazole, dimetridazole, ipronidazole, ternidazole, furaltadone, ornidazole, nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, chloramphenicol, thiamphenicol, และ florfenicol): ชั่งสารมาตรฐาน 25 mg (ละเอียดถึง 0.1 mg) ลงใน volumetric flask 50 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

5.3.2.2. Stock internal standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L: ชั่งสารมาตรฐาน 10 mg (ละเอียดถึง 0.1 mg) ลงใน volumetric flask 10 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade จากนั้นปิเปต stock internal standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L มา 100 µL ลงใน volumetric flask 10 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade ได้ความเข้นข้น 10 mg/L

5.3.3. การเตรียม working standard solution

5.3.3.1. Working standard solution A: ปิเปต stock standard solution metronidazole, ronidazole, dimetridazole, ipronidazole, ternidazole, ornidazole และ furaltadone ความเข้นข้น 500 mg/L มา 400, 1000, 400, 100, 1000, 800 และ 1000 µL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade ได้ความเข้มข้น 8, 20, 8, 2, 20, 16 และ 20 mg/L ตามลำดับ

5.3.3.2. Working standard solution B: ปิเปต working solution A มา 600 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade ได้ความเข้มข้น metronidazole, ronidazole, dimetridazole, ipronidazole, ternidazole, ornidazole และ furaltadone เท่ากับ 192, 480, 192, 48, 480, 384 และ 480 µg/L ตามลำดับ

5.3.3.3. Working standard solution C: ปิเปต stock standard solution nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, chloramphenicol, thiamphenicol และ florfenicol ความเข้นข้น 500 mg/L มา 300, 150, 300, 50, 300 และ 20 µL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade ได้ความเข้มข้น 3, 1.5, 3, 0.5, 3 และ 0.2 mg/L ตามลำดับ

5.3.3.4. Working standard solution D: ปิเปต intermediate standard solution B มา 200 µL และ ปิเปต intermediate standard solution C มา 400 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

5.3.4. การเตรียม working internal standard solution

5.3.4.1. Working internal standard solution A: ปิเปต stock internal standard solution dimetridazole-D_3, furaltadone-D_5, metronidazole-D_4, ipronidazole-D_3 และ florfenicol-D_3 ความเข้มข้น 10 mg/L มา 200, 200, 100, 100 และ 200 µL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

5.3.4.2. Working internal standard solution B: ปิเปต working internal standard solution A, stock internal standard solution furazolidone-D_4, ronidazole-D_3, nitrofurazone $^{13}C_{15}N_2$, nitrofurantoin $^{13}C_3$ และ chloramphenicol-D_5 มา 200, 100, 300, 200, 50 และ 20 µL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

5.3.5. การเตรียม calibration solution ปิเปต working standard solution D มา 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 และ 1400 µL ตามลำดับ ลงในตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 mL และปิเปต working internal standard solution B มา 200 µL นำไปสกัดตามรูปที่ 1

5.3.6. ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range) โดยเตรียม matrix-matched standard calibration curve ของสารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิด ในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ตามตารางที่ 1 ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 วัน สกัดผ่าน SPE ชนิด HLB และนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย LC - MS/MS นำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคระหว่าง standard กับ internal standard และอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง standard กับ internal standard ไปสร้างกราฟหาค่า coefficient of determination (r^2) เกณฑ์การยอม $r^2 \geq 0.995$ (สุจิตตรา, 2555)

ตารางที่ 1 ช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิด ในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์

ชนิดสาร	ช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (µg/L)
Metronidazole	0.0061 - 0.0430 (0.0061, 0.0123, 0.0184, 0.0246, 0.0307, 0.0369 และ 0.0430)
Ronidazole	0.0154 - 0.1075 (0.0154, 0.0307, 0.0461, 0.0641, 0.0768, 0.0922 และ 0.1075)
Dimetridazole	0.0061 - 0.0430 (0.0061, 0.0123, 0.0184, 0.0246, 0.0307, 0.0369 และ 0.0430)
Ipronidazole	0.0015 - 0.0108 (0.0015, 0.0031, 0.0046, 0.0061, 0.0077, 0.0092 และ 0.0108)
Ternidazole	0.0123 - 0.0860 (0.0123, 0.0246, 0.0369, 0.0492, 0.0614, 0.0737 และ 0.860)
Ornidazole	0.0154 - 0.1075 (0.0154, 0.0307, 0.0461, 0.0614, 0.0768, 0.0922 และ 0.1075)
Nitrofurazone	0.192 - 1.344 (0.192, 0.384, 0.576, 0.768, 0.960, 1.152 และ 1.344)
Nitrofurantoin	0.096 - 0.672 (0.096, 0.192, 0.288, 0.384, 0.480, 0.576 และ 0.672)
Furazolidone	0.192 - 1.344 (0.192, 0.384, 0.576, 0.768, 0.960, 1.152 และ 1.344)
Furaltadone	0.0154 - 0.1075 (0.0154, 0.0307, 0.0461, 0.0641, 0.0768, 0.0922 และ 0.1075)
Chloramphenicol	0.032 - 0.224 (0.032, 0.064, 0.096, 0.128, 0.160, 0.192 และ 0.224)
Florfenicol	0.0128 - 0.0896 (0.0128, 0.0256, 0.0384, 0.0512, 0.0640, 0.0768 และ 0.0896)
Thiamphenicol	0.192 - 1.344 (0.192, 0.384, 0.576, 0.768, 0.960, 1.152 และ 1.344)

5.3.7. ทดสอบความแม่นของวิธี (accuracy) โดยการเติมสารมาตรฐานกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิด ลงในตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ ความเข้มข้น 3 ระดับ ตามตารางที่ 2 ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 วัน คำนวณ %recovery จากกราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน เกณฑ์การยอมรับ %recovery ต้องอยู่ในช่วง 50 - 120% (AOAC, 2016)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ ความเข้มข้น 3 ระดับ

ชนิดสาร	ระดับความเข้มข้น (µg/L)		
	Level 1	Level 2	Level 3
Metronidazole	0.0061	0.0123	0.0184
Ronidazole	0.0154	0.0307	0.0461
Dimetridazole	0.0061	0.0123	0.0184
Ipronidazole	0.0015	0.0031	0.0046
Ternidazole	0.0123	0.0246	0.0369
Ornidazole	0.0154	0.0307	0.0461
Nitrofurazone	0.1920	0.3840	0.5760
Nitrofurantoin	0.0960	0.1920	0.2880
Furazolidone	0.1920	0.3840	0.5760
Furaltadone	0.0154	0.0307	0.0461
Chloramphenicol	0.0320	0.0640	0.0960
Florfenicol	0.0128	0.0256	0.0384
Thiamphenicol	0.1920	0.3840	0.5760

5.3.8. ทดสอบความเที่ยงของวิธี (precision) วิเคราะห์จากการทดสอบในข้อ 5.3.7 คำนวณผลจาก %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำ ผลที่ได้ต้องไม่เกิน %RSD ที่ได้จากการคำนวณ สมการ Horwitz's (AOAC, 2012) ต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 21%

5.3.9. ทดสอบเพื่อหาค่า CCα และ CCβ วิเคราะห์จากความสัมพันธ์ของกราฟเส้นตรงของ standard fortified ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นและการวิเคราะห์ซ้ำ 3 วัน ค่า SD, y - intercept และ slope แทนค่าในสูตร (ISO11843 - 2:2000)

6. ผลการทดลอง

6.1. ผลการทดสอบสภาวะของระบบ mass spectrometer ที่เหมาะสม ตามตารางที่ 3 - 5 ซึ่งสารในกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicol จะแบ่งเป็น 2 mode การทดสอบ คือ positive mode (metronidazole, ronidazole, dimetridazole, ipronidazole, ternidazole, ornidazole, furazolidone และ furaltadone) และ negative mode (nitrofurazone, nitrofurantoin, chloramphenicol, florfenicol และ thiamphenicol)

ตารางที่ 3 condition ของค่า ESI interface

Parameters	Value
Nebulizing Gas Flow	3.0 L/min
Drying Gas Flow	10.0 L/min
Heating Gas Flow	10.0 L/min
Interface	ESI
Interface Voltage	4.0 kV
Interface Temperature	300 °C
DL Temperature	250 °C
Heat Block Temperature	400 °C
CID Gas	270 kPa

ตารางที่ 4 Positive mode MRM working parameters

No.	Compounds	Precursor ion	Product ion	Dwell Time	Q1 Pre Bias	CE	Q3 Pre Bias
1	Metronidazole	172.05	128.10*	47	-20.0	-15.5	-22.0
		172.05	82.10	47	-19.0	-23.6	-18.0
2	Metronidazole-$^{13}C_2$-$^{15}N_2$	176.15	128.10	97	-13.0	-16.3	-24.0
3	Ronidazole	201.10	140.15*	34	-15.0	-12.6	-22.0
		201.10	55.05	34	-23.0	-22.1	-21.0
4	Ronidazole-D_3	204.05	143.05	71	-23.0	-11.2	-14.0
5	Dimetridazole	142.10	96.10*	34	-10.0	-17.8	-19.0
		142.10	81.10	34	-15.0	-28.9	-14.0
6	Dimetridazole-D_3	145.20	99.0	71	-11.0	-17.3	-18.0
7	Ipronidazole	170.15	124.15*	46	-19.0	-20.8	-23.0
		170.15	109.10	46	-19.0	-27.1	-21.0

* indicates MRM transitions for quantification

ตารางที่ 4 Positive mode MRM working parameters (ต่อ)

No.	Compounds	Precursor ion	Product ion	Dwell Time	Q1 Pre Bias	CE	Q3 Pre Bias
8	Ipronidazole-D_3	173.20	95.00	95	-13.0	-20.0	-23.0
9	Ternidazole	186.10	128.10*	34	-14.0	-16.0	-12.0
		186.10	82.10	34	-13.0	-27.0	-14.0
10	Ornidazole	220.00	128.10*	34	-11.0	-16.0	-12.0
		220.00	82.10	34	-11.0	-29.9	-14.0
11	Furazolidone	226.05	122.10*	34	-17.0	-21.6	-26.0
		226.05	139.10	34	-16.0	-14.9	-22.0
12	Furazolidone-D_4	230.10	117.00	71	-17.0	-12.8	-11.0
13	Furaltadone	325.15	252.15*	34	-12.0	-17.1	-25.0
		325.15	281.15	34	-12.0	-12.4	-13.0
14	Furaltadone-D_5	330.10	286.15	97	-13.0	-12.8	-19.0

* indicates MRM transitions for quantification

ตารางที่ 5 Negative mode MRM working parameters

No.	Compounds	Precursor ion	Product ion	Dwell Time	Q1 Pre Bias	CE	Q3 Pre Bias
1	Nitrofurazone	197.05	124.00*	34	14.0	9.3	14.0
		197.05	150.00	34	22.0	8.1	17.0
2	Nitrofurazone $^{13}C^{15}N_2$	200.10	153.00	71	23.0	10.5	10.0
3	Nitrofurantoin	237.05	152.10*	34	16.0	10.2	27.0
		237.05	123.85	34	26.0	15.5	12.0
4	Nitrofurantoin $^{13}C_3$	240.0	151.95	71	13.0	10.3	16.0
5	Chloramphenicol	321.05	152.05*	46	12.0	16.9	23.0
		321.05	257.05	46	16.0	10.8	18.0

* indicates MRM transitions for quantification

ตารางที่ 5 Negative mode MRM working parameters (ต่อ)

No.	Compounds	Precursor ion	Product ion	Dwell Time	Q1 Pre Bias	CE	Q3 Pre Bias
6	Chloramphenicol-D_5	326.20	157.10	95	12.0	16.3	10.0
7	Florfenicol	356.15	185.05*	46	13.0	19.2	12.0
		356.15	336.00	46	13.0	9.8	16.0
8	Florfenicol-D_3	359.20	188.05	95	13.0	18.5	12.0
9	Thiamphenicol	354.15	185.05*	34	13.0	20.0	12.0
		354.15	290.00	34	13.0	12.6	14.0

* indicates MRM transitions for quantification

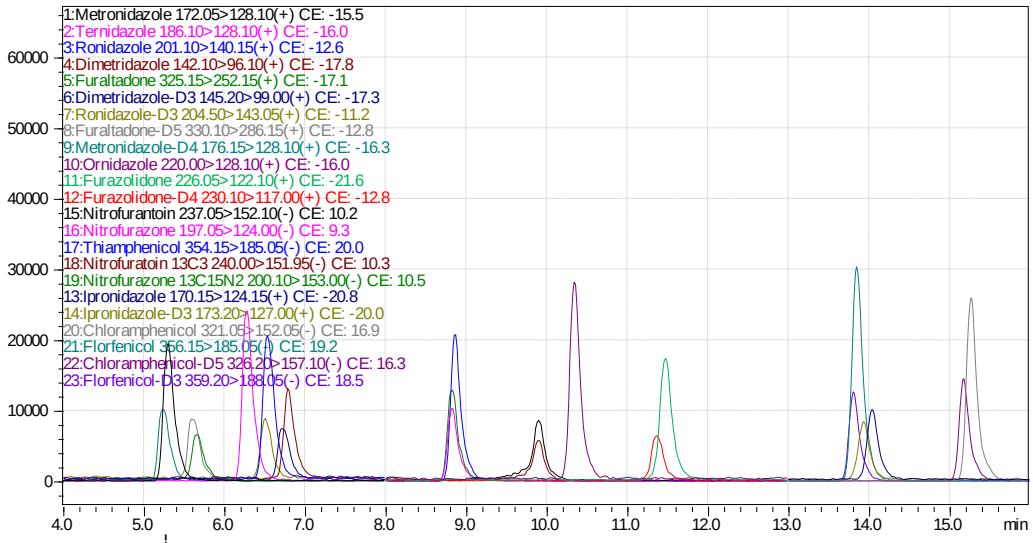
6.2. ผลการทดสอบปรับ condition LC ให้เหมาสมสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม nitrofurans nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิด

ตารางที่ 6 condition LC ใช้คอลัมน์ Kinetex C18 2.6 µm 150×3.0 mm

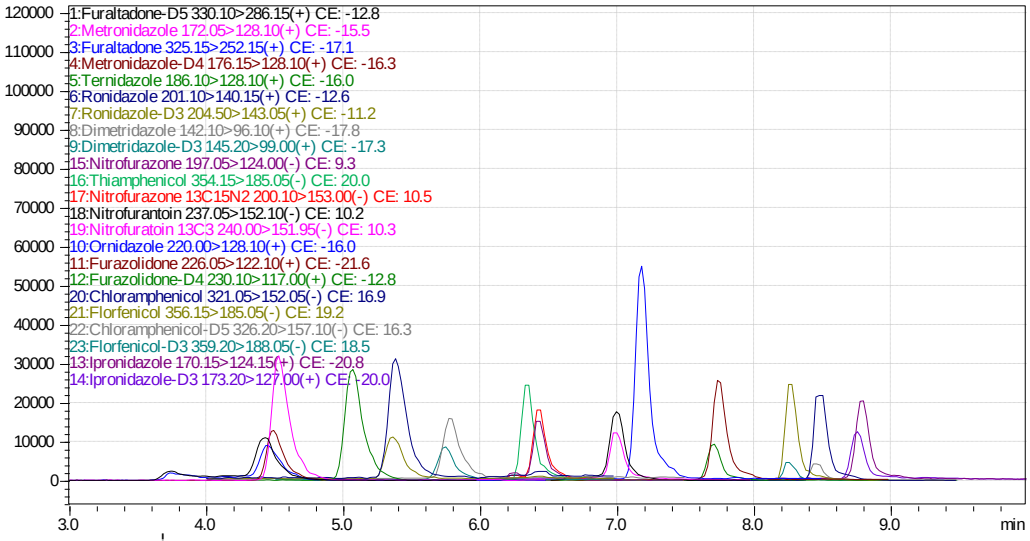
Parameters		Value	
Mobile phase:	Time	0.1 % FA in water	0.1 % FA in acetonitrile
	0.0	85	15
	10.0	70	30
	11.0	70	30
	12.0	85	15
	20.0	85	15
Flow rate:	0.2 mL/min		
Column temperature:	30 °C		
Sample temperature:	25 °C		
Injection volume:	10 µL		

ตารางที่ 7 condition LC ใช้คอลัมน์ Kinetex C18 2.6 µm 150×3.0 mm

Parameters		Value	
Mobile phase:	Time	0.1 % FA in water	0.1 % FA in acetonitrile
	0.0	80	20
	5.0	50	50
	6.0	80	20
	10.0	80	20
Flow rate:	0.2 mL/min		
Column temperature:	30 °C		
Sample temperature:	25 °C		
Injection volume:	10 µL		



รูปที่ 2 chromatogram สารมาตรฐานกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols condition LC ตามตารางที่ 6



รูปที่ 3 chromatogram สารมาตรฐานกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols condition LC ตามตารางที่ 7

6.3. ผลการทดสอบ matrix - matched standard calibration curve ของสารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิด ในตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ จากตารางที่ 8 พบว่าการทดสอบความเป็นเส้นตรง มีค่า r^2(coefficient of determination) มากกว่า 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols ทั้ง 13 ชนิด

Compound	Slope	Intercept	r^2	r
Metronidazole	0.719083	0.186374	0.9975	0.9987
Ronidazole	101.414	0.868750	0.9991	0.9996
Dimetridazole	1.10565	0.218100	0.9989	0.9994
Ipronidazole	1.30120	-0.0524616	0.9986	0.9993
Ternidazole	2.58104	-7.63429	0.9954	0.9977
Ornidazole	136.749	0.642147	0.9977	0.9988

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols ทั้ง 13 ชนิด (ต่อ)

Compound	Slope	Intercept	r^2	r
Nitrofurazone	1.41497	-0.0486017	0.9995	0.9997
Nitrofurantoin	1.27151	-0.0422179	0.9991	0.9995
Furazolidone	2.19054	-0.231521	0.9992	0.9996
Furaltadone	0.861474	1.70222	0.9991	0.9995
Chloramphenicol	0.951744	-0.0537352	0.9988	0.9994
Florfenicol	1.17087	-0.0275381	0.9974	0.9987
Thiamphenicol	0.546603	-0.588089	0.9968	0.9984

6.4. ผลการทดสอบความแม่นของวิธี (accuracy) เกณฑ์การยอมรับ %recovery ต้องอยู่ในช่วง 50 - 120% (2002/657/EC) และผลการทดสอบความเที่ยงของวิธี (precision) คำนวณผลจาก %RSD ของ intermediate precision ต้องไม่เกิน %RSD ที่ได้จากการคำนวณ สมการ Horwitz's (AOAC, 2016) เท่ากับ 21% จากตารางที่ 9 ผลการทดสอบ accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ intermediate precision and recovery ในตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์

Analytes	Concentration (µg/L)	Intermediate precision		Mean recovery (%)
		Mean conc. (µg/L)	%RSD (n=21)	
Metronidazole	0.0061	0.0065	5.42	105.83
	0.0123	0.0125	1.64	101.44
	0.0184	0.0187	2.05	101.78
Ronidazole	0.0154	0.0171	1.50	110.92
	0.0307	0.0324	2.99	105.45
	0.0461	0.0466	2.74	101.13
Dimetridazole	0.0061	0.0061	6.36	99.41
	00123	0.0117	3.80	94.93
	0.0184	0.0179	3.30	97.09

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ intermediate precision and recovery ในตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ (ต่อ)

Analytes	Concentration (µg/L)	Intermediate precision		Mean recovery (%)
		Mean conc. (µg/L)	%RSD (n=21)	
Ipronidazole	0.0015	0.0016	6.30	103.57
	0.0031	0.0031	8.14	99.26
	0.0046	0.0046	3.64	100.58
Ternidazole	0.0123	0.0132	10.24	107.58
	0.0246	0.0227	4.70	92.21
	0.0369	0.0341	5.53	92.54
Ornidazole	0.0154	0.0156	4.20	101.18
	0.0307	0.0319	8.55	103.97
	0.0461	0.0474	5.17	102.78
Nitrofurazone	0.192	0.1994	3.01	103.83
	0.384	0.4029	3.53	104.91
	0.576	0.5977	1.33	103.76
Nitrofurantoin	0.096	0.0985	6.58	102.57
	0.192	0.1983	2.74	103.26
	0.288	0.3049	3.25	105.88
Furazolidone	0.192	0.2028	4.46	105.65
	0.384	0.3984	2.84	103.75
	0.576	0.5882	2.47	102.13
Furaltadone	0.0154	0.0158	7.82	102.72
	0.0307	0.0309	5.17	100.76
	0.0461	0.0446	7.25	96.75
Chloramphenicol	0.032	0.0332	3.12	103.84
	0.064	0.0643	3.53	100.43
	0.096	0.0973	3.87	101.38
Florfenicol	0.0128	0.0128	5.87	99.72
	0.0256	20.045	2.49	95.86
	0.0384	0.0374	2.83	97.48
Thiamphenicol	0.192	0.2071	2.60	107.85
	0.384	0.4087	4.91	106.44
	0.576	0.6068	5.68	105.34

6.5. ผลการทดสอบเพื่อหาค่า CCα และ CCβ วิเคราะห์จากความสัมพันธ์ของกราฟเส้นตรงของ fortified sample ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นและการวิเคราะห์ซ้ำ 3 วัน ค่า SD, y - intercept และ slope แทนค่าในสูตร (ISO11843 - 2:2000) ตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบค่า CCα และ CCβ ของสารกลุ่ม nitrofurans และ amphenicol 13 ชนิด ในตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์

Compound	CCα (µg/L)	CCβ (µg/L)
Metronidazole	0.0027	0.0038
Ronidazole	0.0022	0.0031
Dimetridazole	0.0013	0.0019
Ipronidazole	0.0005	0.0007
Ternidazole	0.0067	0.0094
Ornidazole	0.0038	0.0053
Nitrofurazone	0.0112	0.0156
Nitrofurantoin	0.0218	0.0305
Furazolidone	0.0158	0.0221
Furaltadone	0.0041	0.0057
Chloramphenicol	0.0021	0.0029
Florfenicol	0.0009	0.0013
Thiamphenicol	0.0411	0.0575

7. สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิดในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ ในช่วงการวิเคราะห์ตามตารางที่ 1 ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ มีค่า coefficient of determination (r^2) มากกว่า 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์การยอมรับ $r^2 \geq 0.995$) (สุจิตตรา, 2555) จากการทดสอบความแม่นของวิธี โดยคำนวณ %recovery ของสารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols 13 ชนิดในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 วัน อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 92.21 - 110.92% และจากการทดสอบความเที่ยงของวิธีโดยคำนวณจาก %RSD จากการทำซ้ำระหว่างวันมีค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.33 - 10.24% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากการคำนวณตามสมการ

Horwitz's (AOAC, 2016) ความเข้มข้นที่ระดับ decision limits (CCα) และ detection capabilities (CCβ) อยู่ในช่วง 0.0005 - 0.0411 ไมโครกรัมต่อลิตรและ 0.0007 - 0.0575 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ดังนั้นภายใต้กรอบการปฏิบัติงานของบุคลากร เครื่องมือ สภาวะแวดล้อม ของห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรวยด้านการปศุสัตว์ วิธีทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม nitrofurans, nitroimidazoles และ amphenicols ในน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และได้ผลเป็นไปตามข้อกำหนดของมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC และบรรลุวัตถุประสงค์ตามที่ตั้งไว้ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเลี้ยงสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์ได้

8. ข้อเสนอแนะ

-

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2561 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

10. เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Available source: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf, June 4, 2018.

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.

Capitan - Vallvey, L. F, A. Ariza, R. Checa, and N. Navas. 2002. Determination of Five Nitroimidazoles in Water by Liquid Chromatography - mass Spectrometry. Journal of Chromatography A 978 (1): 243 - 48.

Yu, W.H., T.S. Chin, and H.T. Lai. 2013. Detection of Nitrofurans and Their Metabolites in Pond Water and Sediments by Liquid Chromatography (LC) - Photodiode Array Detection and LC - Ion Spray Tandem Mass Spectrometry. International Biodeterioration & Biodegradation 85 (November): 517 - 26.

Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC. Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results. 2002; 8 - 36

ISO 11843 - 2: Capability of detection - part 2: Methodology in the Linear Calibration Case, 2000.

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. คู่มือพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธิทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผล และวิธีคัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2555

คำสั่งกระทรวงสาธารณสุข ที่ 1222/2558 เรื่อง เพิกถอนทะเบียนตำรับยา วันที่ 29 กรกฎาคม 2558. Available source: http://203.157.72.106/fulltext2/กฎหมาย/กองควบคุมยา/คำสั่งกระทรวง/เพิกถอน/58/1222.pdf, June 4, 2018.