

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลตกค้างในนมผงและน้ำผึ้ง โดยวิธี LC-MS/MS

ลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ เฉลิมพร ควรรหา และกนกพร อธิสุข

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ พัฒนาและทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะ chloramphenicol (CAP) ตกค้างในนมผง และน้ำผึ้งด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS สาร CAP ถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดยวิธี solid-phase extraction ด้วย C-18 cartridge และทำให้บริสุทธิ์ด้วย neutral aluminium oxide cartridge ใช้ D-5 CAP เป็น internal standard จากนั้นตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค electrospray ionization mode negative ซึ่งวิธีดังกล่าวมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) เท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (Linear working range) เท่ากับ 0.1 - 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.9998 ทั้งในนมผงและน้ำผึ้ง และตลอดช่วงการวิเคราะห์ มีความแม่นยำ (Accuracy) แสดงโดยค่าเฉลี่ยของ %Recovery โดยการเติมสารมาตรฐาน 4 ระดับ อยู่ในช่วง 94.4 - 119.0% สำหรับนมผง และ 86.2 - 112.0% สำหรับน้ำผึ้ง ความเที่ยง (Precision) แสดงด้วยค่า %RSD เท่ากับ 2.7 - 4.4 สำหรับนมผง และ 2.0 - 5.8 สำหรับน้ำผึ้ง จากผลการทดสอบวิธีวิเคราะห์ สรุปได้ว่าวิธีดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะ เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจยืนยันสาร CAP ในนมผงและน้ำผึ้งเพื่อการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานอาหารดังกล่าวได้

บทนำ

คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol, CAP) เป็นยาปฏิชีวนะที่แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces venezuelae* ตั้งแต่ พ.ศ. 2490 ปัจจุบันใช้วิธีสังเคราะห์ทางเคมี เดิมนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างครอบคลุมเชื้อหลายชนิดทั้งแอโรบิคแบคทีเรีย, แอนแอโรบิคแบคทีเรีย, rickettsiae, chlamydia, spirochetes และ mycoplasma จนกระทั่ง พ.ศ. 2493 พบอาการที่ไม่พึงประสงค์ คืออาการพิษต่อระบบเลือด โดยกดไขกระดูกเกิดโรคโลหิตจางชนิดร้ายแรง คือ aplastic anemia⁽¹⁾ จึงทำให้มีการจำกัดการใช้ CAP

ในคนอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากอาจมีการตกค้างของยาที่จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ประเทศต่าง ๆ ในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ รวมทั้งประเทศไทยได้ยกเลิกตำรับยาที่ใช้ในสัตว์ที่นำมาบริโภค โดยประเทศไทยได้ประกาศยกเลิกตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2531 และประเทศผู้นำเข้าอาหารส่วนใหญ่กำหนดว่าต้องตรวจไม่พบ CAP ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไข่ นม สัตว์น้ำและน้ำผึ้ง ประเทศไทยเริ่มตระหนักในปัญหา CAP ตกค้างในอาหารอีกครั้งเมื่อปลายเดือนตุลาคม พ.ศ. 2544 หลังจากได้รับแจ้งว่าสหภาพยุโรปได้ระงับการนำเข้า

กึ่งแข็งจากจีน อินโดนีเซีย และเวียดนาม เนื่องจากตรวจพบ CAP ะยะแรกมีข่าวตรวจพบในกึ่งจากประเทศไทยด้วย แต่ต่อมาพบว่าข่าวคลาดเคลื่อน⁽²⁾

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 เป็นต้นมาสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ CAP เบื้องต้นโดยวิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ซึ่งเป็น Semi-quantitation method เพราะเป็นเทคนิคที่มี sensitivity สูง โดยมี limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สามารถตรวจได้ในตัวอย่าง เนื้อสัตว์ นม ไข่ น้ำผึ้ง และเนยแข็ง แม้ว่าจะเป็วิธีที่สะดวก รวดเร็ว กล่าวคือมี high throughput แต่เป็นเพียงวิธีการตรวจเบื้องต้น หากตรวจพบต้องตรวจยืนยันโดยวิธีทาง chromatographic อื่น ๆ⁽³⁾ วิธีการตรวจยืนยันแต่เดิมใช้เครื่องมือ Gas chromatograph-Electron Capture Detector ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการตามวิธีของ Pfenning AP และคณะ⁽⁴⁾ เป็นวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ CAP ในเนื้อกึ่ง มีค่า LOD เท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าวิธี ELISA ถึง 60 เท่า และไม่สามารถใช้กับอาหารอื่น เช่น นม น้ำผึ้งได้ หากไม่มีข้อมูล Method validation ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศฉบับที่ 268 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดกำหนดให้อาหารทุกชนิดมีมาตรฐานโดยตรวจไม่พบการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลและเกลือของสารนี้⁽⁵⁾ พร้อมนี้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ออกประกาศเรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีตรวจและห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนได้อย่างน้อยต่ำกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁶⁾

จากการปรับเปลี่ยนบทบาทของกระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในการกำกับดูแลความปลอดภัยอาหาร กระทรวงสาธารณสุข มีหน้าที่ดูแลอาหารนำเข้าจากต่างประเทศที่นำมาบริโภคภายในประเทศ ทำให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีภารกิจที่จะต้องตรวจวิเคราะห์ CAP ตกค้างในอาหารที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีความเสี่ยง ได้แก่ นมผงและน้ำผึ้ง ในกรณีนมผงนั้นเดิมมีการใช้ CAP ในการรักษาอาการเต้านมอักเสบในวัวนม ส่วนน้ำผึ้งนั้น ประเทศแคนาดาได้ตรวจพบ CAP ในน้ำผึ้งนำเข้าจากประเทศจีน เพื่อพัฒนาขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ให้รองรับกฎหมายอาหาร ผู้วิจัยได้นำวิธีตรวจวิเคราะห์ของ Sørensen LK และคณะ⁽⁷⁾ มาปรับปรุง เพื่อพัฒนาใช้วิเคราะห์ CAP ในตัวอย่างนมผงและน้ำผึ้ง โดยเพิ่มขั้นตอนการกำจัดไขมันออกจากตัวอย่างเปลี่ยนสารที่ใช้เป็นตัวชะ (eluent) ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ และได้นำ stable isotope, D5-CAP มาใช้เป็น internal standard โดยได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจยืนยันสารนี้

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน chloramphenicol (CAP) (DMSc Reference Standard, ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.54) D5-chloramphenicol (D5-CAP) solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน acetonitrile (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)

สารเคมี acetonitrile (JT Baker, HPLC grade), ethyl acetate (JT Baker, HPLC grade), methanol (Merck, HPLC grade), formic acid (AR grade), C-18 cartridges, 500 mg 3 cc (Water Corp., Part No. WAT020805) neutral

aluminium oxide cartridges, 1,750 mg (Water Corp., Part No. WAT020510)

การเตรียมสารมาตรฐาน

Standard solution : CAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐาน CAP 10 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ใช้เตรียม working standard ความเข้มข้น 100 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol

Internal standard : D5-CAP เตรียม working standard ความเข้มข้น 100 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Sartorius), เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (Sartorius), refrigerated centrifuge (Mikro 22R), water bath (Precision 180 series), vortex mixer, nitrogen evaporator temperature controlled heating box, vacuum pump and vacuum manifold processor comprising vacuum block, micro pipette ขนาด 10 - 100 μ l 20 - 200 μ l และ 100 - 1,000 μ l, test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.45 μ m PVDF (Alltech Catalogue No.24144), ชุดกรอง mobile phase พร้อม membrane filter 0.45 μ m PVDF ขนาด 47 มิลลิเมตร, HPLC vial ลีซ่า ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เครื่อง LC-MS/MS : ประกอบด้วย binary pump : Agilent 1100 series, autosampler : Agilent 1100 series, micro vacuum degasser : Agilent 1100 series, thermostatted column compartment : Agilent 1100 series, triple Quadupole mass spectrometer : API 4000 โดยมีสภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

LC-MS/MS conditions :

- analytical column-Cliepus C₁₈ (5 μ m, 150 mm \times 3 mm id, Higgins Analytical Inc.)
- mobile phase A : 0.1% formic acid in water
- mobile phase B : acetonitrile
- flow rate : 0.6 ml/min
- injection volume : 10 μ l
- column temperature : 30°C

Gradient LC conditions :

Time (min)	%Mobile phase A	%Mobile phase B
0.0	90	10
1.5	60	40
2.5	60	40
5.0	20	80
7.5	20	80
8.0	90	10
10.0	90	10

MS conditions;

- Ionization mode : ESI (Turbo spray), Negative
- Ion spray voltage : -3500 Volts
- Temperature, TEM : 500°C
- Collision gas (CAD) : Nitrogen
- Collision gas (CAD) : 5 psig
- Curtain gas (CUR) : 16 psig
- Ion Spray Nebulizer Gas (GS-1) : 56 psig
- TIS Heater Gas (GS-2) : 60 psig
- EP : -10 Volts

MS/MS fragmentation conditions;

Component (m/z)	Precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Dwell time (ms)	DP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
CAP	321.05 ± 0.5	256.7 ± 0.5	100	-58	-16	-35
		151.7 ± 0.5	100	-58	-25	-36
D5-CAP	326.05 ± 0.5	156.7 ± 0.5	100	-58	-25	-36

ตัวอย่าง

นมผง และน้ำผึ้ง ที่ตรวจไม่พบ CAP โดยวิธี ELISA (LOD เท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

การเตรียมตัวอย่าง

นมผง - ชั่งตัวอย่างนมผง 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เติม internal standard (D5-CAP) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไป centrifuge ที่ 4°C ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ปิเปต สารละลายส่วนใส 10 มิลลิลิตร ใส่ใน screw cap test tube ขนาด 15 มิลลิเมตร

น้ำผึ้ง - ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 5 กรัม เติม internal standard (D5-CAP) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย 10 มิลลิลิตร ใส่ใน screw cap test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

การสกัด

อุ่นสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 38 - 40°C นาน 5 - 10 นาที เตรียม C-18 cartridge ต่อเข้ากับ vacuum manifold ปรับ flow rate ประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที prewash cartridge ด้วย methanol 5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำ 3 มิลลิลิตร แล้วถ่ายสารละลายตัวอย่างที่อุ่นไว้ลงใน cartridge ล้าง cartridge ด้วยน้ำ 4 มิลลิเมตร แล้ว

vacuum จน cartridge แห่งในสภาวะสุญญากาศ จากนั้น elute ด้วย ethyl acetate 4 มิลลิลิตร เก็บ eluate ที่ได้ใน screw cap test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

การทำให้บริสุทธิ์

เตรียม neutral alumina cartridge ต่อเข้ากับ vacuum manifold ปรับ flow rate ประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที prewash neutral alumina cartridge ด้วย ethyl acetate 5 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสารละลาย ethyl acetate ที่ได้จากการสกัดลงใน neutral alumina cartridge เก็บ eluate (สารละลายที่ผ่านจาก cartridge) ล้าง screw cap test tube ด้วย ethyl acetate 2 มิลลิลิตร แล้วผ่านลงใน cartridge รวมเก็บ eluate ที่ได้ใน screw cap test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วย nitrogen ที่อุณหภูมิ 50 - 55 °C จนแห้ง ละลาย residue ด้วย acetonitrile : น้ำ (1 : 3) 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixer 30 วินาที ถ่ายใส่ micro-spin filter tube นำไป centrifuge 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ถ่ายสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารมาตรฐาน CAP ความเข้มข้น 0.10 - 10.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับ 0.1,

0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยเติม internal standard D5-CAP 1.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในทุกความเข้มข้นของ CAP ที่เตรียม สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง concentration ratio ของสารมาตรฐานและ internal standard กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานและ internal standard คำนวณหาสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)^(8, 9)

การวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

method blank : สกัดสารเคมีที่ใช้ทั้งหมด โดยใช้น้ำกลั่น 10 มิลลิเมตร ดำเนินการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่พัฒนา 2 ชั่วโมง method blank เข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อดูว่ามี mass หรือ peak ปรากฏหรือไม่

matrix blank : สกัด นมผงและน้ำผึ้งที่ตรวจ ไม่พบสาร CAP โดยวิธี ELISA ดำเนินการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่พัฒนา ชนิดละ 2 ชั่วโมง method blank เข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อดูว่ามี mass หรือ peak ปรากฏหรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำ ๆ ค่า LOD (โดยประมาณ) มีค่าเท่ากับ 3 เท่า signal-to-noise คำนวณต่อน้ำหนักของตัวอย่าง ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง นมผงและน้ำผึ้ง ที่ระดับ LOD โดยเติม internal standard ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครลิตร ชนิดละ 10 ชั่วโมง

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานลงใน ตัวอย่าง นมผงและน้ำผึ้ง ที่ระดับ ประมาณ 3 เท่า ของ LOD โดยเติม internal standard ความเข้มข้น

100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครลิตร ชนิดละ 10 ชั่วโมง คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้ว คำนวณ %Recovery และค่า %RSD

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Working Range)

เติมสารมาตรฐานลงในนมผงและน้ำผึ้ง 7 ระดับ ในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 5.0 นาโนกรัมต่อกรัม ที่ 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 นาโนกรัมต่อกรัม โดยเติม internal standard ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 25 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ระดับละ 1 ชั่วโมง สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio คำนวณหาค่า r

การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง (Accuracy and Precision)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐานที่ 4 ระดับ ในช่วง linear working range ได้แก่ 0.1, 0.3, 1.0 และ 5.0 นาโนกรัมต่อกรัม โดยเติม internal standard ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร 25 ไมโครลิตรใน ตัวอย่าง นมผงและน้ำผึ้ง ระดับละ 10 ชั่วโมง ปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ %Recovery และ %RSD

การประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการทดสอบที่ได้จะถูกประเมิน ดังนี้ %Recovery : ช่วงที่ยอมรับได้คือ ร้อยละ 50 - 120 ส่วน %RSD ค่าที่ยอมรับ น้อยกว่า 35%⁽¹⁰⁾

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Uncertainty)

การประเมินความไม่แน่นอนของการวัด โดย คำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่งรวมค่า

ความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณความไม่แน่นอนขยาย โดยใช้ค่า $k = 2$ ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ตามวิธีที่ได้ทดสอบ⁽¹¹⁾

ปริมาณสารที่พบ หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g}/\text{kg}$) โดยคำนวณได้จาก

$$\text{จากสมการเส้นตรง} \quad Y = mC + b$$

$$C = \frac{Y - b}{m}$$

เมื่อ m คือ slope
 b คือ intercept
 Y คือ peak area ratio
 C คือ concentration ratio

ดังนั้น ปริมาณ CAP ที่พบ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

$$= \frac{C \times \text{ความเข้มข้น Internal std } (\mu\text{g}/\text{ml}) \times V(\text{ml})}{Wt(\text{g})}$$

เมื่อ Wt คือ น้ำหนักของตัวอย่าง
 V คือ ปริมาตรสุดท้าย

ผล

การวิเคราะห์ method blank ของ reagent ที่ใช้และ matrix blank ของตัวอย่างนมผงและน้ำผึ้งที่ตรวจไม่พบ CAP โดยวิธี ELISA ไม่พบ peak

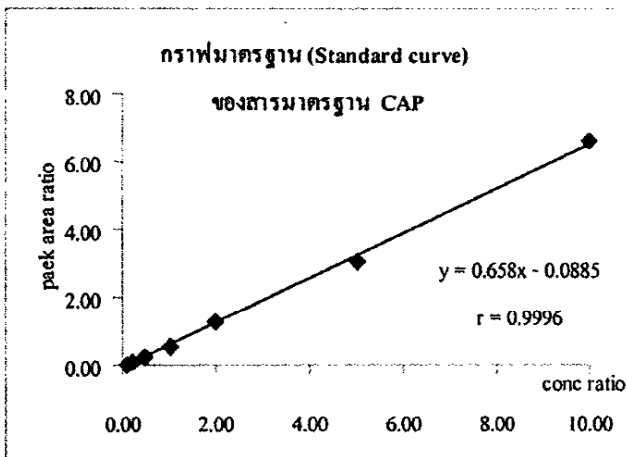
รบกวน ส่วนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio ของสารมาตรฐานและ internal standard กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานและ internal standard ที่ระดับ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้กราฟที่เป็นเส้นตรง มีค่า r เท่ากับ 0.9996

จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีค่า LOD เท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการพิสูจน์ค่า LOD โดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับ LOD ในตัวอย่างนมผงและน้ำผึ้งแล้ววิเคราะห์ 10 ซ้ำ ผลสามารถตรวจพบทุกตัวอย่าง โดยมี signal to noise สูงกว่า 3 ทุกตัวอย่าง และวิธีวิเคราะห์นี้มีค่า LOQ เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับ LOQ ในตัวอย่างนมผงและน้ำผึ้งแล้ววิเคราะห์ 10 ซ้ำ พบว่า %Recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ผลค่า %Recovery ของนมผงและน้ำผึ้งอยู่ในช่วง 102.0 - 119.0% และ 92.5 - 112.0% ส่วน %RSD เท่ากับ 4.4% และ 5.8% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

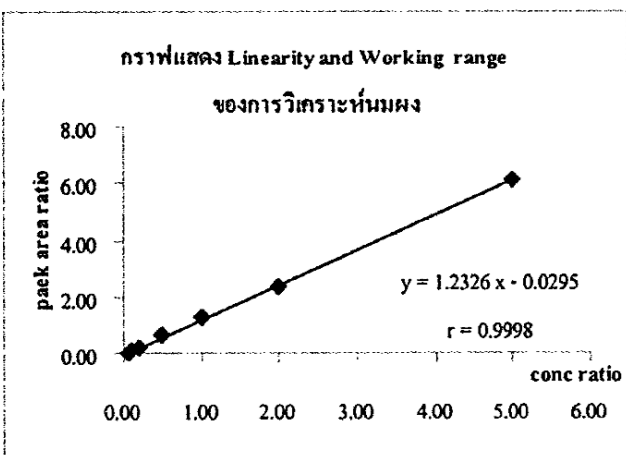
ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง ในการวิเคราะห์ CAP ในนมผงและน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระดับละ 10 ซ้ำ

ชนิดตัวอย่าง	spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	%Recovery		%RSD
		Min - max	Mean \pm SD	
นมผง	0.1	102.0 - 119.0	114.9 \pm 5.0	4.4
	0.3	97.9 - 104.0	100.4 \pm 2.7	2.7
	1.0	94.4 - 105.0	98.8 \pm 3.6	3.6
	5.0	96.2 - 110.0	99.6 \pm 4.0	4.0
น้ำผึ้ง	0.1	92.5 - 112.0	100.6 \pm 5.9	5.8
	0.3	86.2 - 92.3	89.3 \pm 2.2	2.4
	1.0	101.0 - 111.0	106.9 \pm 4.2	4.2
	5.0	95.3 - 101.0	98.1 \pm 1.9	2.0

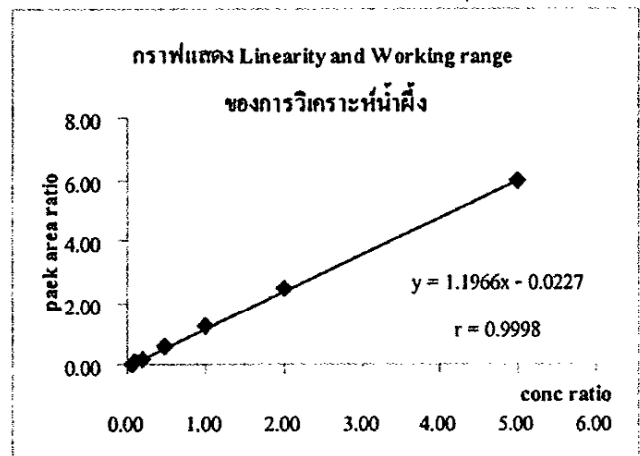
ในการทดสอบความตรงและช่วงการวิเคราะห์ พบว่าช่วงความเข้มข้น CAP ในตัวอย่างนมผงและน้ำผึ้ง 0.05 - 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟเส้นตรงมีค่า r เท่ากับ 0.9998 ในทั้งสองตัวอย่าง ซึ่งกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน CAP และกราฟแสดงการทดสอบความตรงและช่วงการวิเคราะห์ของการวิเคราะห์นมผงและน้ำผึ้ง (ภาพที่ 1 - 3)



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของสารมาตรฐาน CAP



ภาพที่ 2 กราฟแสดง Linearity and Working range ของการวิเคราะห์นมผง



ภาพที่ 3 กราฟแสดง Linearity and Working range ของการวิเคราะห์น้ำผึ้ง

การทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.1 (ระดับ LOQ), 0.3, 1.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ผลค่าเฉลี่ย %Recovery ของนมผงและน้ำผึ้ง อยู่ในช่วง 94.4 - 119.0% และ 86.2 - 112.0% ตามลำดับ ส่วน %RSD จากการวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ ของนมผงและน้ำผึ้ง อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เช่นกัน (ตารางที่ 1)

ทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ โดยใช้การวิเคราะห์ chloramphenicol ในนมผงเป็นตัวอย่าง พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง ค่า concentration ratio, C ที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน และ Precision เมื่อได้คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย มีค่าเท่ากับ ± 14.7% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่า Relative standard uncertainty, $u(x)/x$, ค่า Combined standard uncertainty และ Expanded uncertainty, U (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงค่า Relative standard uncertainty, $u(x)/x$, ค่า Combined standard uncertainty และ Expanded uncertainty, U

Component	Value, x	Standard uncertainty, u	Relative standard uncertainty $u(x)/x$
1. sample weight	5 g	0.00175 g	0.00035
2. C	0.680 ng/ml	0.0346 ng/g	0.05096
3. Volume	50 ml	0.0241 ml	0.00048
	10 ml	0.01246 ml	0.00125
	0.5 ml	0.00120 ml	0.00240
			0.00275
4. standard dilution	0.00999 g	0.00019 g	0.01902
	10 ml	0.02311 ml	0.00231
	0.5 ml	0.00120 ml	0.00240
	50 ml	0.1158 ml	0.00232
	0.5 ml	0.00120 ml	0.00240
	50 ml	0.1158 ml	0.00232
	0.25 ml	0.00065 ml	0.00261
	5 ml	0.01156 ml	0.00231
			0.02000
5. repeatability	100	4.4	0.04400
Combine standard uncertainty			0.07030
Expanded uncertainty U		$r \times 2 \times 0.07030$	0.048 $\mu\text{g}/\text{kg}$
r; result = 0.34 $\mu\text{g}/\text{kg}$			

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์ของ Sørensen LK และคณะที่นำมาศึกษานั้นเป็นวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันโดยมี LOD เท่ากับ 0.03 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า %Recovery เล็กที่ระดับ 0.1 - 0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมเท่ากับ 90%⁽⁷⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธีที่ได้พัฒนาพบว่าค่า LOD และ %Recovery ใกล้เคียงกัน และสามารถขยายขอบข่ายการวิเคราะห์ให้ครอบคลุมตัวอย่างน้ำผึ้งด้วย จากการทดสอบวิธีพบว่าปริมาณไขมันในตัวอย่าง ผลต่อการวิเคราะห์และเป็นสาเหตุทำให้ column อุดตันได้ ดังนั้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการดึงไขมันออกจากตัวอย่างให้มากที่สุด ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจึงนำตัวอย่างไป centrifuge ที่

อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ตามวิธีการวิเคราะห์ chloramphenicol-EIA⁽³⁾ จากนั้นนำตัวอย่างไปอุ่นที่อุณหภูมิ 38 - 40°C ก่อนที่จะนำตัวอย่างไปสกัดด้วยวิธี solid-phase extraction โดยผ่าน C-18 cartridge เพื่อป้องกันปัญหาการอุดตันของ column ที่เกิดจากไขมันที่กักจืดไม่หมดและจับตัวกัน ส่งผลให้การวิเคราะห์รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ได้มีการนำสาร D-5 CAP ซึ่งเป็นสาร stable isotope มาใช้เป็น internal standard ใช้ในการคำนวณเปรียบเทียบกับเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีแทนการทำ matrix calibration standards ทำให้ลดเวลาและความยุ่งยากในการหา matrix blank มาใช้

ส่วนวิธีการ clean up โดยผ่าน neutral alumina cartridge พบว่าการใช้ acetonitrile เป็นตัวพาตามวิธีเดิม ไม่สามารถกำจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ได้หมดโดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งทำให้เกิด background signal สูงในขั้นตอนการหาปริมาณด้วย LC-MS/MS จึงได้ทดสอบใช้ ethyl acetate แทน พบว่าสามารถกำจัดสารที่รบกวนได้ และไม่ทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ลดลง ซึ่งพบว่าตัวทำละลาย ethyl acetate มีคุณสมบัติเหมาะสม

การวิเคราะห์โดยเครื่องมือ LC-MS/MS ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัด ion ของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกัน จึงมีความจำเพาะ และด้วย detector ชนิด tandem mass spectrometer ซึ่งตรวจวัดโดยเลือก mass ถึง 2 ครั้ง คือครั้งแรกเลือก precursor ion หรือ parent ion จากนั้นใช้ก๊าซเฉื่อย เช่น ฮีเลียม อาร์กอน หรือไนโตรเจน วิ่งเข้าชนทำให้เกิด fragmentation ได้ product ion หรือ daughter ion จากนั้นเลือก product ion 2 - 3 ion โดยจะเลือก ion ที่มี response สูง ในการวิเคราะห์ CAP นี้ เลือก m/z 321.0 เป็น precursor ion และเลือก daughter ion ที่ m/z 256.7 กับ 151.7 ส่วน internal standard ใช้ m/z 326.0 เป็น precursor ion และเลือก daughter ion ที่ m/z 156.7 โดยใช้ m/z 151.7 ในการคำนวณปริมาณ แม้ว่าเทคนิค LC-MS/MS จะเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) สูง แต่เนื่องจากสาร CAP เป็นสารต้องห้าม (zero tolerance) คือต้องตรวจไม่พบและตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ได้กำหนดหลักเกณฑ์เงื่อนไขของวิธีการที่ห้องปฏิบัติการใช้⁽⁶⁾ ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนด Minimum required performance limits (MRPLs) ของประเทศประชาคมยุโรป (European Communities, EC)⁽¹²⁾ ซึ่งกำหนด 0.3 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม

จากการพัฒนาและทดสอบวิธีพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของ อย. และ EC ได้คือ มีค่า LOD ในนมผงและน้ำผึ้ง เท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งต่ำกว่า MRPLs ของ อย. และ EC และในการวิเคราะห์ยังได้กำหนดการควบคุมคุณภาพเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องได้แก่ การเลือก identification points ตามที่ EC กำหนด คือ 1 precursor และ 2 daughters และกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities นั่นคือ ร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง intensity ของ daughter ที่เป็น secondary ion ต่อ primary ion ต้องน้อยกว่าเกณฑ์กำหนด ในกรณีการวิเคราะห์ CAP นี้ relative ion intensities ของ base peak มีค่ามากกว่า 50% ดังนั้น การรายงานว่าตรวจพบสาร จะต้องคำนวณ tolerance แตกต่างไม่เกิน $\pm 20\%$ ⁽¹³⁾ ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีความเหมาะสมในการใช้วิเคราะห์เพื่อตรวจยืนยันการตรวจพบ CAP หลังจากตรวจเบื้องต้นด้วยเทคนิค ELISA และสามารถนำผลวิเคราะห์ไปใช้ตามกฎหมายได้

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลในนมผงและน้ำผึ้ง โดยวิธี LC-MS/MS ที่ได้พัฒนาและปรับปรุงจากวิธีของ Sørensen LK และคณะดังกล่าวแล้ว พบว่ามีประสิทธิภาพดี ให้ค่าความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ นอกจากนี้ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก็ง่ายสะดวก รวดเร็ว สามารถวิเคราะห์พร้อมกันในคราวเดียวได้หลายตัวอย่าง จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ยืนยันสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลตกค้างในนมผงและน้ำผึ้ง เพื่อควบคุมคุณภาพและมาตรฐานได้

เอกสารอ้างอิง

1. อโนชา อุทัยพัฒน์. คลอแรมเฟนิคอลและไฮแอมเฟนิคอล. ใน : อโนชา อุทัยพัฒน์, สมใจ นครชัย, สุภาภรณ์ พงศกรผู้จัดทำ, เกษัชวิทยา เล่ม 2. กรุงเทพฯ; อักษรบัณฑิต 2531. หน้า 97.
2. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ปัญหาตกค้างในเนื้อสัตว์และแนวทางแก้ไข. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก; 2545. หน้า 2.
3. เอกสารคู่มือ Chloramphenicol-EIA, A microtiter plate based competitive enzyme immunoassay for screening and quantitative analysis of chloramphenicol in various matrices. Amhem (Netherlands) : Euro-Diagnostica B.V.; (5091CAP1p[19]05.05).
4. Pfenning AP, Roybal JE, Rupp HS, Turnipseed SB, Gonzales SA, Hurlbut JA. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection. J AOAC International 2000; 83(1) : 26-31.
5. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 268 (พ.ศ. 2546) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 120 ตอนพิเศษ 47 ง. (ลงวันที่ 23 เมษายน 2546)
6. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร (ลงวันที่ 24 เมษายน 2546).
7. Sørensen LK, Elbaek TH and Hansen H. Determination of chloramphenicol in bovine milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J AOAC International 2003; 86 (4) : 703-6.
8. EURACHEM Guide. The fitness for purpose of analytical method; A laboratory guide to method validation and related topics. (UK) : 1998; 61 : 5-24.
9. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, แนวทางการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ DMSc Method Validation : General Guide : p.18-20.
10. Fajgelj A, Ambrus A, editors. Principles and practices of method validation. Cornwell (UK) : MPG Books Ltd., 2000. p.185.
11. EURACHEM/CITAC Guide CG4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition, 2000.
12. Commission decision of 13 March 2003. amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. Official journal of the European Union. 2003/181/EC : L71/17-L71/18.
13. Commission decision of 12 August 2002. implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical method and the interpretation of results. Official journal of the European Union. 2002/657/EC : L221/16 - L221/17.

Method Development of Chloramphenicol Residue in Milk Powder and Honey Analysis by LC-MS/MS

Ladda Kaewklapanyacharoen Chalearmphorn Kuanha and Kanokporn Atisook

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Science, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT The method for determination of chloramphenicol (CAP) in milk powder and honey by LC-MS/MS was developed and validated. CAP was extracted directly from milk powder and honey by solid-phase extraction on a C-18 cartridge. The extract was cleaned up on neutral aluminium oxide cartridge and the isotope D-5 CAP was used as internal standard. CAP residues was analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry in electrospray ionization, negative ion mode. The results showed that the limit of detection (LOD) was 0.05 mg/kg and the limit of quantitation (LOQ) was 0.1 mg/kg. The linear working range for both milk powder and honey was 0.1 to 5.0 mg/kg with the correlation coefficient 0.9998. Accuracy of the method was shown by mean %Recovery of spiking standard to sample matrix at 4 different levels within linear working range were 94.4 - 119.0% for milk powder and 86.2 - 112.0% for honey. Precision was shown by %Relative standard deviation (%RSD) were 2.7 - 4.4 for milk powder and 2.0 - 5.8 for honey. Validation data proved that the developed method could be used for determination CAP in milk powder and honey for food quality control.

Key word : chloramphenicol, milk powder, honey, LC-MS/MS