

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์ และตับ โดยเทคนิค HPLC

เฉลิมพร ควรรหา และจิตตภา สันต์ตรบ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Sulfonamides (SAs) เป็นกลุ่มยาต้านจุลชีพที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ ทั้งยังมีความจำเป็นในการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจเพื่อเป็นอาหาร การใช้ยาไม่ถูกต้องและไม่เคร่งครัดในการหยุดยาตามระยะเวลาที่กำหนด เป็นสาเหตุของการตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ การตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์อาหารอาจทำให้ผู้บริโภคเกิดความวิตกกังวลเพราะเป็นภัยต่อระบบภูมิคุ้มกันของคน ทำให้เกิดอาการแพ้ยาหรือเชื้อจุลินทรีย์เกิดการพัฒนานำไปสู่การดื้อยาได้ จึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม SAs 9 ชนิด ได้แก่ sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfapyridine (SPY), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SMZ), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfisoxazole (SFI), sulfamethoxazole (SMX) และ sulfaquinoxaline (SQ) ตกค้างในเนื้อสัตว์และตับสัตว์ โดยใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนในการศึกษา ซึ่ง SAs จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างด้วย 80% Ethanol แล้วนำมาผ่าน affinity column ที่มีความจำเพาะต่อ SAs จากนั้นตรวจวัดชนิดและปริมาณโดยเครื่อง HPLC-UV Detector จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) ตามหลักเกณฑ์สากลเพื่อยืนยันวิธีว่าเหมาะสมตรงตามวัตถุประสงค์ ผลทดสอบความถูกต้องของวิธีมีค่า limit of detection เท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ limit of quantitation เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง เท่ากับ 50 - 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า Pearson correlation of coefficient (r) มากกว่า 0.990 ทำการทดสอบความเที่ยงความแม่นยำที่ความเข้มข้น 2 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่ามีความแม่นยำ อยู่ในช่วง 61 - 106% และค่าความเที่ยง อยู่ในช่วง 2.5 - 15.0% จากการประเมินความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ โดยการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการกับหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบความชำนาญที่เชื่อถือได้ทั้งในและต่างประเทศ ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($|z| < 2$) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาและทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยา SAs ทั้ง 9 ชนิด ตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สำหรับการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายได้ เมื่อนำวิธีที่พัฒนามาสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในตลาดในกรุงเทพมหานครและภาคเอกชน ในช่วงปี พ.ศ. 2554 - 2558 รวม 386 ตัวอย่าง พบ 25 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.5 ชนิด สารที่พบ คือ sulfisoxazole sulfadiazine sulfathiazole sulfamethoxazole sulfadimidine และ sulfaquinoxaline ปริมาณที่ตรวจพบมีค่าระหว่างน้อยกว่า 50 ถึง 1,027 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

บทนำ

ปัญหาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เป็นปัญหาที่หน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตต้องให้ความสำคัญในการแก้ไข จากปัญหาดังกล่าวก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค เพราะยาต้านจุลชีพบางชนิดอาจก่อให้เกิดมะเร็ง เช่น ซัลฟาเมทาซีน หลายประเทศทั่วโลกได้มีการประกาศห้ามใช้ยาซัลฟาเมทาซีนในโคนมที่กำลังอยู่ในระยะให้นม เนื่องจากศูนย์วิจัยพิษวิทยาแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา (The U.S. Food and Drug Administration's Nation Center For Toxicological Research หรือ NCTR) พบว่าซัลฟาเมทาซีนสามารถก่อให้เกิดมะเร็งของต่อมไทรอยด์ในหนูทดลอง ถ้าได้รับการบริโภคในปริมาณสูงในระยะเวลา⁽¹⁾ ในประเทศไทยมีการใช้ยาในกลุ่ม Sulfonamides (SAs) เพื่อป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ เนื่องจากการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ทำให้สัตว์มีความเครียดสูง การเจริญเติบโตช้า อ่อนแอ และความต้านทานโรคต่ำเจ็บป่วยได้ง่าย มีโรคชุกชุม เกษตรกรจึงใช้ยาเพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรค ยาในกลุ่ม Sulfonamides (SAs) เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มแรกๆ ที่นำมาใช้ ออกฤทธิ์กว้างต่อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตและการขยายตัวของแบคทีเรีย (Bacteriostatic) โดยจะไปขัดขวางการสร้างเมแทบอลิซึมที่สำคัญของแบคทีเรีย ทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียถูกยับยั้งและหยุดการเจริญเติบโต^(2, 3)

จากการศึกษาผลของยาในกลุ่ม Sulfonamides (SAs) พบว่า มีอันตรายต่อระบบการสร้างเลือด ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และฮีโมโกลบินลดลง อาจเกิดโรคโลหิตจาง และยังทำให้เกิดอาการที่บริเวณผิวหนัง อาทิ เกิดผื่นแดง ลมพิษ แพ้แสง บางครั้งอาจรุนแรงมากจนมีอาการของโรคตาหัยที่เรียกว่า สตีเวนส์ จอห์นสัน ซินโดรม หรือทำให้เกิดดีซ่านโดยไปจับกับบิลิรูบินในเลือด ซึ่งเป็นอาการที่พบได้ในทารกแรกเกิดซึ่งจะทำให้เด็กมีความผิดปกติทางสมองและปัญญาอ่อน เรียกกลุ่มอาการนี้ว่า เคอร์นิกเทอรัส นอกจากนั้นแล้วอาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน และเบื่ออาหาร⁽²⁻⁴⁾ ซึ่งเกษตรกรอาจมีรูปแบบและวิธีการใช้ยาที่ขาดความรู้และความเข้าใจ และละเลยการบริหารจัดการหยุดยาก่อนส่งโรงฆ่าอย่างเหมาะสม ทำให้เกิดสาเหตุของการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ได้ ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น เป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาการแพ้ยา การเกิดปัญหาเชื้อดื้อยาที่ทำให้ทางเลือกในการเลือกใช้ยาลดน้อยลง เป็นต้น การได้รับยาที่ตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ระดับต่ำอาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอีกทางหนึ่ง เนื่องจากจุลินทรีย์จะไม่ถูกทำลายเมื่อได้รับยาในปริมาณที่ต่ำกว่าขนาดยาที่ใช้⁽⁵⁻⁹⁾

คณะกรรมการพิจารณามาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ สาขาสารตกค้างจากยาสัตว์ในอาหาร (Codex Committee on residues of Veterinary Drug in foods, CCRDVF) รวมถึงกระทรวงสาธารณสุขโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (2550) เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้างเพื่อกำหนดค่าการตกค้างสูงสุดของ Sulfonamides ในอาหาร⁽¹⁰⁾ โดยใช้ซัลฟาเมทาซีน หรือซัลฟาไดมีดีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ Sulfonamides เป็นตัวกำหนด โดยในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และไขมัน มีปริมาณตกค้างได้สูงสุด Maximum residue limit (MRL) 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในนมปริมาณตกค้างสูงสุด 25 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ผ่านมาห้องปฏิบัติการได้ทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์ โดยสกัดสารกลุ่ม SAs ออกจากตัวอย่างด้วย ethyl acetate และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค solid-phase extraction โดยผ่าน C - 18 cartridge แล้วตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วย HPLC-UV detector ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาจากวิธีของ Ya-min และคณะ⁽¹¹⁾ พบว่ามีปัญหาการรบกวนของ matrix โดยพบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานและเมื่อขยายขอบข่ายไปตรวจวิเคราะห์ในเครื่องใน พบว่า C -18 cartridge ไม่สามารถกำจัดสารรบกวนในเครื่องในได้ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เป็น multiresidues method อาจเป็นแนวทางที่สามารถตรวจสอบปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม Sulfonamides จำนวน 9 ชนิดในเนื้อสัตว์ ตับ และไตหมูได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้นำวิธีตรวจวิเคราะห์ของ Li และคณะ⁽¹²⁾ มาปรับปรุงวิธีการสกัดสารกลุ่ม Sulfonamides โดยสารกลุ่มนี้จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างด้วยสารละลายผสมของ Ethanol: H₂O แล้วใช้ affinity column: IAC-SULF

ในการทำให้สารบริสุทธิ์มากขึ้น ตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วย HPLC-UV detector ซึ่งเป็นเครื่องมือเดิมที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการและเนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์และเครื่องในที่จำหน่ายในตลาด การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ multiresidues method และนำมาประยุกต์ใช้ในการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อหมู ตับหมู ไตหมู เนื้อไก่ ตับไก่ และเนื้อกึ่ง ซึ่งการติดตามตรวจสอบการตกค้างในเนื้อสัตว์และเครื่องในนั้น จะเป็นข้อมูลสำคัญอย่างหนึ่งที่จะใช้ประเมินผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายได้

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : Ethanol, HPLC Grade, glacial acetic acid AR, methanol HPLC grade และ acetonitrile HPLC grade, affinity column: IAC-SULF (Clover)

สารมาตรฐาน : sulfonamides standard 9 ชนิด ได้แก่ sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfapyridine (SPY), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SMZ), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfisoxazole (SFI), sulfamethoxazole (SMX) ผลิตภัณฑ์ของ Dr.Ehrenstorfer และ sulfaquinolaxine (SQ) ผลิตภัณฑ์ของ Chem Service inc. ความบริสุทธิ์ $\geq 95.0\%$

การเตรียมสารละลายและสารมาตรฐาน

0.2% acetic acid: ปิเปต glacial acetic acid (CH_3COOH) 2 ml ใส่ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
สารมาตรฐาน SAs (SDZ, STZ, SPY, SMR, SMZ, SMMX, SFI, SMX และ SQ) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรใช้เป็น stock standard solution

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, nitrogen evaporator-temperature-controlled heating box, SPE vacuum manifold, certified volumetric pipette, certified volumetric flask, screw cap centrifuge tube, glass funnel, glass microfiber filter paper, micro spin filter 0.45 μm PVDF และขวดแก้วสีชา (amber glass vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร, HPLC system (Agilent 1100 series) ประกอบด้วย vacuum degasser, quaternary pump, thermostatted column compartment และ UV detector โดยใช้ analytical column: Eclipse XDB-C18, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 μm

ตัวอย่าง

- ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี : เนื้อหมูใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทุก parameter ส่วน ตับหมู เนื้อไก่ และเนื้อกึ่ง ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเฉพาะ parameter การทดสอบ matrix blank ความแม่นยำ และความเที่ยง
- ตัวอย่างที่ใช้ในการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs: เนื้อหมู ตับหมู ไตหมู เนื้อไก่ ตับไก่ และเนื้อกึ่ง

การเตรียมตัวอย่าง

เนื้อหมูส่วนสะโพก ตัดส่วนที่เป็นไขมันออกหั่นเป็นชิ้นเล็ก เนื้อไก่ ใช้เฉพาะเนื้อ ตัดส่วนหนังและไขมันออก เนื้อกุ้ง ใช้เฉพาะเนื้อ ปอกเปลือก ตัดส่วนหัว หางและไขมัน ตับหมู และตับไก่ ตัดส่วนพังผืดและไขมันออก ไตหมู ใช้ทั้งหมด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นประมาณ 300 - 500 กรัม ซึ่งแบ่งตัวอย่างตัวอย่างละ 5 กรัม เพื่อเป็น analytical portions ส่วนตัวอย่างที่ยังไม่วิเคราะห์จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์

ซึ่งตัวอย่างน้ำหนัก 5 กรัม ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายผสมของ ethanol: H₂O (80 : 20) 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่านาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ปิดเปิดสารละลายส่วนใส 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารผสมที่ได้ผ่าน glass microfiber paper นำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยเตรียม SPE vacuum manifold และ IAC-SULF column ให้พร้อมใช้ และปรับอัตราไหลประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ตัดปลายจุกสีขาวด้านบน (top cap) จาก IAC-SULF column ใช้เป็นส่วนต่อระหว่าง column และ syringe ที่ใช้เป็น sample reservoir ปิดเปิดสารสกัดที่ได้จากการกรองแล้ว จำนวน 20 มิลลิลิตร ลงใน reservoir ที่ต่ออยู่กับ column ผ่าน column ด้วยอัตราไหลประมาณ 2 หยดต่อวินาที หรือ 2 มิลลิลิตรต่อนาที จนสารสกัดผ่าน column จนหมด (ทั้ง eluate) ล้าง column ด้วยน้ำ 10 มิลลิลิตร 1 ครั้ง (ทั้ง eluate) เติมน้ำ methanol 2 มิลลิลิตร เป็นตัวชะ (eluent) เก็บสารละลายส่วนที่ผ่านออกมาใน screw cap centrifuge tube ขนาด 10 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ละลายส่วนที่เหลืออยู่ด้วยสารละลายผสมของ CH₃CN: H₂O (30 : 70) 500 ไมโครลิตร จะได้สารสกัดตัวอย่าง ความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายตัวอย่างผ่าน micro-spin filters ชนิด PVDF 0.45 µm เก็บในขวดแก้วสีชา ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือต่อไป

การตรวจวัดชนิดและปริมาณสารกลุ่ม sulfonamides จำนวน 9 ชนิด ด้วยเครื่อง HPLC-UV Detector ใช้สภาวะดังนี้

Gradient condition

Time (min)		0.0	10.0	35.0	40.0	45.0	55.0
Mobile phase A 0.2% acetic acid (%)	:	88.0	88.0	60.0	30.0	88.0	88.0
Mobile phase B Acetonitrile (%)	:	12.0	12.0	40.0	70.0	12.0	12.0
Flow rate	:	0.7 ml/min					
Analytical column	:	Eclipse XDB - C18, 4.6 × 150 mm, 5 µm					
Guard column	:	C18, 5 µm					
Column Oven	:	30°C					
Inject volume	:	20 µl					
Detector	:	UV 268 nm					

เมื่อสภาวะของเครื่อง HPLC พร้อมใช้งาน ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) โดยการฉีดสารมาตรฐานผสม sulfonamides ความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 3 ซ้ำ คำนวณ %RSD ของ peak area, retention time (RT) และค่า tailing factor โดยเกณฑ์ยอมรับค่าการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบดังนี้ %RSD (peak area) ≤ 5%, %RSD (RT) ≤ 2% และ tailing factor < 2

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารมาตรฐานกลุ่ม SAs ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายผสมของ $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ (30 : 70) ฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation of coefficient: r)

วิเคราะห์ Method blank และ Matrix blank

Method blank: สกัดสารเคมีทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

Matrix blank: สกัดตัวอย่าง เนื้อหมู ตับหมู เนื้อไก่ และเนื้อกุ้ง ตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา (3 ซ้ำ) ฉีด Method blank และ Matrix blank เข้าระบบ HPLC เพื่อตรวจสอบว่าสารเคมีหรืออุปกรณ์ที่ใช้หรือตัวอย่างมีสารรบกวนต่อการวิเคราะห์หรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำๆ ลงในตัวอย่างวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่า LOD เท่ากับความเข้มข้นของสารที่สนใจ ที่ให้พีคที่ความสูงเท่ากับ 3 เท่า signal-to-noise ratio คำนวณต่อน้ำหนักของตัวอย่าง

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานประมาณ 2 เท่าของค่า LOD ลงในตัวอย่างวิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery และค่า RSD

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ แล้วสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง (concentration of the test sample) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ตรวจพบ (measured concentration) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

การทดสอบการกลับคืน (Recovery)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีโดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample)^(13,14) ที่ระดับ LOQ และ $2 \times \text{LOQ}$ ได้แก่ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำการวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery, %RSD และ HORRAT ผลของการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่ได้จะถูกประเมินดังนี้

ความแม่นยำ (accuracy) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยค่าเฉลี่ย % Recovery ในช่วงร้อยละ 60 - 120 ความเที่ยง (precision) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยใช้ HORRAT (Horwitz ratio) เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT ที่ codex กำหนดไว้ที่ $\leq 2^{(14)}$

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด โดยคำนึงถึงแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง⁽¹⁵⁾ รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า $k = 2$ ซึ่งปริมาณสารที่พบคำนวณได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC และคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก calibration curve โดยใช้สมการเส้นตรง⁽¹⁶⁾

การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing)

ประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการจากหน่วยงานภายนอก โดยการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ กับตัวอย่างที่รู้ค่ากำหนด (assigned value) กับหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบความชำนาญที่เชื่อถือได้ เกณฑ์ยอมรับของผลการทดสอบ คือ $|z| < 2$

การควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจวิเคราะห์ (Internal Quality control)

กำหนดให้ calibration curve ต้องมีค่า Coefficient of determination (R^2) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.990 และทดสอบประสิทธิภาพของ affinity column ทุกครั้ง เมื่อมีการเปลี่ยน lot ใหม่ค่า % recovery ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 80% ทุกครั้งการวิเคราะห์จะต้องวิเคราะห์ method blank, duplicate sample (สกัด 2 ซ้ำ) อย่างน้อยร้อยละ 10 ของจำนวนตัวอย่างในรุ่น ค่า relative percent difference (RPD) ไม่เกิน 30% และ spiked sample ที่ระดับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ค่า % recovery ต้องอยู่ในช่วง 60 - 120%

การสำรวจปริมาณตกค้างในเนื้อสัตว์ (Survey residue)

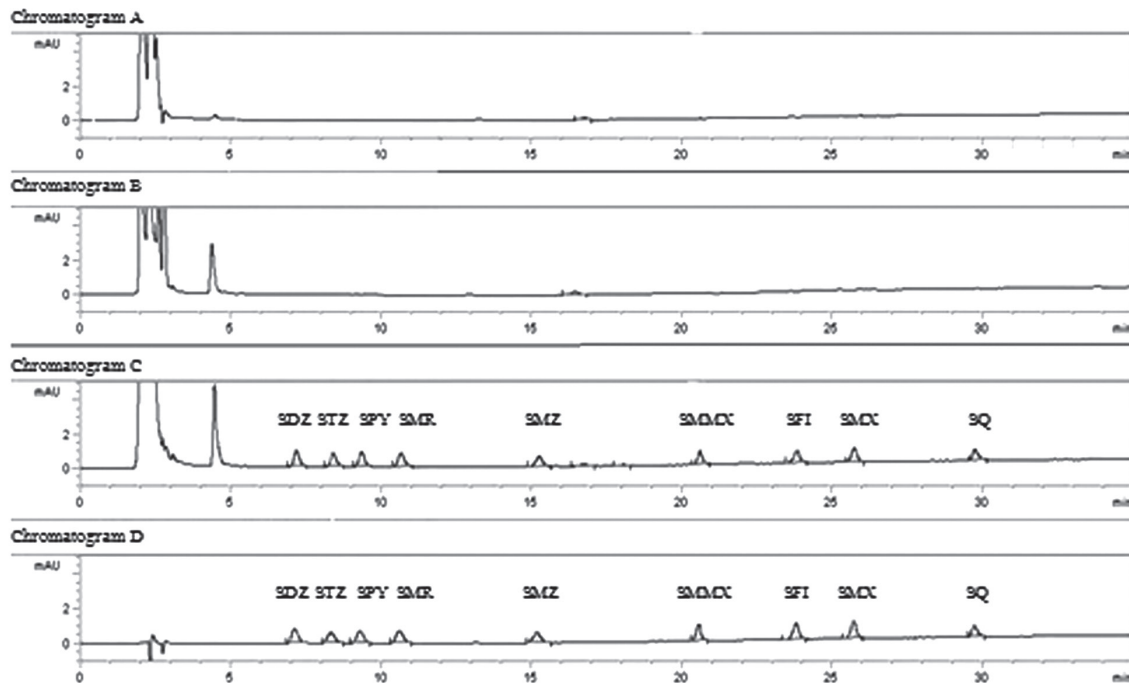
การสำรวจปริมาณตกค้างในเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมู ตับหมู ไตหมู เนื้อไก่ ตับไก่ และเนื้อกุ้ง เก็บจากตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานคร โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และเอกชน ในปี 2554 จำนวน 70 ตัวอย่าง ปี 2555 จำนวน 71 ตัวอย่าง ปี 2556 จำนวน 79 ตัวอย่าง ปี 2557 จำนวน 84 ตัวอย่าง และ ปี 2558 จำนวน 82 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 386 ตัวอย่าง

ผล

จากการตรวจวิเคราะห์ sulfonamides 9 ชนิด ได้แก่ sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfapyridine (SPY), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SMZ), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfisoxazole (SFI), sulfamethoxazole (SMX) และ sulfaquinoxaline (SQ) ด้วยเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่กำหนดพบว่าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานของสารดังกล่าวได้ในช่วง 0.05 - 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า r อยู่ในช่วง 0.9998 - 0.9999 และจากการศึกษาสภาวะของเครื่องมือ HPLC พบว่า chromatogram ของ method blank และ matrix blank ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผลวิเคราะห์

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) มีค่าเท่า 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการศึกษาเนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐาน จำนวน 10 ซ้ำ มีค่าเฉลี่ยของสาร 9 ชนิด โดยมีค่าความแม่นยำจาก % Recovery เฉลี่ยที่ระดับ LOQ ในช่วง 75.4 - 96.0% และความเที่ยงจาก HORRAT ในช่วง 0.3 - 0.7

ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่า chromatogram ของ matrix blank เนื้อหมู ตับหมู เนื้อไก่ และเนื้อกุ้ง ไม่มีพีคบริเวณที่ตรงกับพีคของสารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิด โดยมี runtime 35 นาทีต่อตัวอย่าง chromatogram ของ matrix blank เนื้อหมู และตับหมู (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamides ด้วยเครื่องมือ HPLC-UV detector (A และ B) chromatogram ของเนื้อหมูและตับหมู (C) chromatogram ของเนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (D) chromatogram ของสารมาตรฐานที่ระดับ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

ในการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์พบว่าการวิเคราะห์ sulfonamides 9 ชนิด มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 50 - 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยเติมสารมาตรฐานลงในเนื้อหมูที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 3 ซ้ำ มีค่า r ในช่วง 0.9941 - 0.9991

เมื่อทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่าง เนื้อหมู ตับหมู เนื้อไก่ และเนื้อกุ้ง ที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ลงในตัวอย่างที่ระดับ LOQ (50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และ $2 \times \text{LOQ}$ (100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจาก % Recovery ทั้ง 2 ระดับ อยู่ในช่วง 61.3 - 109.3% และความเที่ยงที่ประเมินด้วย %RSD และ HORRAT จะอยู่ในช่วง 2.5 - 15.0 และ 0.2 - 1.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

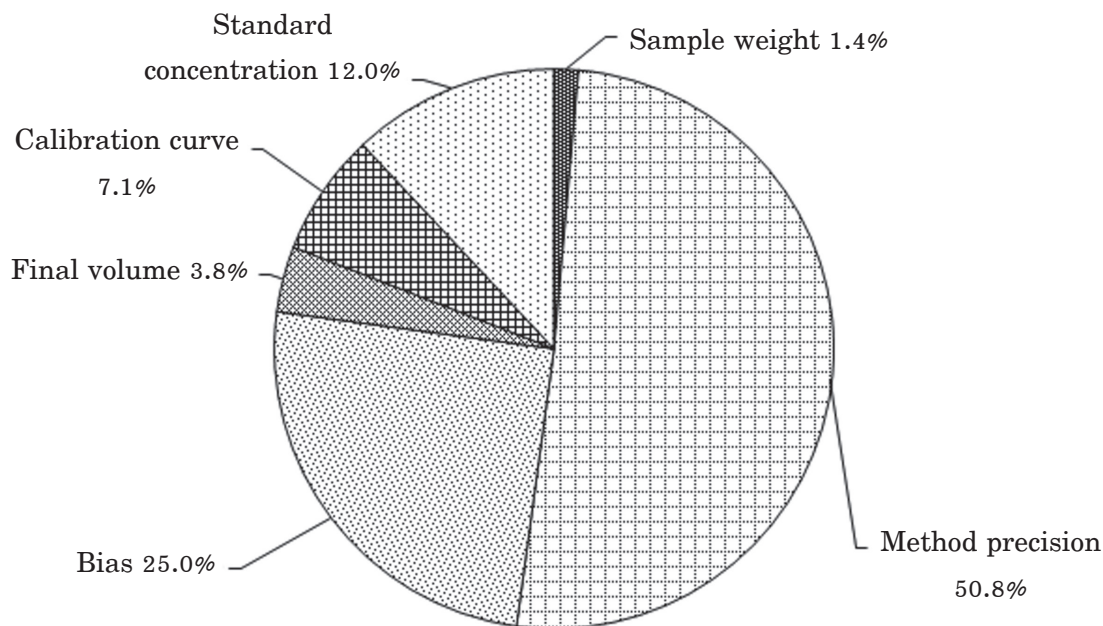
ตารางที่ 1 ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์เนื้อสัตว์และตับหมูเมื่อเติมสารมาตรฐาน 9 ชนิด ที่ระดับ 50 µg/kg (LOQ) และ 100 µg/kg (2 LOQ)

สารมาตรฐาน	RT (min)	ชนิดตัวอย่าง	Spiked level (µg/kg)	% Recovery (n = 10) mean ± SD	%RSP	HORRAT
Sulfadiazine	7.029	เนื้อหมู	50	93.4 ± 8.2	8.8	0.5
			100	93.5 ± 4.9	5.2	0.3
		เนื้อไก่	50	93.2 ± 10.5	11.3	0.6
			100	91.4 ± 7.7	8.5	0.6
		เนื้อกุ้ง	50	77.8 ± 3.5	4.5	0.2
			100	75.5 ± 8.6	11.4	0.8
		ตับหมู	50	93.6 ± 3.7	4.0	0.2
			100	91.1 ± 4.5	4.9	0.3
Sulfathiazole	8.191	เนื้อหมู	50	96.0 ± 4.8	5.1	0.3
			100	106.7 ± 5.7	5.4	0.4
		เนื้อไก่	50	89.1 ± 7.6	8.6	0.5
			100	96.2 ± 14.4	15.0	1.0
		เนื้อกุ้ง	50	85.7 ± 3.3	3.8	0.2
			100	83.6 ± 8.5	10.2	0.7
		ตับหมู	50	90.5 ± 3.6	4.0	0.2
			100	85.0 ± 5.3	6.2	0.4
Sulfapyridine	9.114	เนื้อหมู	50	81.4 ± 7.2	8.9	0.5
			100	78.6 ± 4.5	5.8	0.4
		เนื้อไก่	50	81.2 ± 8.3	10.2	0.5
			100	74.8 ± 5.2	7.0	0.5
		เนื้อกุ้ง	50	86.6 ± 3.2	3.7	0.2
			100	82.7 ± 6.9	8.3	0.6
		ตับหมู	50	95.9 ± 4.4	4.6	0.2
			100	70.8 ± 5.7	8.0	0.5
Sulfamerazine	10.445	เนื้อหมู	50	89.1 ± 9.7	10.9	0.6
			100	83.0 ± 4.2	5.0	0.3
		เนื้อไก่	50	85.7 ± 11.0	12.9	0.7
			100	77.8 ± 6.4	8.2	0.5
		เนื้อกุ้ง	50	86.1 ± 3.8	4.4	0.2
			100	81.2 ± 5.7	7.0	0.5
		ตับหมู	50	91.4 ± 3.4	3.7	0.2
			100	80.6 ± 5.1	6.3	0.4
Sulfadimidine (Sulfamethazine)	14.961	เนื้อหมู	50	88.3 ± 12.1	13.7	0.7
			100	79.5 ± 7.0	8.8	0.6
		เนื้อไก่	50	77.8 ± 5.4	6.9	0.4
			100	76.0 ± 5.4	7.1	0.5
		เนื้อกุ้ง	50	86.5 ± 5.0	5.7	0.3
			100	83.0 ± 6.3	7.6	0.5
		ตับหมู	50	87.2 ± 5.8	6.7	0.4
			100	69.7 ± 5.2	7.4	0.5

ตารางที่ 1 ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์เนื้อสัตว์และตับหมูเมื่อเติมสารมาตรฐาน 9 ชนิด ที่ระดับ 50 µg/kg (LOQ) และ 100 µg/kg (2 LOQ) (ต่อ)

สารมาตรฐาน	RT (min)	ชนิดตัวอย่าง	Spiked level (µg/kg)	% Recovery (n = 10) mean ± SD	%RSP	HORRAT
Sulfamonomethoxine	20.377	เนื้อหมู	50	75.4 ± 3.8	5.1	0.3
			100	70.9 ± 2.1	2.9	0.2
		เนื้อไก่	50	72.9 ± 2.7	3.7	0.2
			100	65.7 ± 2.6	3.9	0.3
		เนื้อกุ่ม	50	73.8 ± 2.9	3.9	0.2
			100	71.6 ± 2.4	3.3	0.2
		ตับหมู	50	74.6 ± 3.9	5.2	0.3
			100	63.6 ± 1.6	2.5	0.2
		เนื้อหมู	50	92.6 ± 8.2	8.9	0.5
			100	84.2 ± 2.1	2.5	0.2
Sulfamethoxazole	23.639	เนื้อไก่	50	91.8 ± 7.3	7.9	0.4
			100	83.1 ± 7.0	8.4	0.6
		เนื้อกุ่ม	50	87.9 ± 7.5	8.6	0.5
			100	81.6 ± 4.3	5.3	0.4
		ตับหมู	50	97.2 ± 8.2	8.5	0.4
			100	90.2 ± 4.0	4.5	0.3
Sulfisoxazole	25.563	เนื้อหมู	50	83.3 ± 4.8	5.7	0.3
			100	72.4 ± 4.2	5.8	0.4
		เนื้อไก่	50	83.3 ± 8.1	9.8	0.5
			100	66.9 ± 4.3	6.5	0.4
		เนื้อกุ่ม	50	78.3 ± 6.2	7.9	0.4
			100	74.9 ± 4.8	6.4	0.4
		ตับหมู	50	78.4 ± 2.8	3.6	0.2
			100	71.2 ± 4.2	5.9	0.4
Sulfaquinoxaline	29.624	เนื้อหมู	50	82.2 ± 10.4	12.6	0.7
			100	81.7 ± 5.1	6.3	0.4
		เนื้อไก่	50	85.9 ± 10.4	12.6	0.6
			100	86.7 ± 9.3	10.7	0.7
		เนื้อกุ่ม	50	83.5 ± 5.9	7.0	0.4
			100	73.8 ± 4.8	6.5	0.4
		ตับหมู	50	85.6 ± 7.1	8.3	0.4
			100	86.7 ± 4.0	4.6	0.3

เพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนานี้ จากการประมาณค่าของความไม่แน่นอนของการวัด พบว่าแหล่งของความไม่แน่นอนที่สำคัญคือ precision และค่า bias แหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสารจากมากไปน้อย ได้แก่ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ (method precision, 50.8%), ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias, 25.0%), สารมาตรฐาน (standard concentration, 12.0%), (calibration curve 7.1%), ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด (final volume, 3.8%, การชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (sample weight, 1.4%) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ sulfonamides

นอกจากนี้ได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์กับหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing provider) ที่เชื่อถือได้ โดยการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) กับตัวอย่างที่รู้ค่ากำหนด (assigned value) ในตัวอย่างไคหมู เนื้อกึ่ง และเนื้อไก่ ในระหว่างปี 2554 - 2558 ทั้งหน่วยงานภายในประเทศ ได้แก่ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด หน่วยงานต่างประเทศ ได้แก่ The Food and Environment Research Agency และเข้าร่วมในโครงการ APEC proficiency testing of veterinary drug residues in food program ซึ่งดำเนินการโดย Chinese Academy of Inspection and Quarantine (Under AQSIQ) ผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ ค่า $|z|$ น้อยกว่า 2 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงผลจากการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT)

ปี พ.ศ.	PT provider	ชนิดตัวอย่าง	ชนิดสารที่พบ	(µg/kg)		z-score
				Result report	Assigned value	
พ.ศ. 2554	The Food and Environment Research Agency	ไต่อหมู	sulfadiazine	92.0	97.6	-0.3
พ.ศ. 2556	บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด	เนื้อกุ้ง	Sample A			
			- sulfapyridine	35.3	41.4	-0.66
			- sulfamonomethoxine	31.5	40.1	-0.97
			Sample B			
			- sulfapyridine	34.4	41.4	-0.66
			- sulfamonomethoxine	30.8	40.1	-1.05
	Chinese Academy of Inspection and Quarantine	เนื้อไก่	Sample A			
			- sulfamethoxazole	33.8	28.0	1.00
			- sulfadimidine	36.3	36.2	0.02
			Sample B			
พ.ศ. 2557	บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด	เนื้อกุ้ง	- sulfamethoxazole	135.0	142.5	-0.27
			- sulfadimidine	113.0	122.6	-0.34
			Sample A			
			- sulfadiazine	83.96	88.55	-0.24
			- sulfadimidine	78.03	96.20	-0.86
			- sulfamonomethoxine	51.24	57.76	-0.48
			Sample B			
			- sulfadiazine	85.58	88.55	-0.65
			- sulfadimidine	75.04	96.20	-1.00
			- sulfamonomethoxine	52.86	57.76	-0.36
			Sample C			
			- sulfadiazine	86.33	88.55	-0.54
พ.ศ. 2558	บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด	เนื้อกุ้ง	- sulfadimidine	57.09	96.20	-1.85
			- sulfamonomethoxine	38.98	57.76	-1.46
			- sulfadiazine	52.06	49.62	0.22
			- sulfadimidine	36.68	49.45	-1.17
			- sulfamethoxazole	46.26	49.45	-0.29
			- sulfamerazine	41.30	49.99	-0.75

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว มาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ส่งตรวจที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้แก่ ตัวอย่างในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ที่จำหน่ายในตลาดในกรุงเทพมหานครและภาคเอกชน เพื่อตรวจสอบปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ ในช่วงปี พ.ศ. 2554 - 2558 รวม 386 ตัวอย่าง

ผลการตรวจวิเคราะห์ ตรวจพบสารกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์ 11 ตัวอย่าง ตับสัตว์ 12 ตัวอย่าง และไตหมู 2 ตัวอย่าง ชนิดสารที่พบคือ sulfisoxazole, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamethoxazole, sulfadimidine และ sulfaquinolaxaline ปริมาณที่ตรวจพบอยู่ระหว่างน้อยกว่า 50 - 1,027 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการตรวจวิเคราะห์เนื้อสัตว์และตับโดยการควบคุมคุณภาพภายในของผลการวิเคราะห์ พบว่า calibration curve มีค่า Coefficient of determination (R^2) ของสารทั้ง 9 ชนิดมากกว่า 0.990% ประสิทธิภาพของ affinity column ที่ทำการทดสอบทุกครั้ง เมื่อมีการเปลี่ยน lot ใหม่มีค่า % recovery มากกว่า 80% ค่า % recovery เฉลี่ยของสารทั้ง 9 ชนิดที่มาจากการ spiked sample ($n = 50$) อยู่ในช่วง 68.6 - 89.8 และค่า %RSD อยู่ในช่วง 13.4 - 17.4 ทุกครั้งการวิเคราะห์ method blank เพื่อดูการปนเปื้อนของขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผล (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การสำรวจปริมาณตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์ และตับ ในเขตกรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2554 - 2558

ปี พ.ศ.	ชนิดตัวอย่าง	จำนวน		ชนิดสารที่พบ	ปริมาณที่พบ ($\mu\text{g/kg}$)	
		วิเคราะห์	ตรวจพบ		ต่ำสุด - สูงสุด	mean
2554	เนื้อหมู	24	2	sulfisoxazole	32.0-91.0	61.5
	ตับหมู	6	1	sulfadimidine	59.0	-
	ไตหมู	3	0	-	-	-
	เนื้อไก่	23	1	sulfadiazine	192	-
	ตับไก่	4	0	-	-	-
	เนื้อกุ้ง	10	1	sulfathiazole	31.0	-
2555	เนื้อหมู	24	1	sulfadiazine	41.0	-
	ตับหมู	6	1	sulfamethoxazole	36.0	-
	ไตหมู	2	0	-	-	-
	เนื้อไก่	20	0	-	-	-
	เนื้อกุ้ง	19	0	-	-	-
2556	เนื้อหมู	19	0	-	-	-
	ตับหมู	1	0	-	-	-
	เนื้อไก่	47	0	-	-	-
	ตับไก่	6	0	-	-	-
	เนื้อกุ้ง	6	0	-	-	-

ตารางที่ 3 การสำรวจปริมาณตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์ และตับ ในเขตกรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2554 – 2558 (ต่อ)

ปี พ.ศ.	ชนิดตัวอย่าง	จำนวน		ชนิดสารที่พบ	ปริมาณที่พบ ($\mu\text{g/kg}$)	
		วิเคราะห์	ตรวจพบ		ต่ำสุด – สูงสุด	mean
2557	เนื้อหมู	9	0	–	–	–
	ตับหมู	7	2	sulfaquinoxaline	68.4	–
				sulfadimidine	1,027	–
	ไต่หมู	3	2	sulfadimidine	45.4–67.5	59.9
	เนื้อไก่	44	5	sulfisoxazole	22.8–41.8	33.5
	ตับไก่	21	0	–	–	–
2558	เนื้อหมู	28	1	sulfaquinoxaline	68.0	–
	ตับหมู	12	8	sulfadimidine	48.4–74.5	61.4
				sulfamethoxazole	33.1–79.9	40.0
	ไต่หมู	3	0	–	–	–
	เนื้อไก่	26	0	–	–	–
	ตับไก่	10	0	–	–	–
	เนื้อกุ้ง	3	0	–	–	–
	รวม	386	25			

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม SAs นั้น ใช้หลักการทั่วไปที่จะแยกสารกลุ่มนี้ออกมาโดยวิธี Liquid-liquid extraction ด้วยสารละลายที่เหมาะสม แล้วทำให้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยใช้สารดูดซับที่เหมาะสม กับวิธีการในการทำให้บริสุทธิ์ สามารถตรวจหาชนิดและปริมาณได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค Enzyme linked immunosorbance assay (ELISA), Radioimmunoassay (Charm II test) สามารถระบุชนิดและช่วง การตกค้างได้เป็นระดับ ใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้น^(17,18) ซึ่งส่วนมากเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่ต้องสั่งจาก ต่างประเทศ มีราคาแพง ส่วนวิธี HPLC เป็นวิธีที่สามารถระบุชนิดและปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ได้หลายชนิด มีค่า LOD และ LOQ ต่ำ ได้แก่ HPLC-UV detector, HPLC-DAD detector, HPLC-Fluorescence detector และ HPLC-MS/MS^(19,20,21) ทางผู้วิจัยเลือก HPLC-UV detector เนื่องจากเป็นเครื่องมือ ที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์ ในช่วงปี พ.ศ. 2551 – 2553 โดยนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาจากวิธีของ Ya min และคณะ⁽¹¹⁾ มาใช้พบว่ามีปัญหา การรบกวนของ matrix โดยพบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานคือ sulfadiazine ต้องทำ การยืนยันผลการวิเคราะห์โดยการเติมสาร fluorescamine เพื่อทำปฏิกิริยา derivatization ให้สามารถตรวจวัด ด้วย Fluorescence detector⁽²¹⁾ ได้ เพื่อแก้ปัญหาการรบกวนของ matrix เนื่องจาก SAs ไม่มีคุณสมบัติใน การเรืองแสง ซึ่งมีข้อจำกัดของวิธีคือหลังจากการทำปฏิกิริยา derivatization เพื่อให้ได้สารประกอบ fluorescent ประสิทธิภาพของการเรืองแสงจะให้ค่าสูงสุดคือ 30 นาที ทำให้สามารถตรวจยืนยันได้ในเวลาจำกัดและวิธีเดิม สามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะเนื้อสัตว์เท่านั้น จึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีโดยนำวิธีตรวจวิเคราะห์ของ Li และคณะ⁽¹²⁾

มาปรับปรุงวิธีการสกัดโดยใช้สารละลายผสมของ ethanol: H₂O แทนการใช้สารละลายผสม methanol: H₂O และสารละลาย phosphate-buffer (PBS) แล้วใช้ affinity column: IAC-SULF ในการทำให้สารบริสุทธิ์ เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะกับสารกลุ่ม SAs สูง พบว่าสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ลดการใช้สาร ออร์แกนิกที่เป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์และตกค้างสู่สิ่งแวดล้อม เพิ่มศักยภาพในการวิเคราะห์โดยสามารถวิเคราะห์ ได้หลายตัวอย่างพร้อมๆ กัน เมื่อปรับปรุงวิธีแล้วและยังสามารถขยายขอบข่ายไปวิเคราะห์ในไตและตับได้ เมื่อได้ตรวจสอบความถูกต้องวิธีแล้วตาม Eurachem^(13,14) พบว่ามีค่า LOD, LOQ ความเที่ยงและความแม่นยำ เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของวิธี จากการประมาณค่าของความไม่แน่นอนของการวัดโดยได้พิจารณาแหล่งความ ไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อปริมาณสาร^(15,16) โดยนำการวิเคราะห์ sulfadimidine ในตัวอย่างเนื้อหมูเป็นตัวอย่าง พบว่าแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด การเตรียมสาร มาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ ค่า Co ที่อ่านได้จาก calibration curve ค่า bias ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพ ของการวิเคราะห์จาก % recovery และความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ (repeatability) ได้ค่า relative standard uncertainty, $u(x)/x$ เมื่อนำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งมารวมกันจะได้ค่า combined standard uncertainty เท่ากับ $\pm 10.2\%$ และนำมาขยายให้เป็น Expanded uncertainty, U จะได้ค่าความไม่แน่นอน เท่ากับ $\pm 17.2\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในช่วงวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวยังมีข้อควรระวังคือตัวอย่างที่วิเคราะห์ ขั้นตอนการสกัดหลังจากกรองสารผสมที่ได้ผ่าน glass microfiber paper filtrate ที่ได้ให้รับนำสารที่ได้ไปผ่าน column ขั้นตอนการกรองและผ่าน column ต้องใช้เวลาไม่เกิน 30 นาที filtrate ที่ได้ต้องเป็นของเหลวใส ถ้าไม่ ใสให้กรองซ้ำ ระวังอย่าให้ IAC-SULF column แห้ง ควรสกัดและผ่าน affinity column ให้เสร็จภายในวันเดียว affinity column ที่ยังไม่ใช้งานควรเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และตรวจสอบประสิทธิภาพ ของ affinity column ทุก Lot ที่ใช้เนื่องจากมีอายุการใช้งานและมีผลต่อปริมาณของสารที่สนใจ และจุดที่ควรระวัง มากคือขั้นตอนการระเหยแห้งด้วย nitrogen evaporator ต้องไม่ให้แห้งเกินไป หากไม่ระวังในขั้นตอนที่กล่าวมา จะทำให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ลดลง และ % recovery ของ spiked matrix ต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด

จากวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้ได้นำมาใช้ในการสำรวจปริมาณตกค้างในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมู ตับหมู ไตหมู เนื้อไก่ ตับไก่ และเนื้อกุ้ง ที่จำหน่ายทั่วไปตามตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 386 ตัวอย่าง ในระหว่าง พ.ศ. 2554 - 2558 ตรวจพบ SAs ตกค้าง จำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.5 ซึ่งพบการตกค้าง ในเครื่องในมากกว่าในเนื้อสัตว์ ข้อมูลการตกค้างจากการสำรวจอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2554 - 2558 วิเคราะห์ ตัวอย่างปีละประมาณ 80 ตัวอย่าง พบว่าในตัวอย่างเนื้อสัตว์มีแนวโน้มลดลง แต่มีการตรวจพบในตับหมู ไตหมู และ ตับไก่มากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณที่ตรวจพบกับค่ากำหนด ปริมาณตกค้างสูงสุด (MRL) ของ Sulfonamides ในอาหาร ที่กำหนดโดยคณะกรรมการพิจารณามาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ สาขาสารตกค้างจากยาสัตว์ในอาหาร (Codex Committee on residues of Veterinary Drug in foods, CCRDVF) และกระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีเพียง ตับหมู 1 ตัวอย่างที่พบการตกค้างสูงเกินค่ากำหนด จากผลการสำรวจเบื้องต้นอาจสะท้อนให้เห็นว่า กระบวนการผลิตจนถึงจำหน่ายเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ให้แก่ผู้บริโภค มีการควบคุมมาตรฐานการผลิตได้อย่างมี ประสิทธิภาพ ทำให้ผู้บริโภคมั่นใจในระดับหนึ่งว่าเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่นำมาบริโภคนั้นมีความปลอดภัยจากยา สัตว์ในกลุ่มดังกล่าว

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม Sulfonamides โดยใช้หลักการของ multiresidues method โดยเทคนิค HPLC ที่ได้ปรับปรุงวิธีและทำให้บริสุทธิ์ด้วย affinity column: IAC-SULF นี้สามารถ ลดปัญหาการรบกวนจาก matrix ของตัวอย่างรวมทั้งมีขั้นตอนการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก ผลการทวนสอบความถูกต้อง

ของวิธีพบว่าเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ สามารถนำวิธีมาใช้ในห้องปฏิบัติการในการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร การติดตามตรวจสอบการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์นั้นจะเป็นข้อมูลสำคัญอย่างหนึ่งที่จะใช้ประเมินผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ใช้เป็นข้อมูลสำหรับการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และสร้างความมั่นใจให้ผู้บริโภคในความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางกนกพร อธิสุข นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญด้านมาตรฐานของอาหาร ที่ให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้ ท้ายที่สุดขอขอบคุณนางสาวสิริลักษณ์ ชัยรินทร์ และนางสาวกรรพรณ สงศรี ที่ได้เตรียมและสกัดตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. Poirier LA, Doerge DR, Gaylor DW, Miller MA, Lorentzen RJ, Casciano DA, et al. An FDA review of sulfamethazine toxicity. Regul Toxicol Pharmacol 1999; 30(3): 217-22.
2. กำพล ศรีวัฒนกุล และคณะ. คู่มือการใช้ยาฉบับสมบูรณ์. พิมพ์ครั้งที่ 7. ปทุมธานี : บริษัทสกายบุ๊กส์ จำกัด; 2552. หน้า 153-156.
3. โอนา อุทัยพัฒน์, นงลักษณ์ สุขวานิชย์ศิลป์. เกสซ์วิทยา เล่ม 2. กรุงเทพฯ : บริษัทไทยมิตรการพิมพ์; 2541. หน้า 1-25, 162-171.
4. Jawetz E. Sulfonamides & trimethoprim. In: Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. 2nd ed. Los Altos, CA: Lange Medical Publications; 1984. p. 554-558.
5. USP veterinary pharmaceutical information monographs: sulfonamides. [online]. 2003; [cited 2006 Jul 26]. Available from: URL: <http://www.usp.org/audiences/veterinary/monographs/main.html>.
6. 21 CFR 520.2260a; U.S. national archives and records administration's. electronic code of federal regulations. [online]. [cited 2006 Jun 21]. Available from: URL: <https://www.ecfr.gov>.
7. Huber WG. The impact of antibiotic drugs and their residues. In: Brandly CA, Gornelius C, editors. Advances in veterinary science and comparative medicine. New York: Academic Press; 1971. p. 101-132.
8. Wilson RC. Antibiotic residues and public health. In: Crawford LM, Franco DA, editors. Animal drugs and human health. USA: Technomic Publishing; 1994. p. 63-80.
9. Donoghue DJ. Antibiotic residues in poultry tissue and eggs: human health concerns. Poultry Science. 2003; 82: 618-21.
10. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (พ.ศ. 2550) เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 120 ตอนพิเศษ 47ง (ลงวันที่ 23 เมษายน 2546) หน้า 12.
11. Kao YM, Chang MH, Cheng CC, Chou SS. Chieu-Chen Cheng, Shin-Shou Chou. Multiresidue determination of veterinary drugs in chicken and swine muscles by high-performance liquid chromatography. J Food Drug Anal 2001; 9(2): 84-95.
12. Li B, Li C, Jiang H, Wang Z, Cao X, Zhao, et al. Purification of nine sulfonamides from chicken tissues by immunoaffinity chromatography using two monoclonal antibodies. J AOAC Int 2008; 91(6): 1488-93.

13. Eurachem Guide. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom: LGC (Teddington) LTd; 1998. p. 61, 5-24.
14. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
15. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. United Kingdom; 2000.
16. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
17. Sheth HB, Sporns P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. J Agric Food Chem 1991; 39(9): 1696-700.
18. Korsrud GO, Papich MG, Fesser ACE, Salisbury CDC, Macneil JD. Laboratory testing of the charm test II receptor assays and the charm farm test with tissues and fluids from hogs fed sulfamethazine, chlortetracycline, and penicillin G. J Food Prot 1996; 59(2): 161-6.
19. Ito Y, Oka H, Ikai Y, Matsumoto H, Miyazaki Y, Nagase H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis: V. Simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. J Chromatogr A 2000; 898(1): 95-102.
20. Hela W, Brandtner M, Widek R, Schuh R. Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection. J Food Chem 2003; 83(4): 601-08.
21. Salisbury CD, Sweet JC, Munro R. Determination of sulfonamide residues in the tissue of food animals using automated precolumn derivatization and liquid chromatography with fluorescence detection. J AOAC Int 2004; 87(5): 1264-8.

Development of Analytical Method for Sulfonamides residue in Animal tissues and Liver by HPLC Technique

Chalearmphorn Kuanha and Jitpaka Suntudrob

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

ABSTRACT Sulfonamides (SAs) are antimicrobial drugs extensively prescribed for bacteriostatic infections in humans and animals and widely used in livestock production. Thus, any misuse or lack of adherence to withdrawal time may result in the presence of tissue residues. Drug residues in food products are of concern to consumers because they may compromise the human immune system causing an allergic reaction or contributing to the development of antibiotic-resistant pathogenic bacterial strains. The study for validation of an analytical method of 9 SAs including sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfapyridine (SPY), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SMZ), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfisoxazole (SFI), sulfamethoxazole (SMX) and sulfaquinoxaline (SQ) in animal tissue and liver was conducted and developed by using pork as a representative matrix. This, SAs was extracted from sample with 80% ethanol and proceeded to specific of sulfonamides affinity column. SAs was detected and quantitatively determination by HPLC-UV detector. The method validation data were accepted and fitted-for-purpose. As a result of method validation, limit of detection was defined as 30 µg/kg and limit of quantitation was 50 µg/kg The linear working range was 50 – 500 µg/kg with the Pearson correlation of coefficient (r) more than 0.990. The accuracy and the precision as 2 levels by 10 duplicate analyst. Accuracy of the method was found to be in acceptable ranges of 61 – 106 and % precision shown is 2.5 – 15.0%. The results of participated in Proficiency Testing scheme performed by various PT providers were satisfying ($|z| < 2$). The performance of developed method for determination of 9 SAs residue in animal and product was found to be satisfactory to meet with legal requirement for quality in food industry. The survey research on Sulfonamides abuse from 368 samples of edible animal and product, sold in markets in Bangkok and private sector was conducted during 2011 – 2015. The results showed that 25 samples (6.5%) including sulfisoxazole sulfadiazine sulfathiazole sulfamethoxazole sulfadimidine and sulfaquinoxaline. The level found was from less than 50 to 1,027 µg/kg

Key words: Sulfonamides (SAs), animal tissue, liver, HPLC-UV