

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาต้านจุลชีพตกค้างในผลไม้ โดยเทคนิค liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Method validation of antibiotics residue in fruits by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

เฉลิมพร ควรรหา* สิริลักษณ์ ชัยรินทร์ และภรพรพรรณ ส่งศรี

Chalearnphorn Kuanha*, Sirilak Chairin and Pompun Songsri

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

ยาต้านจุลชีพถูกใช้อย่างกว้างขวางเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งในคนและเป็นยาสำหรับสัตว์ ทุกวันนี้มีการนำยาต้านจุลชีพมาใช้ในพืชเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียบางตัวในพืช เช่น โรคกรีนนิ่งของต้นส้ม และโรคไหม้ไฟของต้นแอปเปิล เป็นต้น การใช้ยาอย่างไม่ถูกต้องเป็นสาเหตุของการตกค้างในผลไม้ที่นำมาบริโภค จึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาต้านจุลชีพตกค้าง 4 ชนิด ได้แก่ แอมพิซิลลิน อะม็อกซิซิลลิน เตตราไซคลิน และออกซีเตตราไซคลินในส้มและแอปเปิล ยาต้านจุลชีพจะถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน HLB cartridge จากนั้นตรวจวัดชนิดและปริมาณโดยเครื่อง LC-MS/MS จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ วิธีมี Limit of Detection เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Limit of Quantitation เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่า % Recovery อยู่ในช่วง 65 - 113% และ % RSD อยู่ในช่วง 1.4-11.3% มีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง เท่ากับ 10-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) มากกว่า 0.999 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ได้ค่า relative standard uncertainty เท่ากับ 9.6% เมื่อนำวิธีที่พัฒนาและทดสอบความใช้ได้แล้ว มาสำรวจปริมาณการตกค้างของสารต้านจุลชีพในส้ม 111 ตัวอย่าง และแอปเปิล 96 ตัวอย่าง รวม 207 ตัวอย่าง ที่เก็บจากแหล่งจำหน่ายในประเทศ ในปี พ.ศ. 2560 ส้มมีการตรวจพบแอมพิซิลลินและออกซีเตตราไซคลิน 16 ตัวอย่าง ปริมาณที่พบมีค่าน้อยกว่า 10 ถึง 145 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แอปเปิลมีการตรวจพบยาทั้งสี่ชนิด จำนวน 2 ตัวอย่าง ปริมาณที่ตรวจพบมีค่า 16 ถึง 103 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

คำสำคัญ: ยาต้านจุลชีพ, ส้ม, แอปเปิล, การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

Abstract

Antibiotics are widely used in the treatment and prevention of bacteriostatic infections in humans and used as veterinary medicine in animals. Nowadays, antibiotics have been used in plant agriculture to control certain bacterial diseases, such as citrus greening disease and fire blight in apple. Thus, any misuse may result in the presence of residues in fruit. The validation study of an analytical method of 4 antibiotics including ampicillin, amoxicillin, tetracycline and oxytetracycline in citrus and apple was conducted and developed. Antibiotics were extracted from sample by phosphate buffer and proceeded to HLB cartridge for clean-up step. Antibiotics were detected and were quantitatively determined by LC-MS/MS. The performance characteristics of validation data were acceptable and fitted-for-purpose. As a result of method validation, limit of detection was defined as 5 µg/kg and limit of quantitation was 10.0 µg/kg. The accuracy and the precision were tested as 3 levels by 10 replicates analysis. Accuracy as % Recovery was found to be in acceptable ranges of 65-113 and precision as % RSD was 1.4-11.3%. The linear working range was 10 - 500 µg/kg with the Pearson correlation of coefficient (r) more than 0.999. The estimated uncertainty of measurement shown by % relative standard uncertainty was 9.6%. A total of 207 fruits samples including 111 citrus and 96 apples were collected from supermarket and retail markets in Thailand during 2017 to perform the survey based study on antibiotics abuse. The results showed that 16 samples of citrus were ampicillin and oxytetracycline detectable at lower than 10 to 145 µg/kg. Thus, 2 apple samples contained 4 compounds at 16 to 103 µg/kg.

Key words: Antibiotics, citrus, apple, method validation

*Corresponding author

E-mail: chalearnporn.k@dmsc.mail.go.th