

การพัฒนาวิธีทดสอบสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

นางสาววิชุดา มีอิม
นางสาวชลธิชา สายด้วง

นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย
นางสาวปิยนุช ทองจิ้น

นายสรารุช ชูกระชั้น
นางสาวสิริรัตน์ สิทธิรัตนตรีกุล

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีทดสอบสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ทำได้โดยนำตัวอย่างน้ำหนัก 5 กรัม สกัดด้วย Acetic acid ในสารละลาย Acetonitrile ทำการผสมให้เข้ากัน ผ่านขั้นตอนการ Clean up ด้วยเทคนิค Solid-Phase Extraction (SPE) ชนิด NH_2 1000 mg/6mL จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ด้วย LC column ชนิด Accucore aQ ที่มีขนาดอนุภาค 5 μm ขนาดคอลัมน์ 2.1 mm x 100 mm ที่ flow rate = 0.25 mL/min (Gradient) เป็นเวลา 15 นาที โดย Standard calibration curve มีความเป็นเส้นตรงของสารทั้ง 9 ชนิด คือ Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl และ Methiocarb อยู่ในช่วง 0.995 - 0.999 (เกณฑ์ $R^2 \geq 0.995$) อยู่ในช่วง 2.5 – 17.5 ppb ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบ LC-MS/MS (System suitability) ก่อนใช้งาน ด้วยสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 ppb ผ่านเกณฑ์ parameter ต่างๆ ดังนี้ $S/N \geq 3$, $\%RSD_{RT} \leq 1\%$, และ $\%RSD_{AREA} \leq 20\%$ ค่า $\%Recovery$ ของ Fortified sample มีความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g/kg}$ อยู่ในช่วงตามเกณฑ์ที่กำหนด คือ 60-120% ยกเว้น Aldicarb sulfoxide ที่ยังไม่ได้ผลการทดสอบตามเกณฑ์ ซึ่งต้องทำการพัฒนาปรับปรุงวิธีทดสอบต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: Carbamate Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl Methiocarb เนื้อไก่ LC-MS/MS

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development of the Determination of Carbamates in Chicken Meat

Widchuda Meeim	Wiphada Sirisomphobchai	Sarawut Chookrachun
Chonthicha Saiduang	Piyanuch Thongjeen	Sirirat Sittiruttanatrignul

Abstract

Method development of the determination of 9 carbamates (Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl, and Methiocarb) in chicken meat was delivered by 5 g of sample extracted in acetic acid in acetonitrile. Mix the sample solution homogeneously, and followed by Solid-Phase Extraction (SPE) technique (NH_2 1000 mg/6mL) to clean up the sample extract. The analysis was carried out by LC-MS/MS using 5 μm , 2.1 mm x 100 mm HPLC, Accucore aQ column at flow rate 0.25 mL/min in gradient condition for 15 min. The standard calibration curve between 2.5 – 17.5 ppb had linearity range as $R^2 = 0.995 - 0.999$ (cut off at $R^2 \geq 0.995$). LC system suitability was checked prior sample determination as following parameters: $S/N \geq 3$, $\%RSD_{RT} \leq 1\%$, and $\%RSD_{AREA} \leq 20\%$. The %recovery range of fortified samples at 2.5 $\mu\text{g/kg}$ was followed criteria at 60-120% except for aldicarb sulfoxide in chicken meat under going for future improvement.

Keywords: Carbamates, Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl, Methiocarb, Chicken meat, LC-MS/MS

Veterinary Public Health Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

การพัฒนาวิธีทดสอบสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

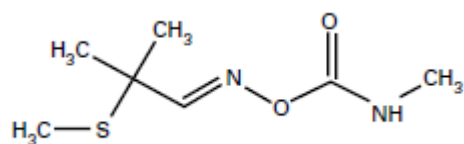
นางสาววิชุดา มีอิม
นางสาวชลธิชา สายด้วง

นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย
นางสาวปิยนุช ทองจิ้น

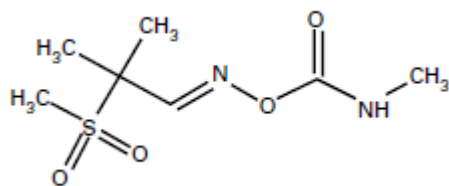
นายสรารัฐ ชูกระชั้น
นางสาวสิริรัตน์ สิทธิรัตนตรีกุล

บทนำ

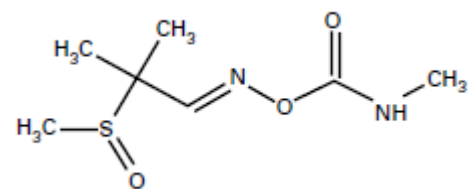
Carbamates (ภาพที่ 1) เป็นสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในครัวเรือนและภาคการเกษตรและปศุสัตว์ (Barel 2016; ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี) ซึ่งสารกลุ่มนี้ หากได้รับเข้าไปในร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ว่าทางตรงหรือทางอ้อม เช่น ผ่านทางปากจากการปนเปื้อนผ่านห่วงโซ่อาหารแล้ว สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetyl cholinesterase (ACHE) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณสารสำคัญในร่างกาย เช่น total lipid, total protein, albumin, glucose และ phosphate ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงาน เสื่อมสภาพและอาจก่อให้เกิดโรคตามมาในอวัยวะต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ไตและสมอง (Fukuto 1990; Samir 2000; Somayyeh 2010) มีผลกระทบต่อระบบประสาท โดยกระตุ้นปลายระบบประสาทอย่างรุนแรง ทำให้มีกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ ง่วง กระสับกระส่าย ตื่นตกใจง่าย อารมณ์พลุ่งพล่าน ชัก หมดสติ และอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ (ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยากระทรวงสาธารณสุข) ด้วยเหตุผลดังกล่าว หลายประเทศจึงเริ่มมีการบังคับใช้ค่ามาตรฐาน (Maximum Residue limit, MRL) สำหรับสารกลุ่ม Carbamate ในอาหารประเภทต่างๆ ซึ่งกำหนดค่าเฉพาะตัวของแต่ละประเทศ เช่น ญี่ปุ่น และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลุ่มประเทศสหภาพยุโรปซึ่งเป็นประเทศนำเข้าเนื้อไก่จำนวนมากจากไทย ได้มีการกำหนดค่า MRL ของสารกลุ่ม Carbamate ไว้หลายรายการตามประกาศของ EU Commission ทั้งนี้ สถิติการส่งออกเนื้อไก่ไทยไปกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปเมื่อปี 2561 มากถึง 770,000 ตัน (AVEC 2018) ดังนั้น เพื่อให้ประเทศคู่ค้าต่างๆ ที่ไทยส่งออกเนื้อไก่ไปเกิดความมั่นใจในมาตรฐานสินค้าประเภทเนื้อไก่ส่งออกของไทย หอปฏิบัติกรงานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์จึงเลือกพัฒนาวิธีทดสอบสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ โดยใช้แนวทางการทดสอบจากเอกสารของ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2017), Sun 2012, Zhai 2013 และ SANTE 2017 ซึ่งในอนาคต หากมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้แล้ว จะสามารถนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบเพื่อตรวจสอบคุณภาพเนื้อไก่ส่งออก โดยเป็นการสนับสนุนมาตรการสำหรับแผนเฝ้าระวังสารตกค้างเนื้อสัตว์ส่งออกประจำปีได้



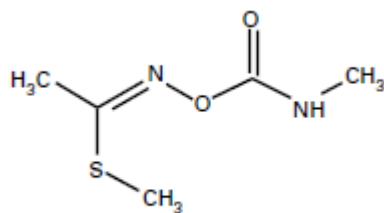
Aldicarb



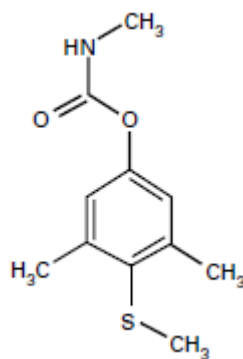
Aldicarb Sulfone



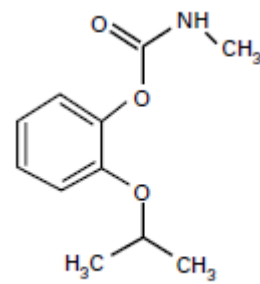
Aldicarb Sulfoxide



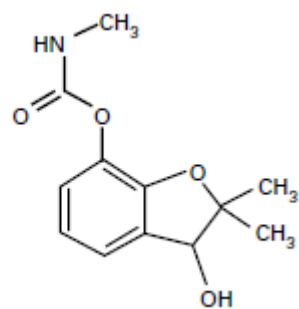
Methomyl



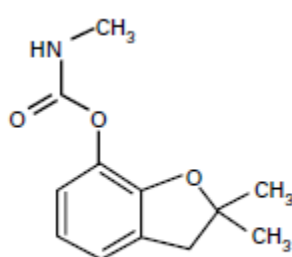
Methiocarb



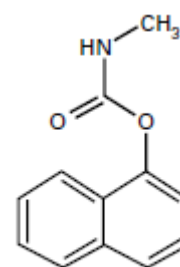
Propoxur



3-Hydroxy Carbofuran



Carbofuran



Carbaryl

ภาพที่ 1: โครงสร้างโมเลกุลของสารกลุ่ม Carbamate

วัตถุประสงค์

เพื่อใช้ทดสอบหาปริมาณสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ ได้

ขอบข่าย

ทำการพัฒนาวิธีทดสอบสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีทดสอบปริมาณสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS
2. เป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ต่อไป

วิธีการดำเนินการ

1. ค้นคว้าหาข้อมูลการสกัดตัวอย่างและการ clean up จากบทความทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ
2. ทำการปรับสภาวะเครื่อง LC-MS/MS ที่เหมาะสม รวมทั้ง ทำการทดสอบ sensitivity เครื่อง โดยใช้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ
3. วางแผนและดำเนินการสกัดตัวอย่างและการ clean up โดยปรับปริมาณทั้งปริมาณตัวอย่าง (ในช่วง 5 - 50 กรัม) รวมทั้ง ชนิดและปริมาณสารละลายและสารเคมี เช่น Ethyl acetate/Hexane, Acetone, Methanol และ Acetonitrile ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อให้เหมาะสมกับทรัพยากรที่มีในห้องปฏิบัติการ
4. ทำการเก็บข้อมูลผลการทดสอบ ในรูปแบบ %Recovery ของแต่ละการทดลองไว้

ผลการทดลอง

1. ได้วิธีการสกัดเพื่อทำการทดสอบในเชิงคุณภาพสำหรับสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ด้วยเทคนิค Liquid-Liquid Extraction (LLE) จากชนิดและปริมาณสารละลายที่ทดสอบแล้วให้ผลดีที่สุด คือ สารละลาย Acetonitrile แทน Ethyl acetate/Hexane จากนั้น ทำการ Clean up ด้วยเทคนิค Solid-Phase Extraction (SPE) ชนิด NH₂ 1000 mg/6mL
2. ทำการ Optimization เครื่อง LC-MS/MS และได้สภาวะสำหรับการทดสอบในเชิงคุณภาพสำหรับสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่
3. ทดสอบ Matrix effect ในช่วง Working range 2.5 – 17 ppb พบว่ามีผลกระทบที่เกิดจาก Matrix
4. ได้ค่า Instrument Detection Limit (IDL) ที่ 1 ng/L ซึ่งให้ Signal-to-Noise Ratio ไม่ต่ำกว่า 3
5. ได้ค่า Screening Detection Limit (SDL) และค่า Limit of Detection (LOD) ที่ 2.5 µg/kg
6. ทำการทดสอบหาค่า Limit of Quantification (LOQ) แล้ว พบว่าได้ %Recovery ยังไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด (เกณฑ์ %Recovery 60-120%) เพียง 1 ชนิด (Aldicarb sulfoxide) จากที่ทำการทดสอบทั้งหมด 9 ชนิด (Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran,

Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl และ Methiocarb) จึงได้ค่า estimate LOQ ที่ 7.5 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับสาร 8 ชนิด ยกเว้น Aldicarb sulfoxide

7. จากการตรวจสอบในเบื้องต้น สามารถทำการทดสอบเชิงคุณภาพด้วยวิธี Pooling 2x ถึง 3x ได้

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. วิธีการสกัดที่พัฒนานี้ เหมาะสมกับการทดสอบเชิงคุณภาพสำหรับสารกลุ่ม Carbamate ทั้งหมด 9 ชนิด คือ Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl และ Methiocarb
2. วิธีการสกัดที่พัฒนานี้ ยังไม่เหมาะสมสำหรับการทดสอบในเชิงปริมาณสำหรับสาร 1 ชนิด (Aldicarb sulfoxide) จากทั้งหมด 9 ชนิด (Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl และ Methiocarb) เนื่องจาก ได้ %Recovery ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ ซึ่งต้องทำการปรับปรุงเพิ่มเติมในอนาคต
3. ได้ LC-MS/MS condition ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบในเชิงคุณภาพ แต่ยังไม่เหมาะสมสำหรับการทดสอบเชิงปริมาณสำหรับสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่สำหรับ Aldicarb sulfoxide ที่ %Recovery ยังไม่ผ่านเกณฑ์ ในอนาคต ควรดำเนินการทดสอบหาชนิดสารละลายและอัตราส่วน สารละลายที่เหมาะสมต่อไป โดยในเบื้องต้นสารละลายที่ให้ผลที่ดีที่สุด คือ สารละลายกรดฟอร์มิก
4. เนื่องจาก Matrix มีผลต่อการทดสอบเชิงปริมาณ ฉะนั้น ต้องทำ Matrix-matched calibration แทนการใช้ Standard in solvent calibration ซึ่งจากการทดสอบคร่าวๆ ก่อนหน้านี้ ได้ทำการทดสอบ ตัวอย่างควบคุม Calibration ทั้งสองแบบให้ Linearity ที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ($r \geq 0.990$)
5. ได้ค่า SDL คือ 2.5 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับการทดสอบเชิงคุณภาพสำหรับสารทั้ง 9 ชนิด (Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl และ Methiocarb) ซึ่งอาจพัฒนาเพิ่มเติมในอนาคตให้วิธีทดสอบมี Sensitivity ที่ดีขึ้นกว่านี้ได้
6. ได้ค่า LOD คือ 2.5 $\mu\text{g/kg}$ และ estimate LOQ คือ 7.5 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับการทดสอบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ตามลำดับ สำหรับสารทั้ง 8 ชนิด (Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl และ Methiocarb ไม่รวม Aldicarb sulfoxide) ซึ่งอาจพัฒนาเพิ่มเติมในอนาคตให้วิธีทดสอบมี Sensitivity ที่ดีขึ้นกว่านี้ได้
7. หากสามารถดำเนินการปรับปรุงแก้ไขให้สามารถรองรับการทดสอบทั้งชนิดและปริมาณให้ครอบคลุมสารทั้งหมด 9 ชนิด (Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl และ Methiocarb) แล้ว ควรทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป เพื่อยืนยันค่าและตัวแปรต่างๆ เช่น ค่า LOQ, Repeatability, Reproducibility และ Stability เพิ่มเติมในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

เมื่อสามารถทำการทดสอบทั้งชนิดและปริมาณให้ครอบคลุมสารทั้งหมด 9 ชนิด (Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Methomyl, 3-Hydroxy carbofuran, Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl และ Methiocarb) แล้ว ควรทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไปในอนาคต เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในวิธีทดสอบที่เลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการงานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อนและผู้อำนวยความสะดวกท่านอื่นๆ ที่ให้ความช่วยเหลือเสมอมาทุกท่าน ทั้งให้คำปรึกษาด้านวิชาการ เทคนิค อุปกรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลืออื่นๆ ในทุกๆ ด้าน จนกระทั่งจบโครงการ การพัฒนาวิธีทดสอบสารกลุ่ม Carbamate ในเนื้อไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2017. การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้: กลุ่มคาร์บาเมต. *วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร*. 5: 55-62
2. ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยากระทรวงสาธารณสุข. ความรู้เกี่ยวกับสารพิษและวัตถุอันตราย: รู้จักคาร์บาเมต. Retrieved from http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_2_001c.asp?info_id=297
3. ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี. ภาวะเป็นพิษจาก Organophosphates และ Carbamates. Retrieved from https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/OP_CB
4. AVEC. AVEC Annual Report 2018.
5. Barel, S. et. al. 2016. Common Feed and Animal Derived Food Contaminants in Israel. *Isr. J. Vet. Med.* 71(4): 3-13.
6. CODEX Alimentarius International Food Standard (CXG 90-2017), 2017
7. EU Commission. EU Pesticides Database-European Commission. Retrieved from <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>
8. Fukuto T.R. 1990. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ. Health Perspect.* 87: 245-254.
9. SANTE. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11813/2017, 2017
10. Polarity Index. Retrieved from http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity_index.htm
11. Samir, A.M.Z. et. al. 2000. Carbamate Toxicity and Protective Effect of Vit. A and Vit. E on Some Biochemical Aspects of Male Albino Rats. *Egypt. J. Hosp. Med.* 1: 60-77.

12. Somayyeh K-M. and Mohammad A. 2010. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. *Hum. Exp. Toxicol.* 30(9): 1119-1140.
13. Sun, J.L. et. al. 2012. *Screening 36 Veterinary Drugs in Animal Origin Food by LC/MS/MS Combined with Modified QuEChERS Method*. Application Note: Food Testing and Agriculture, Agilent technologies.
14. Zhai, C.H. 2013. *Analysis of Pesticide Residues in Chicken Using Agilent BondElut QuEChERS and LC/MS/MS*. Application Note: Food Testing and Agriculture, Agilent technologies.