

# การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สาร ตกค้างกลุ่มฮอร์โมนในเนื้อสัตว์โดย LC-MS/MS

เฉลิมพร ครรหา ทองสุข ปายะนันท์ และลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

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

**บทคัดย่อ** ฮอร์โมนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตการเปลี่ยนแปลงทางเพศ ลักษณะทางกายภาพของร่างกาย กระตุ้นหรือยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันตลอดจนควบคุมกระบวนการสร้างและสลาย metabolism ของร่างกาย ฮอร์โมนมีทั้งชนิดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและชนิดสังเคราะห์ มีการนำสารกลุ่มฮอร์โมนมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารอย่างไม่ต้อง เพื่อวัตถุประสงค์ในการเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มกล้ามเนื้อทำให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์ส่งผลกระทบต่อร่างกายคน ซึ่งสารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งมดลูก กลุ่มสหภาพยุโรป (EU) ประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้ เนื่องจากแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็ง ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนจำนวน 4 สาร ได้แก่ Diethylstilbesterol (DES), zeranol, 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol ที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งสารนี้ถูกสกัดจากตัวอย่างด้วย methanol แล้วนำไปกำจัดไขมันโดยใช้เทคนิค liquid-liquid extraction ด้วย hexane และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค solid phase extraction ด้วย Oasis HLB วิธีดังกล่าวมีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบของทุกสารเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของ DES และ zeranol เท่ากับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเท่ากับ 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของ DES และ zeranol อยู่ในช่วง 2.0-10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol อยู่ในช่วง 6.0-15.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ของทั้งสองช่วงมากกว่า 0.96 ค่าความแม่นยำแสดงด้วยค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วง 73-105% และค่าความเที่ยงแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน อยู่ในช่วง 5.4-26.3% จากการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีพบว่ามีเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทดสอบ ตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (2550) เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง และได้ทำการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่มฮอร์โมนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในเนื้อไก่และเนื้อวัว รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง ระหว่างตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558 ไม่พบสารกลุ่มฮอร์โมนในทุกตัวอย่าง

## บทนำ

สารกลุ่มฮอร์โมนทั้งชนิดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและชนิดสังเคราะห์เป็นสารที่นำมาใช้เพื่อการรักษาและบำบัดโรค เช่น เป็นยาคุมกำเนิดในสตรี ใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติของหัวใจและหลอดเลือดที่เกี่ยวกับหัวใจ เช่น โรคลิ้นหัวใจรั่วหรือลิ้นหัวใจตีบ โรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย<sup>(1)</sup> จากการศึกษาพบว่าสารเคมีกลุ่มนี้สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารได้ โดยมีทั้งการฉีดหรือผสมในอาหารให้สัตว์เลี้ยงเพื่อบริโภค เช่น วัว ควาย ไก่ เป็นต้น เพื่อลดปริมาณไขมันเป็นการเพิ่มกล้ามเนื้อให้กับสัตว์<sup>(2,3)</sup> ซึ่งเป็นการนำมาใช้อย่างผิดวัตถุประสงค์ จากหลักฐานการประเมินความเสี่ยงของการได้รับสารกลุ่มฮอร์โมนทั้งที่มาจากธรรมชาติและฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ แสดงให้เห็นว่าสามารถส่งผลกระทบต่อร่างกายคนได้ กล่าวคือมีแนวโน้มเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งเต้านม (breast cancer) มะเร็งมดลูก (uterine cancer) และยังคงเป็นสาเหตุของโรคที่เกี่ยวข้องกับต่อมไร้ท่อ (endocrine disrupting chemicals)<sup>(4,5)</sup>

สหภาพยุโรป (European Union; EU) ประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้ในการเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารและห้ามนำเข้าผลิตภัณฑ์ที่มีสารตกค้างกลุ่มฮอร์โมนปนเปื้อน โดยมีการตรวจสอบทั้งสารตั้งต้น (parent drugs) และสารกลุ่มอนุพันธ์ (metabolites) ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ก่อนนำเข้าไปจำหน่าย<sup>(6)</sup> สำหรับประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (2550) เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง มีการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยกำหนดมาตรฐานของฮอร์โมนที่เป็นสารตั้งต้นและสารกลุ่มอนุพันธ์มีปริมาณตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit, MRL) ได้ไม่เกินปริมาณที่กำหนดไว้จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ zeranol และ trenbolone acetate ในรูปของ  $\beta$ -trenbolone และ  $\alpha$ -trenbolone ในเนื้อสัตว์และตับที่ 2 และ 10 ไมโครกรัมของสารต่อ 1 กิโลกรัมของเนื้อเยื่อ อวัยวะหรือผลิตภัณฑ์ของสัตว์<sup>(7)</sup> และประกาศกรมปศุสัตว์ พ.ศ. 2549 เรื่องกำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์กำหนดไว้จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ DES และ estradiol โดยต้องตรวจไม่พบในสัตว์เพื่อบริโภคทุกชนิด<sup>(8)</sup> สำหรับประเทศแคนาดาและเกาหลีใต้ กำหนดปริมาณตกค้างสูงสุดของสาร zeranol ในเนื้อสัตว์และตับที่ 2 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ<sup>(9)</sup>

จากข้อกำหนดดังกล่าว วิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ต้องมีความน่าเชื่อถือและมีความถูกต้อง แม่นยำ มีความจำเพาะ มีความไวสูงในการตรวจวัดชนิดและปริมาณ เพราะเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในระดับต่ำจากงานวิจัยที่ผ่านมามีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น thin-layer chromatography (TLC) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ง่าย ราคาถูก แต่มีความไวต่ำ (low sensitivity) และความแม่นยำน้อย (poor accuracy) ขณะที่วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างในระดับต่ำได้แก่วิธี ELISA เป็น semi quantitative analysis ซึ่งหากตรวจพบต้องมีวิธีการตรวจยืนยันชนิดและปริมาณ (confirmatory method) เพิ่มเติม นอกจากนี้ชุดตรวจ ELISA สำหรับสารกลุ่มฮอร์โมน 1 ชุดตรวจได้ 1 ชนิดสารเท่านั้น ดังนั้นถ้าต้องการตรวจสอบสารมากกว่า 1 ชนิด ต้องใช้เวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย สำหรับเทคนิค LC-MS/MS โดยมี detector เป็นชนิด ion trap, time-of-flight หรือ triple quadrupole เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในระดับต่ำได้ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเลือกใช้ interface ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ให้เหมาะสมกับสภาพตัวของสาร (polar compounds) หรือแม้แต่วิธี GC-MS/MS ซึ่งสามารถตรวจวัดสารในระดับต่ำได้ แต่วิธีนี้ต้องผ่านขั้นตอนการ derivatization ซึ่งทำให้เสียเวลาในการเตรียมตัวอย่าง<sup>(10,11,12)</sup>

การศึกษานี้จึงได้พัฒนาวิธีโดยมีความมุ่งหมายให้ได้วิธีวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนในเนื้อสัตว์ ที่สามารถเตรียมตัวอย่างได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย สามารถวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนได้ 4 ชนิด พร้อมกันได้แก่ DES, zeranol, 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ โดยวิธีดังกล่าวปรับเปลี่ยนขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจากวิธีของ Yoshioka และคณะ<sup>(13)</sup> ในขั้นตอนการสกัดและการทำให้สารบริสุทธิ์และได้ทำการทดสอบ

ความถูกต้องของวิธี (method validation) โดยใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน (representative matrix) ตามแนวทาง EURACHEM Guide 2012<sup>(14)</sup> เพื่อยืนยันว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้อง เหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย นอกจากนี้เพื่อให้มีข้อมูลพื้นฐานของปริมาณฮอร์โมนตกค้างในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศ จึงได้สำรวจปริมาณฮอร์โมนที่ตรวจได้โดยวิธีที่พัฒนาและทดสอบความถูกต้องแล้ว ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

## วัสดุและวิธีการ

### สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน : diethylstilbesterol (DES), zeranol, 17 alpha-estradiol (17  $\alpha$ -estradiol), 17 beta-estradiol (17  $\beta$ -estradiol) ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ >98% และ internal standard diethylstilbesterol-D<sub>8</sub> (DES-D<sub>8</sub>) ผลิตภัณฑ์ของ Cambridge Isotope Laboratories, Inc., ความบริสุทธิ์ >98%

สารเคมี : methanol (MeOH), acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), hexane เป็น HPLC grade, formic acid, ammonium acetate (NH<sub>4</sub>OAc) เป็น AR grade

### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน stock solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วย MeOH และเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 10, 1 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย MeOH

### เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.001 กรัม และ 0.01 มิลลิกรัม, refrigerated centrifuge, vortex mixer, turbo nitrogen evaporator temperature controlled, เครื่องบดเนื้อ, micro pipette ขนาด 2-20, 10-200, 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.45  $\mu$ m PVDF, solid-phase-extraction (SPE) ชนิด Oasis HLB, ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และมี packing material บรรจุอยู่ 200 มิลลิกรัม, solid-phase-extraction (SPE) ชนิด C18, ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และมี packing material บรรจุอยู่ 500 มิลลิกรัม

เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย binary pump, auto sampler, micro vacuum degasser, thermostated column compartment: Agilent 1100 series, detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer: API 4000, column: zorbax SB C-18, atlantis-d C18, mobile phase เป็นสารละลายผสมของ H<sub>2</sub>O: MeOH (3:1; v/v) และ CH<sub>3</sub>CN, ใช้โปรแกรม gradient ในการแยกสาร flow rate 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 15 นาที โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ดังนี้

- ion spray voltage: 5200 volts
- temperature (TEM): 450 องศาเซลเซียส
- collision gas (CAD): nitrogen: 5 psig
- curtain gas (CUR): 13 psig
- ion spray nebulizer gas (GAS-1): 52 psig
- TIS heater gas (GAS-2): 58 psig
- entrance potential (EP): 10 volts

โดยสารจะถูกทำให้เป็นไอออนลบด้วย electro spray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกระดมด้วย multiple reaction monitoring (MRM) โดยศึกษา mass ที่  $m/z$  ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มฮอร์โมน 5 ชนิด โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS

| component              | MW    | precursor ion<br>( $m/z$ ) | product ion<br>( $m/z$ ) | Dwell time<br>(ms) | DP<br>(volts) | CE<br>(volts) | CXP<br>(volts) |
|------------------------|-------|----------------------------|--------------------------|--------------------|---------------|---------------|----------------|
| DES                    | 268.3 | 267.3                      | 92.9±0.5                 | 150.0 secondary    | -100.0        | -48.0         | -29.0          |
|                        |       |                            | 236.8±0.5                | 150.0 primary      | -100.0        | -40.0         | -31.0          |
| zeranol                | 322.2 | 321.2                      | 277.0±0.5                | 150.0 secondary    | -95.0         | -30.0         | -5.0           |
|                        |       |                            | 303.0±0.5                | 150.0 primary      | -95.0         | -30.0         | -4.0           |
| 17 $\alpha$ -estradiol | 272.2 | 271.2                      | 144.9±0.5                | 150.0 secondary    | -123.0        | -54.0         | -6.0           |
|                        |       |                            | 182.9±0.5                | 150.0 primary      | -123.0        | -55.0         | -10.0          |
| 17 $\beta$ -estradiol  | 272.2 | 271.2                      | 144.9±0.5                | 150.0 secondary    | -123.0        | -54.0         | -6.0           |
|                        |       |                            | 182.9±0.5                | 150.0 primary      | -123.0        | -55.0         | -10.0          |
| DES-D <sub>8</sub>     | 276.0 | 275.0                      | 245.0±0.5                | 150.0              | -110.7        | -41.0         | -14.6          |

## ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน (representative matrix)

ตัวอย่างที่ใช้ในการสำรวจปริมาณการตกค้างสารกลุ่มฮอร์โมนในเนื้อสัตว์ ตั้งแต่ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558 รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างเนื้อวัว 25 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น เนื้อวัวนำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 11 ตัวอย่าง นำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา เนื้อวัวภายในประเทศ 14 ตัวอย่าง โดยทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เก็บจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานครและจากด้านอาหารและยา ส่งวิเคราะห์ที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และตัวอย่างเนื้อไก่จำนวน 25 ตัวอย่าง เก็บจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร ครอบคลุมทั้งหมด 11 เขต ได้แก่ วังทองหลาง คลองเตย สวนหลวง ลาดพร้าว บางเขน สายไหม บางกะปิ จอมทอง คลองสาน บางขุนเทียน และบางบอน

## วิธีการ

### 1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

นำเนื้อสัตว์บดละเอียดมาเติมน้ำ จากนั้นสกัดสารกลุ่มฮอร์โมนตกค้างออกจากตัวอย่างด้วย MeOH นำไปกำจัดไขมันและสารรบกวนซึ่งอยู่ในตัวอย่างออกด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction โดยใช้ hexane ที่อิ่มตัวด้วย CH<sub>3</sub>CN แล้วนำสารที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค solid-phase extraction (SPE) จากนั้นตรวจหาปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS คำนวณปริมาณจาก calibration curve ที่ plot ระหว่าง concentration ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard กับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard

ทำการศึกษาดลองในการพัฒนาวิธี 2 ขั้นตอน คือ ได้ศึกษาดลองชนิดของ SPE ในการทำให้บริสุทธิ์ และชนิดของ column ในการตรวจวัดโดย HPLC มีรายละเอียดดังนี้

1. ทดลองชนิด SPE Oasis HLB เปรียบเทียบกับ C18 โดยซึ่งตัวอย่างเนื้อไก่ที่ตรวจไม่พบสารกลุ่มฮอร์โมนที่บดละเอียด (matrix blank) 2 กรัม ใส่หลอด screw cap centrifuge tube เติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เติม internal standard ที่ความเข้มข้น 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเติมน้ำ 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixer ครั้งละ 1 นาที ทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม MeOH 10 มิลลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดชั้น MeOH ใส่ในหลอด centrifuge tube ทำการสกัดซ้ำด้วย MeOH 5 มิลลิตร นำชั้น MeOH ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง เติม hexane ที่อิ่มตัวด้วย  $\text{CH}_3\text{CN}$  10 มิลลิตร ปั่นด้วย vortex mixer และนำไปปั่นตกตะกอนโดยใช้โปรแกรมที่ตั้งค่าไว้ครั้งแรก ดูดชั้น hexane ที่อิ่มตัวด้วย  $\text{CH}_3\text{CN}$  ทั้ง ดูดชั้น MeOH 7.5 มิลลิตร ใส่ใน test tube ระเหยจนเหลือประมาณ 500 ไมโครลิตร เติมน้ำ 5 มิลลิตร ปั่นด้วย vortex mixer นำสารสกัด load ผ่าน SPE cartridge ทั้งสองชนิดที่ activated ด้วย MeOH 5 มิลลิตร น้ำ 10 มิลลิตร จากนั้นล้าง SPE cartridge โดยใช้ 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  2 มิลลิตร และ elute ด้วย  $\text{CH}_3\text{CN}$  10 มิลลิตร ระเหยแห้งด้วยเครื่อง turbo nitrogen evaporator ละลายส่วนที่เหลืออยู่ด้วยสารละลายผสมของ 0.1% formic acid: MeOH (65:35, v/v) 1 มิลลิตร ได้สารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิตร กรองสารละลายตัวอย่างผ่าน micro-spin filters ชนิด PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  เก็บในขวดแก้วสีชา ขนาด 2 มิลลิตร นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเทคนิค LC-MS/MS

2. ทดลองชนิด LC column zorbax SB C-18 เปรียบเทียบกับ atlantis-d C18 โดยใช้ mobile phase สารละลายผสมของ  $\text{H}_2\text{O}$ : MeOH (3:1; v/v) และ  $\text{CH}_3\text{CN}$

## 2. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

### 2.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียม matrix-matched calibration curve โดยซึ่ง matrix blank จำนวน 6 หลอด แล้วเติมสารมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 และ 15.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกหลอด จากนั้นทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง (แกน x) อัตราส่วนความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และความเข้มข้นของ internal standard (concentration ratio) กับ (แกน y) อัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ peak area ของ internal standard (peak area ratio) คำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (pearson correlation coefficient, r) สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination,  $R^2$ )

### 2.2 วิเคราะห์ method blank และ matrix blank

method blank: สกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาโดยใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่างเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

matrix blank: สกัดเนื้อไก่และวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ฉีดสารสกัด method blank และ matrix blank เข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อตรวจสอบดูว่ามี mass หรือ peak รบกวนตรงสารมาตรฐานหรือไม่

### 2.3 การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นใกล้เคียงค่าต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ย, Standard Deviation (SD) แล้วนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{LOD} = 3 \text{ SD}$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ SD}$$

ยืนยันความแม่นยำและความเที่ยงของค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตามที่คำนวณได้จากสูตร 10 ซ้ำ แล้วคำนวณ % recovery และ % Relative Standard Deviation (RSD)

### 2.4 การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 และ 15.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยเกณฑ์การยอมรับของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สำหรับกราฟมาตรฐานที่จำนวนของระดับความเข้มข้น 6 ระดับ ต้องไม่น้อยกว่า 0.95<sup>(15)</sup>

### 2.5 การทดสอบ % recovery และความเที่ยง (recovery and precision)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 6.0, 10.0 และ 15.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank และเติม internal standard ที่ความเข้มข้น 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย % recovery และ % RSD ประเมินผลตามเกณฑ์กำหนดดังนี้ ค่า % recovery 60-120 ค่า % RSD ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ที่ 30%<sup>(14)</sup>

### 2.6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

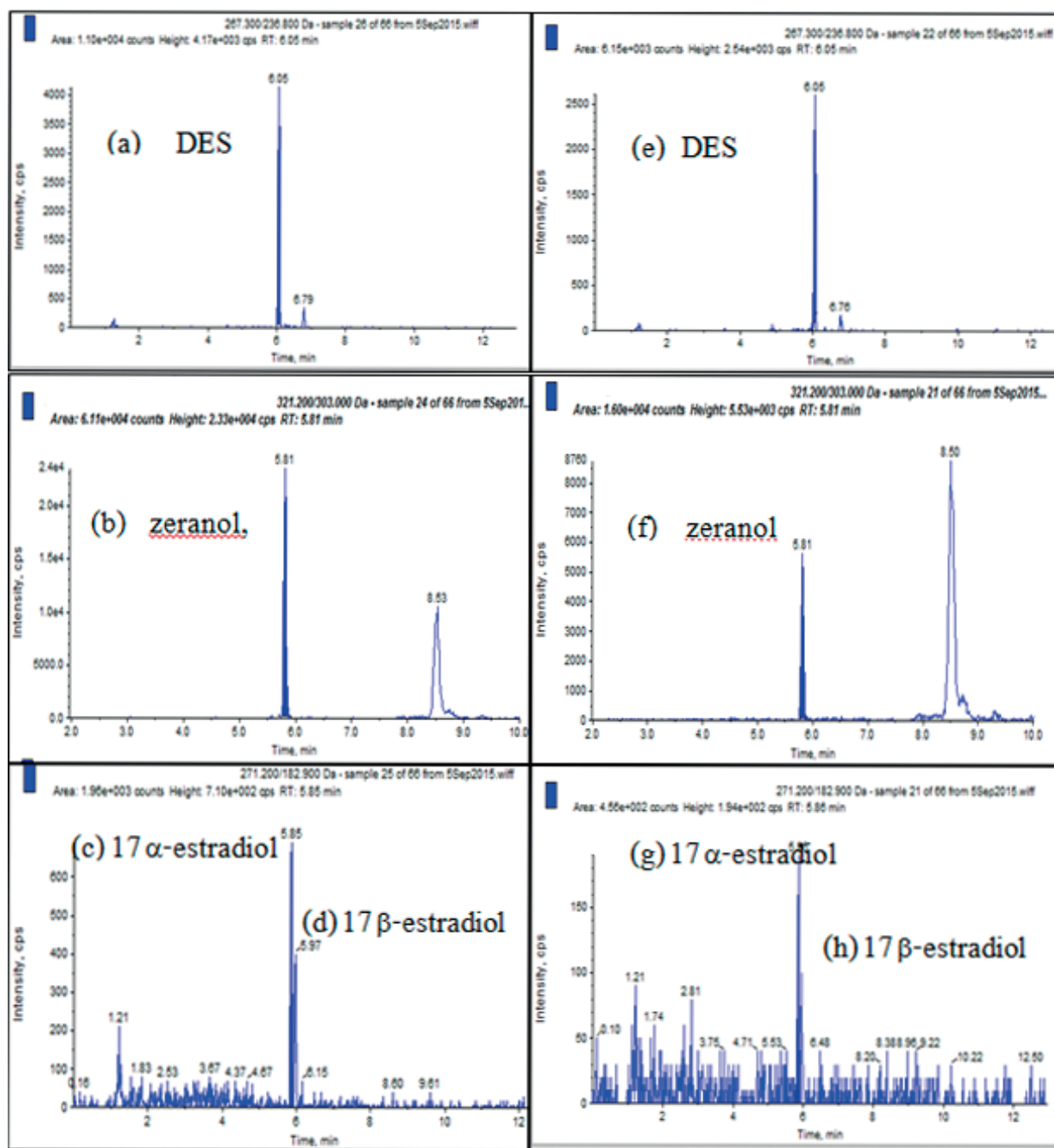
การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด<sup>(16)</sup> โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $k = 2$ ) ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ

ปริมาณสารที่พบหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) โดยคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก calibration curve โดยใช้สมการเส้นตรง

## ผล

### การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ผลการเปรียบเทียบขั้นตอนการ clean up โดยเปรียบเทียบโดยใช้ Oasis HLB กับ SPE-C18 โดยเปรียบเทียบ chromatogram ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด พบว่าการ clean up ของ SPE ทั้ง 2 ชนิด ให้ประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน ไม่พบ peak รบกวนที่ RT ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน แต่เมื่อพิจารณาค่า % recovery พบว่า SPE-C18 ให้ค่าต่ำกว่าการ clean up ด้วย Oasis HLB (ภาพที่ 1)

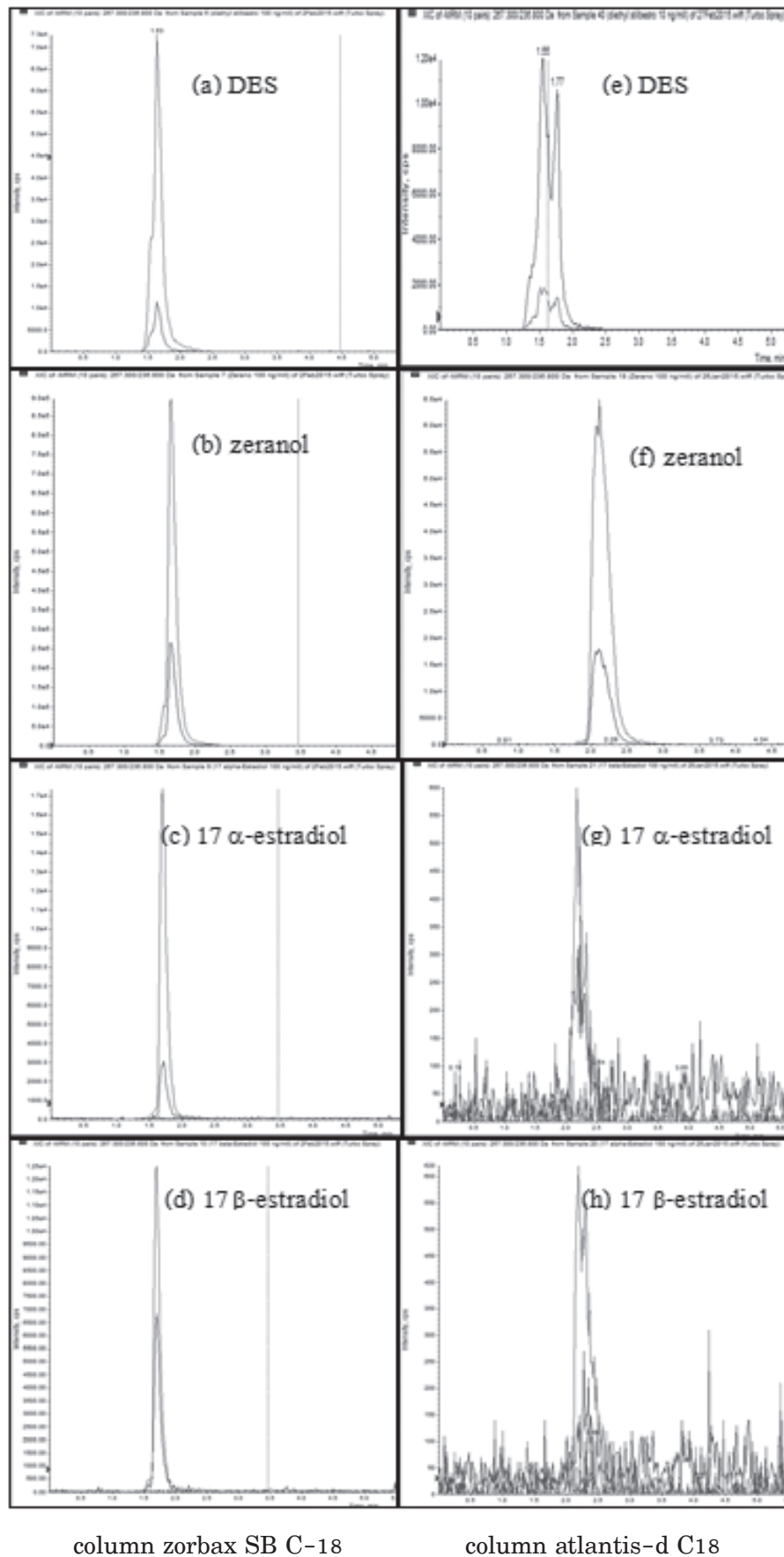


Oasis HLB

SPE - C18

ภาพที่ 1 chromatogram เปรียบเทียบ SPE cartridge ในการทำให้สารบริสุทธิ์ระหว่าง Oasis HLB กับ SPE-C18

และการเปรียบเทียบ LC column ระหว่าง zorbax SB C-18 และ atlantis-d C18 พบว่า column ชนิด zorbax SB C-18 สามารถให้ sensitivity, peak shape, peak symmetry ของสารกลุ่มฮอร์โมนในสารละลายตัวอย่างได้ดีกว่า column ชนิด atlantis-d C18 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 chromatogram เปรียบเทียบ column ระหว่าง zorbax SB C-18 และ atlantis-d C18 โดยใช้ mobile phase สารละลายผสมของ  $H_2O$ : MeOH (3:1; v/v) และ  $CH_3CN$

**ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)**

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ DES, zeranol, 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานดังกล่าวได้ในช่วงความเข้มข้น 2.0-15.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟที่เป็นเส้นตรงมีค่า r ในช่วง 0.9808-0.9879 และ  $R^2$  ในช่วง 0.9620-0.9760

เมื่อวิเคราะห์ method blank ของสารเคมีที่ใช้ทั้งหมด และ matrix blank ของตัวอย่างเนื้อไก่ ไม่พบ peak ครอบคลุมในช่วงของการตรวจวัดสารเป้าหมาย

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกชนิดสาร โดยให้สัญญาณพีคมีค่าสูงกว่า 3 เท่าของ signal to noise ส่วนค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ DES และ zeranol และเท่ากับ 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐานวิเคราะห์ 10 ขั้ว ได้ค่า % recovery เฉลี่ย ในช่วง 73-105%, % RSD ในช่วง 5.4-26.3 (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ผลการทดสอบค่า signal/noise ที่ระดับ LOD % recovery และความเที่ยงที่ระดับ LOQ ของ DES, zeranol, 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol ของเนื้อไก่

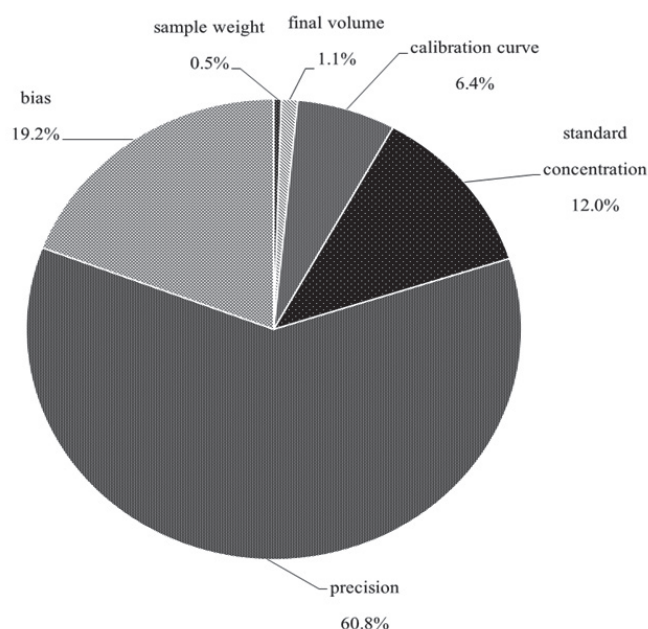
| Hormone                | signal/noise<br>(LOD level) | Spiked (LOQ level)<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | % Recovery | % RSD | HORRAT |
|------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|------------|-------|--------|
| DES                    | 20.54                       | 2.0                                               | 81.8       | 13.4  | 0.9    |
| Zeranol                | 35.20                       | 2.0                                               | 104.8      | 5.4   | 0.4    |
| 17 $\alpha$ -estradiol | 15.70                       | 6.0                                               | 77.3       | 23.5  | 1.5    |
| 17 $\beta$ -estradiol  | 16.20                       | 6.0                                               | 73.2       | 26.3  | 1.7    |

การทดสอบค่า % recovery และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 6.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ DES และ zeranol ที่ระดับความเข้มข้น 6.0, 10.0 และ 15.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol วิเคราะห์ระดับละ 10 ขั้ว พบว่า % recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 61-120% และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย % RSD อยู่ในช่วง 3.4-26.3 (ตารางที่ 3)

จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ โดยนำการวิเคราะห์สาร DES ในเนื้อไก่ พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง ค่า concentration ratio, Co ที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ bias และ precision ได้ค่า relative standard uncertainty,  $u(x)/x$  เมื่อนำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งมารวมกันจะได้ค่า combined relative standard uncertainty เท่ากับ  $\pm 0.8\%$  และนำมาขยายให้เป็น Expanded uncertainty, U ได้ค่าความไม่แน่นอน เท่ากับ  $\pm 1.6\%$  ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณสารจากมากไปหาน้อย ได้แก่ ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (method precision 60.8%), ความเบี่ยงเบน จากค่าจริง (bias, 19.2%), สารมาตรฐาน (12.0%), calibration curve (6.4%), final volume (1.1%), การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง (sample weight, 0.5%) (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ % recovery และความเที่ยงในการวิเคราะห์ DES, zeranol, 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol ของเนื้อไก่

| สารมาตรฐาน             | Spiked level<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | % Recovery (n=10)<br>Min - Max | Mean $\pm$ SD    | % RSD | HORRAT |
|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------|-------|--------|
| DES                    | 2.0                                  | 61.5 - 97.0                    | 81.8 $\pm$ 11.0  | 13.4  | 0.9    |
|                        | 6.0                                  | 92.3 - 101.3                   | 98.1 $\pm$ 3.4   | 3.4   | 0.2    |
|                        | 10.0                                 | 83.0 - 120.0                   | 94.3 $\pm$ 11.5  | 12.2  | 0.8    |
| zeranol                | 2.0                                  | 95.5 - 111.5                   | 104.8 $\pm$ 5.7  | 5.4   | 0.4    |
|                        | 6.0                                  | 66.5 - 101.4                   | 94.7 $\pm$ 10.1  | 10.7  | 0.7    |
|                        | 10.0                                 | 93.4 - 120.0                   | 11.3 $\pm$ 10.9  | 9.6   | 0.7    |
| 17 $\alpha$ -estradiol | 6.0                                  | 63.3 - 117.3                   | 77.3 $\pm$ 18.2  | 23.6  | 1.5    |
|                        | 10.0                                 | 87.3 - 119.0                   | 105.1 $\pm$ 10.5 | 10.0  | 0.7    |
|                        | 15.0                                 | 66.7 - 100.0                   | 85.1 $\pm$ 12.4  | 14.6  | 0.9    |
| 17 $\beta$ -estradiol  | 6.0                                  | 61.3 - 120.0                   | 73.2 $\pm$ 19.3  | 26.3  | 1.7    |
|                        | 10.0                                 | 77.3 - 120.0                   | 103.9 $\pm$ 15.6 | 15.0  | 1.0    |
|                        | 15.0                                 | 72.7 - 100.0                   | 83.1 $\pm$ 7.8   | 9.4   | 0.6    |



ภาพที่ 3 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนในเนื้อไก่

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีแล้วมาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในการสำรวจปริมาณการปนเปื้อนของสารกลุ่มฮอร์โมนตัวอย่างเนื้อสัตว์รวม 50 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเนื้อวัวนำเข้า 11 ตัวอย่าง เนื้อวัวภายในประเทศ 14 ตัวอย่าง และเนื้อไก่ 25 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบสารกลุ่มฮอร์โมนทั้ง 4 ชนิด ในทุกตัวอย่าง

## วิจารณ์

วิธีที่ศึกษานี้สามารถทดสอบสารกลุ่มฮอร์โมนได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ DES มีค่า molecular mass เท่ากับ  $268.3 \text{ g.mol}^{-1}$ , zeranol มีค่า molecular mass เท่ากับ  $322.2 \text{ g.mol}^{-1}$ , 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol มีค่า molecular mass เท่ากับ  $272.2 \text{ g.mol}^{-1}$  โดยใช้เครื่อง liquid chromatograph (LC) ซึ่งมี tandem mass spectrometer (MS/MS) เป็นตัวตรวจวัด และมีการนำสาร DES-D<sub>8</sub> เป็น internal standard ในการตรวจวิเคราะห์ การใช้ internal standard มีข้อดีคือเพื่อเป็นการควบคุมและลดความผิดพลาดในกระบวนการทดสอบ เพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบที่ได้ เนื่องจากการวิเคราะห์แบบ internal standard ต้องเติมสารที่เลือกใช้เป็น internal standard ลงไปทั้งในตัวอย่าง และ standard ด้วยความเข้มข้นที่เท่ากันโดย calibration curve ที่ใช้เปรียบเทียบสัดส่วนโดย plot ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ดังนั้น internal standard จึงเป็นตัวเปรียบเทียบช่วยควบคุมความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากวิธีวิเคราะห์หรือผู้วิเคราะห์ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะให้ precision และ accuracy ที่ดี<sup>(17)</sup> แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับทางเลือกใช้ internal standard โดยสารที่จะใช้เป็น internal standard ต้องมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับสารที่จะวิเคราะห์ เนื่องจากสารที่ใช้เป็น internal standard ส่วนมากเป็นสาร isotope ซึ่งหาได้ยากและบางชนิดมีขั้นตอนในการสังเคราะห์ ทำให้ไม่สามารถหา internal standard ได้ครบทุกชนิดสาร จึงใช้ DES-D<sub>8</sub> เป็น internal standard เพียงชนิดเดียวในการคำนวณปริมาณที่ตรวจพบกับสารกลุ่มฮอร์โมนทุกสาร ซึ่งทำให้ค่าความไม่แน่นอนของ method precision มีค่าสูงคือ 60.8%

จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัดไอออนของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio,  $m/z$ ) ที่แตกต่างกัน ในการวิเคราะห์นี้เลือก interface ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ชนิด electro spray ionization (ESI) ไอออนที่ได้ถูกวิเคราะห์ด้วย selected reaction monitoring (SRM) หรือ multiple reaction monitoring (MRM) mode ใช้ตรวจสอบมวลของไอออนที่แตกออกมา (fragment ion, transition ion) จากไอออนตั้งต้น (parent ion) ตัวใดตัวหนึ่ง SRM หรือ MRM สามารถแยกความแตกต่างของสารที่มีมวลเท่ากันได้ เนื่องจาก fragment ion ที่แตกออกมาเป็นชิ้นส่วนที่จำเพาะของไอออนแต่ละชนิด mode นี้ปรากฏฟีดเพียงแค่ฟีดเดียวที่เกิดจากมวลของ fragment ion ที่เลือก จึงมีประโยชน์มากในการวิเคราะห์ปริมาณและใช้ detector ชนิด tandem mass spectrometer ตรวจวัดโดยเลือก mass ถึง 2 ครั้ง ครั้งแรกเลือก precursor ion หรือ parent ion จากนั้นเกิดการ fragmentation ได้ product ion หรือ daughter ion เลือก product ion 2 ion ที่มีค่า response สูงและไม่มีสารอื่นรบกวน การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนทั้ง 4 ชนิด นี้ถูก ionized ในรูปของไอออนลบ  $[M-H]^-$  (negative ions)<sup>(3,4,18)</sup> โดยสาร DES เลือก  $m/z$  267.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่  $m/z$  236.8 กับ 92.9 zeranol เลือก  $m/z$  321.0 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่  $m/z$  303.0 กับ 277.0 สำหรับ 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol เลือก  $m/z$  271.2 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่  $m/z$  182.9 กับ 144.9

ในการวิเคราะห์ยังได้กำหนดการควบคุมคุณภาพเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง ได้แก่ การเลือก identification point ซึ่งเป็นระบบการคิดคะแนนเพื่อการยืนยันชนิดสารในการแปลผลข้อมูลโดยใช้จำนวน parent ion เริ่มต้น และ daughter ion และกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities ตามที่ European Communities, EC กำหนด<sup>(19)</sup> นอกจากนี้ค่า precision ที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% RSD) อยู่ในช่วง 3.4-26.3 โดยมีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของที่ Codex กำหนดไว้<sup>(20)</sup> นอกจากนี้ยังได้มีการวางแผนการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยกำหนดไว้ไม่เกิน 10 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบ method blank, matrix

blank, duplicate analysis และ spiked sample<sup>(14)</sup> สำหรับตัวอย่างเนื้อวัวคณะผู้วิจัยได้มีการควบคุมคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์ทุก batch โดยผล % recovery อยู่ในช่วง 93-120% อย่างไรก็ตามในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่ได้ใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference materials; CRM) ในการประกันคุณภาพของผลการทดสอบและตรวจสอบถูกต้องของวิธีทดสอบแต่ใช้การเติม (spiking) สารมาตรฐานลงใน matrix blank แทน

คณะผู้วิจัยเลือกสารกลุ่มฮอร์โมนที่ตรวจวิเคราะห์ประกอบด้วย zeranol, DES เป็นฮอร์โมนชนิดสังเคราะห์<sup>(21)</sup> โดย zeranol เป็นสารที่มีค่ากำหนด MRL ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข DES เป็นสารห้ามใช้ทั้งในกลุ่มสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา และประกาศกรมปศุสัตว์ เพราะเป็นสารที่อาจทำให้เกิดมะเร็ง สำหรับ 17  $\alpha$ -estradiol และ 17  $\beta$ -estradiol เป็นฮอร์โมนธรรมชาติที่มีในเพศหญิงจัดเป็นฮอร์โมน estrogen ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกลไกการทำงานของสตรีเพศ<sup>(22)</sup> ขั้นตอนต่อไปคณะผู้วิจัยจะเพิ่มชนิดสารให้ครอบคลุมตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งได้แก่ trenbolone acetate สำหรับฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ที่ผู้วิจัยไม่ได้ตรวจวิเคราะห์คือ progesterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ร่างกายต้องสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตตามปกติ พบว่าไม่เกิดอันตรายต่อร่างกายเพราะปริมาณที่รับประทานเข้าไปจากเนื้อสัตว์ถือว่าน้อยมาก คือน้อยกว่าร้อยละ 1 ของฮอร์โมนที่ร่างกายผลิตตามปกติ และฮอร์โมนที่รับประทานเข้าไปนั้นร่างกายดูดซึมได้เพียงร้อยละ 10 นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารบางชนิดมีฮอร์โมนเอสโตรเจนอยู่ในปริมาณมากกว่าเนื้อวัว<sup>(2)</sup>

ผลจากการตรวจวิเคราะห์เนื้อวัว เนื้อไก่ ที่ผลิตในประเทศและเนื้อวัวที่นำเข้าจากออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และสหรัฐอเมริกา รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่างนั้น พบว่าไม่มีการตกค้างของสารกลุ่มฮอร์โมนทั้งสี่ชนิด แสดงได้ว่าผู้ผลิตทั้งจำหน่ายภายในประเทศและส่งออกมีความตื่นตัวในการที่จะยกระดับมาตรฐานสินค้าให้เป็นไปตามกฎระเบียบและข้อกำหนดต่างๆ ที่สอดคล้องกับข้อกำหนดขององค์การการค้าโลกและองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health หรือ Office International des Epizooties, OIE) ซึ่งถือว่าเป็นมาตรฐานการผลิตสินค้าทางการเกษตร (Good Agriculture Practices: GAP) ด้านการผลิตปศุสัตว์ที่สำคัญ ซึ่งครอบคลุมมาตรฐานฟาร์มเลี้ยงสัตว์ การควบคุมการใช้ยาในมาตรฐานฟาร์มปศุสัตว์ ตลอดจนมีการนำระบบคุณภาพ Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP), ISO 9000 มาใช้<sup>(23)</sup> ดังนั้นจากการสำรวจเบื้องต้นสะท้อนให้เห็นว่าจากข้อกำหนดและกฎเกณฑ์ต่างๆ เหล่านี้ สามารถสร้างความมั่นใจในคุณภาพของเนื้อสัตว์ว่ามีความปลอดภัยที่จะนำมาบริโภคได้

## สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสารกลุ่มฮอร์โมน ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ DES, zeranol, 17  $\alpha$ -estradiol, 17  $\beta$ -estradiol สกัดด้วย MeOH ปริมาตรทั้งสิ้น 15 มิลลิลิตร นำสารที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Oasis HLB cartridge จากนั้นนำสารละลายที่ได้ฉีดเข้าสู่ระบบเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งใช้ column ชนิด zorbax SB C-18 และใช้สารละลายผสมของ H<sub>2</sub>O: MeOH (3:1; v/v) กับ CH<sub>3</sub>CN เป็น mobile phase ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 2.0 -10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 6.0 -15.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า coefficient of determination ของทั้งสองช่วงมากกว่า 0.96 ค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วง 73-105% ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 5.4-26.3 มีค่า LOD ของทุกสารเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยค่า LOQ ของ DES กับ zeranol เท่ากับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่า LOQ ของ 17  $\alpha$ -estradiol กับ 17  $\beta$ -estradiol เท่ากับ 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีคุณลักษณะเฉพาะแสดงสมรรถนะที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับและเหมาะสม

มีความถูกต้อง แม่นยำ มีความไวและความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ เหมาะกับการใช้งาน (fitness for intended use) และให้ผลทุกพารามิเตอร์ผ่านเกณฑ์ยอมรับของสากล ทำให้ผลการทดสอบถูกต้อง เชื่อถือได้ จากการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบ (method validation) โดยใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทน สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย เพื่อความยุติธรรมทั้งแก่ผู้ประกอบการและคุ้มครองผู้บริโภคต่อไปได้

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้างทุกท่านที่ช่วยเตรียมและสกัดตัวอย่างให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Matic I, Grujic S, Jaukovic Z, Lausevic M. Trace analysis of selected hormones and sterols in river sediments by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2014; 1364: 117-27.
2. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. บทที่ 12 : การปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. [ออนไลน์]. [สืบค้น 18 ก.พ. 2561]; [6 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: [http://elearning.nsr.ac.th/web\\_elearning/meattech/lesson/less12\\_7.html](http://elearning.nsr.ac.th/web_elearning/meattech/lesson/less12_7.html).
3. Shao B, Zhao R, Meng J, Xue Y, Wu G, Hu J, et al. Simultaneous determination of residue hormone chemical in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2005; 548: 41-50.
4. Blasco C, Van Poucke C, Van Peteghem C. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007; 1154: 230-9.
5. Schúz J, Espina C, Villan P, Herrero R, Leon ME, Minozzi S, et al. European code against cancer 4<sup>th</sup> edition: 12 ways to reduce your cancer risk. *Cancer Epidemiol* 2015; 39(Suppl 1): S1-10.
6. Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996. Concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directs 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. *Official Journal of the European Communities*, No L 125.
7. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2552 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (พ.ศ. 2550) เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 108ง (ลงวันที่ 4 กันยายน 2550).
8. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์. (ลงวันที่ 12 กรกฎาคม 2549). [ออนไลน์]. [สืบค้น 18 ก.พ. 2561]; [10 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: <http://readgur.com/download/2099998>.
9. Korea's veterinary drug MRL situation. [Online]. 2011; [cited 2018 Feb 18]; [29 screens]. Available from: URL: [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Korea's%20Veterinary%20Drug%20MRL%20Situation\\_Seoul\\_Korea%20-%20Republic%20of\\_11-16-2011.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Korea's%20Veterinary%20Drug%20MRL%20Situation_Seoul_Korea%20-%20Republic%20of_11-16-2011.pdf).
10. Anfossi L, Tozzi C, Giovannoli C, Baggiani C, Giraudi G. Development of a non-competitive immunoassay for cortisol and its application to the analysis of saliva. *Anal Chim Acta* 2002; 468: 315-21.

11. Regal P, Vazquez BI, Franco CM, Cepeda A, Fente C. Quantitative LC-MS/MS method for the sensitive and simultaneous determination of natural hormones in bovine serum. *J Chromatogr B* 2009; 877: 2457-64.
12. Yang Y, Shao B, Zhang J, Wu Y, Duan H. Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2009; 877: 489-96.
13. Yoshioka N, Akiyama Y, Takeda N. Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -trenbolone in bovine muscle and liver by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2000; 739: 363-7.
14. The fitness for purpose of analytical method: A laboratory guide to method validation and related topics. 2<sup>nd</sup> ed. United Kingdom: Eurachem Guide; 2014. p. 5-24.
15. สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผลและวิธีคัดกรอง. ปทุมธานี : สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์; 2555.
16. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3<sup>rd</sup> ed. United Kingdom: Eurachem; 2012.
17. Niessen WM, Manini P, Andreoli R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2006; 25: 881-99.
18. Balisz G, Hewitt A. Determination of veterinary drug residue by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2003; 492: 105-31.
19. Commission Decision of 12 August 2002. Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, No L221/8.
20. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
21. Noppe H, Le Bizet B, Verheyden K, De Brabander HF. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. *Anal Chim Acta* 2008; 611: 1-16.
22. เอสโตรเจนฮอร์โมน (estrogen hormone). [ออนไลน์]. [สืบค้น 18 ก.พ. 2561]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: [http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/hormone/chapter5/estrogen\\_hormone.htm](http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/hormone/chapter5/estrogen_hormone.htm)
23. มาตรฐานบางประการสำหรับการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 18 ก.พ. 2561]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: <http://www.animals-farm.com/มาตรฐานบางประการสำหรับ>.

# Method Development and Validation of Hormone Residues Determination in Meat by LC-MS/MS

Chalearmphorn Kuanha Thongsuk Payanan and Ladda Kaewklapanacharoen

*Bureau of Quality and Safety of Food Department of Medical Sciences Tiwanond Road. Nonthaburi 11000 Thailand.*

**Abstract** Hormones, both natural and synthetic, play an important role in controlling growth, sex, physical characteristics and stimulating or inhibiting an immune system as well as controlling formation and decomposition of metabolisms of the body. Incorrect usage of hormones for purposes of growth promoting agents and increasing muscles in food-producing animals may result in having hormone residues in edible tissues. The residues can possibly induce breast cancer and uterine cancer, therefore, those compounds are prohibited to use in the European Union (EU) to protect consumers from the exposure to carcinogenic residues in animal products. In this study, a method for determination of 4 hormone substances, namely, Diethylstilbesterol (DES), zeranol, 17  $\alpha$ -estradiol and 17  $\beta$ -estradiol by LC-MS/MS techniques was developed and validated. The compounds were extracted from meat samples with methanol and fat was further removed by liquid-liquid extraction technique with hexane and then cleaned up by solid phase extraction with Oasis HLB. As a result of method validation, limit of detection (LOD) was 0.1  $\mu\text{g/kg}$  for all substances. In addition, our study demonstrated that limits of quantitation (LOQ) for DES and zeranol were 2.0  $\mu\text{g/kg}$ , while those for 17  $\alpha$ -estradiol, 17  $\beta$ -estradiol were 6.0  $\mu\text{g/kg}$ . A linearity of working range of DES and zeranol was between 2.0-10.0  $\mu\text{g/kg}$ , while that of 17  $\alpha$ -estradiol and 17  $\beta$ -estradiol was between 6.0-15.0  $\mu\text{g/kg}$  with coefficient of determination,  $R^2$ , at more than 0.96. An accuracy of the method expressed as mean of % recovery was in a range of 73-105% and its precision as shown by % Relative Standard Deviation (RSD) was 5.4-26.3%. The study concluded that characteristics of this method were suitable for application testing laboratory as required by the notification of The Ministry of Public Health Regulation No. 303 (B.E. 2550) on Establishment of Maximum Residue Levels of Veterinary Medical Products in Foodstuffs of Animal Origin. Moreover, a survey of hormone residues, conducted from October 2014 to September 2015, in 50 samples of chicken and beef using the developed method indicated that no four hormone residues were detected in any samples.

**Keywords:** Hormone residues, meat, LC-MS/MS