

การวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazole ในเนื้อไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ผู้จัดทำ : สิริรัตน์ สิทธิรัตนตรีกุล, จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน, นิรมล จิตต์สมหมาย, จิตนภา วรนิติกุล

บทนำ

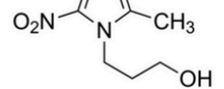
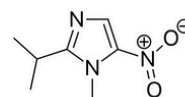
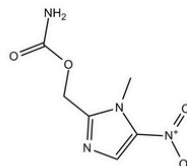
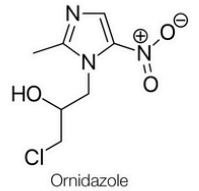
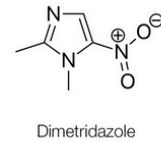
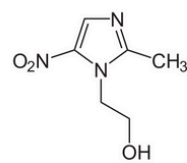
ในปัจจุบันสารตกค้างจากยาต้านจุลชีพมีการควบคุมอย่างเข้มงวดในหลายตลาดทั่วโลก หากผู้บริโภคได้รับเข้าไปหรือเกิดการสะสมในปริมาณมากอาจส่งผลกระทบต่อระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร และระบบหายใจของร่างกายได้ เนื่องจากผลของการศึกษาพบว่าตัวยาในรูป parent drugs เป็นสารที่สามารถก่อมะเร็งหรือเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมได้ ซึ่งการทดสอบและการควบคุมปริมาณยาปฏิชีวนะตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ไม่ให้เกิดโทษยอมรับได้ (Maximum Residue Levels – MRLs) จะช่วยเพิ่มความมั่นใจให้กับผู้บริโภคมากยิ่งขึ้นในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์จากท้องตลาด

กลุ่ม Nitroimidazoles เป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดที่มีการเติบโตได้โดยไม่ต้องพึ่งพาออกซิเจน (Anaerobic) และเชื้อโปรโตซัว ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ได้แก่ Metronidazole, Dimetridazole, Ornidazole, Ronidazole, Ipronidazole และ Ternidazole เป็นต้น

สารตกค้าง หมายถึง สารเคมี ยาสัตว์ หรือวัตถุอันตรายทางเภสัชภัณฑ์ ที่ใช้ในการผลิตสินค้า ที่มีปริมาณมากเกินกว่าเกณฑ์กำหนดให้มีได้ หรือที่ห้ามพบในสินค้า ซึ่งตามมาตรฐานสำหรับสินค้าเภสัชภัณฑ์ ห้ามพบสารตกค้าง กลุ่ม Nitroimidazoles ในเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร (Zero Tolerance)

LC-MS/MS เป็นเทคนิคมาตรฐานที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์สารตกค้าง เช่น กลุ่ม Nitroimidazole เนื่องจากเทคนิค Liquid Chromatography (LC) เป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการแยกชนิดของสารได้อย่างรวดเร็ว เมื่อนำไปต่อพ่วงกับ Mass Spectrometer (MS) ซึ่งมีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) สูง จึงทำให้สามารถ แยก ระบุ และยืนยัน ชนิดของสารตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ

ดังนั้นในปัจจุบันจึงถือได้ว่า LC-MS/MS ได้กลายเป็นเครื่องมือที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ซึ่งในบทความนี้จะเป็นการแสดงตัวอย่างการวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazole ในเนื้อไก่ โดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ QuEChERS ร่วมกับการใช้งานเครื่อง LC-MS/MS



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazole

สารมาตรฐาน

- เตรียม Mixed Standard ยากลุ่ม Nitroimidazole ความเข้มข้น 5 ng/mL และ ISTD ความเข้มข้น 10 ng/mL โดยละลายในตัวทำละลาย 20% Acetonitrile

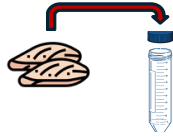


รูปที่ 1 เครื่องแยกสารด้วยของเหลว (Liquid Chromatography) ต่อพ่วงเครื่องวิเคราะห์น้ำหนักมวล (Triple Quadrupole Mass Spectrometer)

การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS

ซังเนื้อไก่บดละเอียด

จำนวน 5 g ใส่หลอดขนาด 50 ml



เติมสารละลาย 0.2M ammonium oxalate/0.1M EDTA 0.5 ml

เติม ISTD ความเข้มข้น 10 ppb จำนวน 0.5 ml

เติม Acetonitrile ให้ปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 15 ml

เติม Anhydrous sodium sulphate 5.00 g



เขย่า 5 นาที และ Vortex 10 นาที จากนั้นตั้ง

ทิ้งไว้ 10 นาที และ centrifuge ที่ 7,000xg,

4°C, 10 นาที



เทสารละลายใส่ส่วนบนทั้งหมด ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml

เติม CEC18 dSPE 500 mg และเขย่า 15 นาที

จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 7,000xg, 4°C, 5 นาที



ดูดสารละลายใสส่วนบน ปริมาตร 10 ml ใส่ลงใน

หลอดทดลองชนิดแก้วขนาด 15 ml และนำไป

ไปเป่าแห้งด้วย N2-Evap ที่ 40 °C



ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ul ด้วย 20% Acetonitrile ผสมให้

เข้ากันด้วย vortex และกรองด้วย PTFE filter ขนาด 0.22 um

การตั้งค่าเครื่องมือวิเคราะห์

UHPLC: Vanquish Flex (Thermo Scientific™)

- Column Thermo Scientific Accucore™ VDX, (100 x 2.1 mm x 2.6 μm)
- **Mobile phase A:** 0.05% Formic acid in DI water
- **Mobile phase B:** 0.05% Formic acid in 95% ACN
- Flow rate: 0.3 mL/min, Injection volume: 10 μL
- Column temp: 40 °C

Time	Flow (ml/min)	%A	%B
0.00	0.300	80	20
1.50	0.300	80	20
6.00	0.300	0	100

ตารางที่ 1 แสดงเกรเดียนท์ของการวิเคราะห์

Mass Spectrometer: TSQ Quantis Plus (Thermo Scientific™)

- Polarity: Positive mode
- Spray Voltage: 4.8 kV
- Sheath Gas: 50, Aux Gas: 13
- Temp: 310 °C, Vaporizer Temp: 350 °C

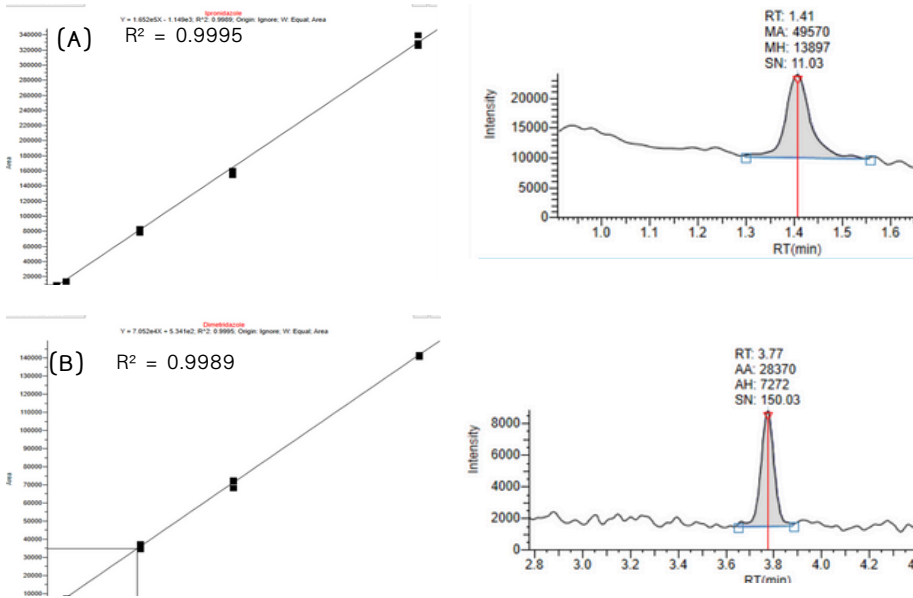
Compound	RT (min)	Precursor (m/z)	RF (v)	Quantitation (m/z)	CE (v)	Confirming (m/z)	CE (v)
Metronidazole-hydroxy	0.89	188	117	144	13	123	13
Metronidazole (ISTD) ^f	1.04	176	70	132	15	86	24
Metronidazole	1.05	172	97	128	14	82	24
Dimetridazole-2-hydroxy	1.09	158	108	55	20	112	21
Ronidazole-D3 (ISTD)	1.20	204	84	143	13	58	24
Ronidazole	1.20	201	94	55	27	140	11
Dimetridazole-D3 (ISTD)	1.38	145	106	99	16	83	28
Dimetridazole	1.39	142	107	96	17	81	28
Ipronidazole-hydroxy	1.94	186	97	168	14	122	21
Ornidazole	2.09	220	100	128	17	82	30
Ternidazole hydrochloride	2.09	222	100	128	17	82	31
Ipronidazole-D3 (ISTD)	3.73	173	30	127	21	112	26
Ipronidazole	3.78	170	135	109	26	124	18

^f แทนที่ C-13 สองตำแหน่ง และ N-15 สองตำแหน่ง

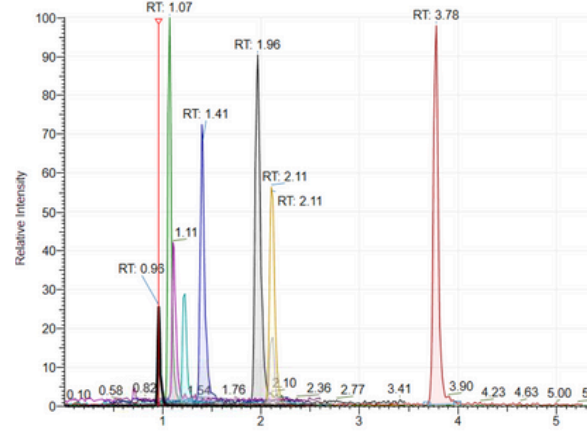
ตารางที่ 2 แสดง Rt และ m/z ของยาในแต่ละชนิด

ผลการตรวจวิเคราะห์

จากการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazole ในเนื้อไก่ โดยใช้เทคนิคการสกัด QuEChERS ร่วมกับการใช้งานเครื่อง LC-MS/MS เส้นกราฟมาตรฐานของตัวอย่างสาร 2 ชนิดครอบคลุมในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-2.0 ng/mL (รูปที่ 2) และจากการวิเคราะห์ด้วยโหมด Selected Reaction Monitoring (SRM) โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 6 นาที พบว่าค่า R^2 มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.995, ค่า Limits of Detection (LODs) และค่า Limits of Quantitation (LOQs) ของสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazole (ตารางที่ 2) ซึ่งมีค่าที่ดีกว่าข้อกำหนด MRLs จึงทำให้เครื่อง LC-MS/MS เป็นมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ที่ตอบโจทย์และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการวิเคราะห์สารตกค้างในกลุ่ม Nitroimidazole และสารกลุ่มอื่นๆทั้งในปัจจุบันและอนาคตอันใกล้ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 2 เส้นกราฟมาตรฐานและโครมาโตแกรมของ Dimetridazole (A) และ Ipronidazole (B)



รูปที่ 3 Chromatogram ของการวิเคราะห์สารกลุ่ม Nitroimidazoles

Compound	R^2	Conc. at low level	S/N at low level	LOD (ug/kg)	LOQ (ug/kg)
Metronidazole	0.9978	0.50	11.76	0.13	0.42
Dimetridazole	0.9950	0.05	3.07	0.05	0.16
Ronidazole	0.9987	0.05	3.02	0.05	0.16
Ornidazole	0.9992	0.01	6.70	0.004	0.015
Ipronidazole	0.9989	0.01	10.38	0.003	0.01
Ternidazole hydrochloride	0.9975	0.01	Infinity	N/A	N/A

ตารางที่ 3 แสดงค่า R^2 ค่า LOD และค่า LOQ ของสารกลุ่ม Nitroimidazole

เอกสารอ้างอิง

1. Codex Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CXM 2-2023
2. เกณฑ์การรับรองสินค้าปศุสัตว์ (Q mark) ของกรมปศุสัตว์
3. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 พ.ศ. 2550 เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง
4. ประกาศกรมปศุสัตว์ กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์ ปี 2549
5. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ: มกษ 9002-2559 ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด
6. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ: มกอช. เนื้อไก่ 6700-2548