การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และผลการสำรวจปริมาณสารไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ในเนื้อสัตว์ โดย LC-MS/MS

มาลี เจริญวิทย์วรกุล
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ กลุ่มยาไนโตรฟูแรนเดิมนิยมใช้เป็นยารักษาโรคในสัตว์ ต่อมาพบว่ามีคุณสมบัติของการเป็นสารก่อมะเร็ง และสารก่อกลายพันธุ์ ประเทศไทยและอีกหลายประเทศได้ออกกฎหมายห้ามใช้เป็นยารักษาสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคของมนุษย์ และสหภาพยุโรปได้ออกข้อกำหนดของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยากลุ่มนี้ 4 ชนิด ในเนื้อสัตว์ โดยต้องหาในรูปของสารเมตาบอไลท์ ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) และต้องวัดได้ต่ำถึงระดับที่ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Minimum Required Performance Limits : MRPLs) จึงได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์โดยเติม isotope-labelled analogues ของสารเมตาบอไลท์ 4 ชนิด เป็น internal standard ใช้กรดไฮโดรไลส์สารเมตาบอไลท์ส่วนที่จับกับโปรตีนทำเป็นสารอนุพันธ์ นำมาปรับ pH 7.0 ± 0.5 สกัดแยกสารด้วย liquid-liquid extraction วิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วย LC-MS/MS ช่วงการวิเคราะห์ที่ 0.1-2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้เป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่าง 0.9860 - 1.0000 ความแม่นของวิธีแสดงด้วย %recovery 88.9-112.0% ความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ประเมินโดย HORRAT ค่า <2 ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) 0.05 - 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าต่ำสุดที่ตรวจปริมาณได้ (LOQ) 0.1 - 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้ทำการสำรวจการตกค้างของกลุ่มยานี้ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตของเขตกรุงเทพมหานคร ช่วงปี พ.ศ. 2551-2554 รวมทั้งสิ้น 402 ตัวอย่าง พบ AOZ ตกค้างในเนื้อหมูกับเครื่องในร้อยละ 12.2 ที่ระดับ <0.1-44.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบ SEM ตกค้างในกุ้งร้อยละ 4.2 ที่ระดับ <0.3-2.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณที่พบของ AOZ และ SEM ในแต่ละปี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงถึงมีการใช้ยาทั้ง 2 ชนิดในช่วงปีที่สำรวจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังและควบคุมการใช้ยาอย่างเข้มงวด

Accepted for publication, 9 April 2015

บทนำ

ไนโตรฟูแรน (nitrofurans) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย วงแหวนฟูแรนและไนโตรกรุ๊ป เรียกว่า 5-nitrofuraldehyde มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อของระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและปศุสัตว์ที่นิยมใช้มี 4 ชนิด ได้แก่ furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin และ nitrofurazone ขบวนการเมตาบอลิซึมในสัตว์จะเปลี่ยนยาตั้งต้น (parent drugs) เป็นสารเมตาบอไลท์อย่างรวดเร็วและจับตามเนื้อเยื่อโปรตีนได้นานหลายสัปดาห์อย่างมีความเสถียร จึงตรวจพบยากลุ่มนี้ในรูปสารเมตาบอไลท์ ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ตามลำดับ โดยเฉพาะ furazolidone ใช้มากในฟาร์มเลี้ยงหมู เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและราคาถูก แต่สารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง (Mutagen and carcinogen)[1] สหภาพยุโรป, ประเทศไทยและอีกหลายประเทศ จึงได้ออกกฎหมายบังคับห้ามใช้เป็นยารักษาสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคของมนุษย์ โดยสหภาพยุโรปได้ออกข้อกำหนดเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ตกค้างทั้ง 4 ชนิด ในเนื้อสัตว์ ของห้องปฏิบัติการต้องวัดค่าได้ต่ำถึงระดับที่กำหนด (Minimum Required Performance Limits; MRPLs) ที่ 1.0 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม[2] และกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนดค่า MRPLs (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ที่ 0.3 สำหรับ AOZ และ AMOZ และ ที่ 1.0 สำหรับ AHD และ SEM เพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงดำเนินการเมื่อพบการตกค้าง [3, 4]

การวิเคราะห์ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ในเนื้อสัตว์ด้วย LC-MS/MS มีหลักการสกัดตัวอย่างที่เหมือนกันอาจมีเพิ่ม solid-phase extraction (SPE) ในการทำให้บริสุทธิ์และใช้สภาวะของ LC แตกต่างกันไป[5, 6, 7] หลักการสกัด คือ สลายพันธะของไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ที่จับกับโปรตีน (protein-bound metabolites) ให้อยู่ในรูปอิสระด้วยกรด (hydrolysis) เปลี่ยนไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ (total nitrofuran metabolites: free and proein-bound metabolites) เป็นสารอนุพันธ์ของ nitrophenyl (NP) โดยทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ (derivatisation) กับ 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) ปรับ pH ให้เป็นกลาง (neutralisation) สกัดแยกสาร (liquid-liquid extraction) ด้วย ethyl acetate ทำให้แห้งแล้วละลายในตัวทำละลายนำไปวิเคราะห์ปริมาณและยืนยันชนิดสารด้วย LC-MS/MS

ผู้วิจัยได้สกัดตัวอย่างตาม van Rhijn, J.A. และคณะ โดยปรับเปลี่ยนสภาวะของ LC ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายตัวอย่าง, ชนิดของคอลัมน์ที่แยกสาร, ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายตัวพา เพื่อให้การแยกของสารดีและเร็วขึ้น และตัวอย่างตับหมูได้เพิ่มขั้นตอนการสกัดด้วย n-hexane เพื่อลดสารรบกวนแล้วทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในกุ้ง ไก่ และตับหมู (ตัวแทนสัตว์น้ำ สัตว์บก และเครื่องในสัตว์ตามลำดับ) นำวิธีทดสอบที่ได้ตรวจหาปริมาณและชนิดของยากลุ่มไนโตรฟูแรนที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ที่บริโภคระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554 เพื่อเป็นข้อมูลการเฝ้าระวังความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อประเมินแนวโน้มของการใช้ยาโดยเปรียบเทียบปริมาณเฉลี่ยที่ตกค้าง

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี (AR grade) : hydrochloric acid, 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA), trisodium phosphate, sodium hydroxide, ammonium acetate, ethyl acetate, methanol (HPLC grade)

สารมาตรฐาน : 3-amino-2-oxazolidinone, 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone, 1-aminohydantoin, semicarbazide hydrochloride, 3-amino-2-oxazolidinone-D_4(AOZ-D_4), 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone-D_5(AMOZ-D_5), 1-aminohydantoin -$^{13}C_3$(AHD-$^{13}C_3$), semicarbazide hydrochloride-$^{13}C^{15}N_2$(SEM-$^{13}C^{15}N_2$) สารมาตรฐานทุกตัวเป็นของ WITEGA Laboratory Berlin ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99 ยกเว้น SEM ของ Sigma Aldrich ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน stock solution : เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานน้ำหนักแน่นอน 5 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร โดยแยกเตรียมแต่ละตัว และนำมาเตรียม working solution สารละลายผสม 4 ชนิด ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 100 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol ตามลำดับ

สารละลาย internal standard stock solution : เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสาร internal standard น้ำหนักแน่นอน 5 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร โดยแยกเตรียมแต่ละตัว และนำมาเตรียม working solution สารละลายผสม 4 ชนิด ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol ตามลำดับ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 และ 5 ตำแหน่ง, เครื่องเขย่า, vortex mixer, turbovap LV: Zymark, ultra sonic bath, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย HPLC: hewlett packard series 1100 และ mass spectrometer: AB applied biosystems MDS SCIEX API – 4000

สภาวะของ LC

- analytical column : Clipeus C18, 150 mm × 3 mm.id, 5 µm (Higgins Analytical)
- guard column : Symmetry Sentry C18, 3.9 mm × 20 mm.id, 5 µm (Waters)
- mobile phase A : 0.5 mM ammonium acetate in deionized water
- mobile phase B : methanol
- flow rate : 0.6 ml/min
- column oven : 30°C
- injection volume : 20 µl
- gradient LC condition

เวลา (นาที)	B (%)
0	24
5	52
10	52
10.1	96
13.4	96
13.5	24
15	24

สภาวะของ MS

- scan mode : MRM scan
- ionisation mode : ESI (positive mode)
- source temperature : 450°C
- ionspray voltage : 5200 (turbo spray)
- collision gas (CID) : nitrogen, pressure 1.2 torr

สภาวะของ MS-MS (DP = declustering potential, CE = collision energy, CXP = collision cell exit potential)

analyte	precursor ion (m/z)	quantitative product ion (m/z) confirmatory product ion (m/z)	dwell time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
NP-AOZ	236.37	103.89	150	76	33	10
		133.94	150	76	19	12
NP-AMOZ	335.13	262.05	150	56	15	10
		291.15	150	51	19	18
NP-AHD	249.20	103.90	150	61	31	8
		133.90	150	61	19	8
NP-SEM	209.46	191.90	150	56	17	12
		166.04	150	56	15	10
NP-AOZ-D_4	240.37	133.94	150	76	19	12
NP-AMOZ-D_5	340.13	296.15	150	51	19	18
NP-AHD-$^{13}C_3$	252.24	133.97	150	61	19	8
NP- SEM-$^{13}C^{15}N_2$	212.21	168.0	150	56	15	10

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ทดสอบวิธี : กุ้ง ไก่ และตับหมู ที่ตรวจไม่พบสารตกค้าง ด้วย LC-MS/MS น้ำหนักประมาณ 300 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ-18°ซ (matrix blank)

ตัวอย่างที่สำรวจ : ตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ กุ้ง เนื้อไก่กับเครื่องในไก่ และเนื้อหมูกับเครื่องในหมู หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°ซ รวมทั้งสิ้น 402 ตัวอย่างจากตลาดสด 22 แห่ง และซูเปอร์มาร์เก็ต 6 แห่ง ในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554 โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเก็บตัวอย่างส่งวิเคราะห์

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 1 กรัม ใน centrifuge tube ขนาด 35 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดด้วย 0.2 M hydrochloric acid 5 มิลลิลิตร และ 100 mM 2-NBA 50 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex mixer จนตัวอย่างกระจายตัว เขย่าต่อด้วย shaker นาน 10 นาที นำไปตั้งที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16 ชั่วโมง นำมาเติม 0.3 M trisodium phosphate 250 ไมโครลิตร และปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.0 ± 0.5 ด้วย 2 N sodium hydroxide เติม ethyl acetate 5 มิลลิลิตร เขย่า 10 นาที แยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนสารละลายลงใน

test tube ขนาด 20 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างด้วย ethyl acetate 5 มิลลิลิตร ซ้ำอีกครั้ง นำชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่แยกได้ทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง turbo vap LV อุณหภูมิ 40 °ซ ละลายตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย 50% methanol in deionized water 0.5 มิลลิลิตร (กรณีตัวอย่างตับหมูหลังการระเหยแห้งให้ละลายตัวอย่างด้วย deionized water 0.25 มิลลิลิตร และเติม n-hexane 2 มิลลิลิตร ผสมด้วย vortex mixer นาน 1 นาที แยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดชั้นของ n-haxane ทิ้งสกัดตัวอย่างด้วย n-haxane 2 มิลลิลิตร ซ้ำอีกครั้ง ดูดชั้นของ n-haxane ทิ้ง เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ไล่ n-haxane ที่ค้างอยู่ เติม methanol 0.25 มิลลิลิตร ผสมด้วย vortex mixer นาน 1 นาที) แล้วกรองสารละลายตัวอย่างผ่าน 0.2 μm PVDF membrane ก่อนฉีดเข้า LC-MS/MS

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์[8]

การทำ method blank และ matrix blank

method blank : สกัดสารเคมีโดยไม่ใช้เนื้อตัวอย่าง เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS

matrix blank : สกัดตัวอย่างที่ไม่พบสารตกค้าง จำนวน 2 ซ้ำ โดยเติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS

การทำกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารอนุพันธ์ nitrophenyl ของสารละลายมาตรฐานโดยปิเปต 0.01, 0.02, 0.06, 0.2 และ 0.4 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐานผสม 4 ชนิด เข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 35 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร แล้วทำตามขั้นตอนการสกัดตัวอย่างโดยไม่มีเนื้อตัวอย่าง ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.2, 0.6, 2 และ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองตัวอย่างผ่าน 0.2 μm PVDF membrane ฉีดเข้า LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ internal standard (concentration ratio) กับค่าอัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ internal standard (area ratio) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง (กุ้ง และไก่) ระดับละ 1 ซ้ำ เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดตัวอย่างและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ internal standard (concentration ratio) ในตัวอย่างแต่ละชนิด กับค่าอัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ internal standard (area ratio) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (Limit Of Detection, LOD)

ประมาณค่า LOD โดยฉีดสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐาน ให้ peak ที่มีค่า signal to noise เท่ากับ 3 คำนวณเป็นความเข้มข้นต่อน้ำหนักตัวอย่าง ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานที่คำนวณได้ใน blank sample จำนวน 10 ซ้ำ เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS

ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ (Limit Of Quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานประมาณ 3 เท่าของ LOD ลงใน blank sample จำนวน 10 ซ้ำ เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS คำนวณความแม่น (% recovery) และความเที่ยง (% RSD)

การทดสอบความแม่นและความเที่ยง (Accuracy and precision)

ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.3, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (เนื้อไก่, กุ้ง) และที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตับหมู) ระดับละ 10 ซ้ำ แล้วเติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS คำนวณค่าความแม่น (% recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 60-120 ความเที่ยง (% RSD) และค่า HORRAT (Horwitz ratio) โดยมีเกณฑ์การยอมรับตาม Codex และ EU≤2

การประเมินแหล่งและหาค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty)[9]

วิเคราะห์ปริมาณสารเมตาบอไลท์ (AOZ) โดยชั่งเนื้อไก่ 1 กรัม เติม AOZ ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง จาก

สมการกราฟเส้นตรง $Y = mC + b$

$C = Y - b/m$

$C = C_0/C_{ISTD}$

โดย Y = peak area ratio, m = slope, C = concentration ratio และ b = intercept

ปริมาณสารที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) = $C \times C_{ISTD} \times V/W$

โดย C_0 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร), C_{ISTD} = ความเข้มข้นของ internal standard (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร), V = ปริมาตรสุดท้ายสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร) และ W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

จากสูตรคำนวณปริมาณสารที่พบ หาแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนจากการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง การเตรียมสารมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ และกราฟมาตรฐาน รวมทั้งความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำ (precision) และความแม่น (accuracy) จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ใช้ค่า k = 2 รายงานความไม่แน่นอนในรูปของความไม่แน่นอนขยาย

การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์

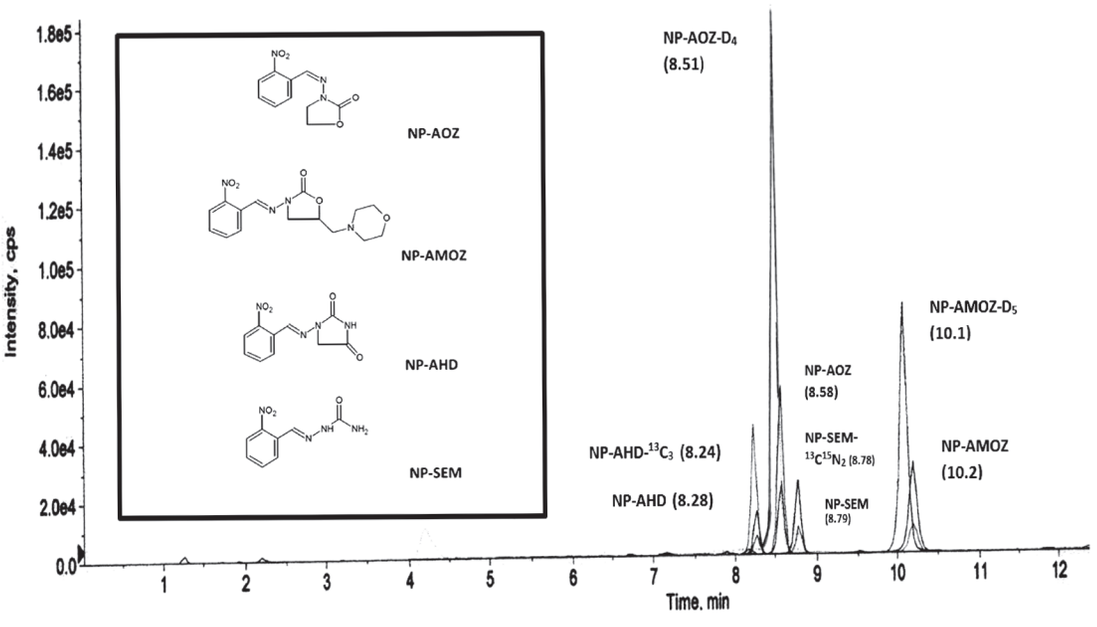
External quality control : เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์ (Proficiency test) กับ FAPAS ประเทศอังกฤษ คือ ทดสอบ AMOZ และ AHD, AOZ และ SEM ในไตหมู, ทดสอบ AOZ และ AHD ในเนื้อหมู และทดสอบ total AMOZ และ bound AMOZ ในกุ้ง

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณสารที่พบโดยวิธีทางสถิติ

เปรียบเทียบปริมาณตกค้างที่พบของ AOZ ในเนื้อหมูกับเครื่องใน และ SEM ในเนื้อกุ้ง ในช่วงของปีที่สำรวจด้วยวิธีทางสถิติ โดยตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลว่ามีการแจกแจงเป็นแบบปกติหรือไม่ ถ้าเป็นใช้ one-way ANOVA หากไม่เป็นปกติใช้ Nonparametric statistics โดยใช้โปรแกรม SPSS[10]

ผล

ภายใต้สภาวะของ LC ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เลือกคอลัมน์ชนิด reverse phase ด้วยการใช้ ClipeusC_{18}, 150 mm × 3 mm.id, particle size5 μm (Higgins Analytical) แยก (elute) สารด้วยอัตราส่วนแบบผสม (linear gradient) ระหว่าง methanol และ 0.5 mM ammonium acetate เกิดการแยกของสารมีค่า retention time และลักษณะของพีคตาม chromatogram โดย AOZ มีความไวการวัดสูงสุด ตามด้วย AMOZ, AHD และ SEM ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน



ภาพที่ 1 Extracted Ion Chromatogram (XIC) ของสารอนุพันธ์ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์

จากการทดสอบการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ 4 ชนิด ได้แก่ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM ในเนื้อสัตว์ (กุ้ง เนื้อไก่ และตับหมู) ด้วย LC-MS/MS ตามสภาวะที่กำหนด เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ internal standard (concentration ratio) กับค่าอัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ internal standard (area ratio) ที่ความเข้มข้น 0.1-4.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ของ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM ได้กราฟเป็นเส้นตรง มีค่า r 0.9954 - 0.9992 และเมื่อทำการวิเคราะห์ method blank และ matrix blank ไม่พบ peak ของสารรบกวน ยกเว้นสารรบกวนของ SEM ในกุ้ง ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟเป็นเส้นตรงมีค่า r ระหว่าง 0.9860 - 1.0000

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ (กุ้ง ไก่) พบค่า LOD ของ AOZ และ AMOZ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม AHD และ SEM 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LOQ ของ AOZ และ AMOZ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม AHD และ SEM 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่าเฉลี่ยความแม่น (% recovery) ร้อยละ 82.5-111 และความเที่ยงประเมินด้วย

HORRAT 0.4-1.9 ส่วนตับหมู มีค่า LOD ของ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOQ ของ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM 0.2, 0.3, 1.0 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ได้ค่าเฉลี่ยความแม่น (% recovery) ร้อยละ 92.6-97.7 และความเที่ยงประเมินด้วย HORRAT 0.3-1.4 ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธี (accuracy and precision) ที่ความเข้มข้น 0.3, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ไก่ กุ้ง) และที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตับหมู) มีความแม่นที่ประเมินจากค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 88.9-112 และความเที่ยงประเมินด้วย % RSD อยู่ในช่วงร้อยละ 1.5-6.6 และ HORRAT 0.3-1.2 รายละเอียดจำแนกตามชนิดตัวอย่างและชนิดของสารที่ทดสอบ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

ชนิดตัวอย่าง	สาร	Spiked level (µg/kg)	% Recovery; Mean ± SD	% RSD	HORRAT
เนื้อไก่	AOZ	0.3	105 ± 3.0	2.9	0.5
		1	107 ± 2.8	2.6	0.5
		2	101 ± 3.7	3.7	0.7
	AMOZ	0.3	107 ± 4.3	4.0	0.8
		1	111 ± 4.5	4.1	0.8
		2	106 ± 5.6	5.3	1.0
	AHD	0.3	109 ± 4.3	4.0	0.8
		1	112 ± 3.0	2.7	0.5
		2	104 ± 3.2	3.1	0.6
	SEM	0.3	111 ± 3.5	3.2	0.6
		1	111 ± 5.7	5.1	1.0
		2	107 ± 4.1	3.9	0.7
กุ้ง	AOZ	0.3	97.9 ± 2.8	2.9	0.5
		1	111 ± 4.9	4.4	0.9
		2	106 ± 2.5	2.3	0.4
	AMOZ	0.3	104 ± 3.8	3.6	0.7
		1	112 ± 5.4	4.8	0.9
		2	105 ± 4.0	3.8	0.7
	AHD	0.3	99.7 ± 3.7	3.7	0.7
		1	105 ± 6.4	6.1	1.2
		2	95.2 ± 4.7	4.9	0.9
	SEM	0.3	102 ± 2.3	2.3	0.4
		1	106 ± 5.7	5.4	1.0
		2	100 ± 2.4	2.4	0.5
ตับหมู	AOZ	1	93.1 ± 1.8	2.0	0.4
		2	98.4 ± 4.6	4.7	0.9
	AMOZ	1	100 ± 4.1	4.1	0.8
		2	88.9 ± 5.3	6.0	1.1
	AHD	1	97.7 ± 1.4	1.5	0.3
		2	100 ± 4.0	4.0	0.8
	SEM	1	96.6 ± 6.4	6.6	1.2
		2	97.8 ± 4.2	4.4	0.8

ทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด พบแหล่งความไม่แน่นอนมาจากวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ ขั้นตอนการชั่งน้ำหนักและปรับปริมาตรสุดท้ายในการสกัดตัวอย่าง ค่าความเข้มข้นสารที่ได้จากกราฟมาตรฐาน การชั่งน้ำหนักและเจือจางสารละลายมาตรฐาน รวมทั้งความบริสุทธิ์ที่ระบุ ความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายของวิธีวิเคราะห์ AOZ มีค่าเท่ากับ ± 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับปริมาณ AOZ ที่เติมลงในตัวอย่าง 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คำนวณจากกราฟมาตรฐานได้ 0.32 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม รายงานผลปริมาณสาร AOZ กับค่าความไม่แน่นอนขยาย คือ 0.32 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด

Component	Value, x	หน่วย	Standard uncertainty, u(x)	Relative standard uncertainty, u(x)	สัดส่วนความไม่แน่นอน (%)
1. Sample					
- Weight	1	g	0.00062	0.00062	
- Fianl vol.	0.5 (pipette)	ml	0.00088	0.00174	
				0.00187	1.31
2. C_0 read from curve	0.560	ng/ml	0.03939	0.07090	49.63
3. Standard					
- Purity	100	%	0.28	0.00280	
- Weight	0.00500	g	0.00001	0.00200	
- Dilution	100 (vol.flask)	ml	0.18257	0.00182	
	1 (pipette)	ml	0.00174	0.00174	
	50 (vol.flask)	ml	0.09327	0.00186	
	1 (pipette)	ml	0.00174	0.00174	
	10 (vol.flask)	ml	0.02254	0.00225	
	1 (pipette)	ml	0.00174	0.00174	
	20 (vol.flask)	ml	0.04136	0.00208	
				0.00609	4.26
4. Precision (% RSD)	1	-	0.057	0.05700	39.90
5. Bias (Recovery)	1	-	0.007	0.00700	4.90
- Combined standard uncertainty	= Uc/r			0.09146	
- Standard uncertainty (Uc)	= 0.09146 × 0.32 µg/kg			0.029 µg/kg	
- Expanded uncertainty (U), k = 2	= 2 × 0.029 µg/kg			0.058 µg/kg	
ปริมาณ AOZ (µg/kg) = 0.32 ± 0.06					

ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554 สำรวจปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตของเขตกรุงเทพมหานคร รวมทั้งสิ้น 402 ตัวอย่าง ไม่พบการตกค้างของยากลุ่มนี้ในเนื้อไก่กับเครื่องใน พบอัตราการตกค้างของ AOZ ในเนื้อหมูร้อยละ 5.5 เครื่องในหมูร้อยละ 6.7 และ SEM ในกุ้งร้อยละ 4.2 แสดงรายละเอียดชนิดและร้อยละของตัวอย่างที่ตรวจพบ (≥ ค่า LOD) และที่เกินมาตรฐาน (≥ ค่า MRPLs ของ อย.) ชนิดและช่วงปริมาณของสารที่ตกค้างแยกตามปี (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การสำรวจปริมาณไนโตรฟูแรนในเนื้อสัตว์ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554

ปี พ.ศ.	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)			ชนิดที่พบ	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)		
		วิเคราะห์	ตรวจพบ	เกินมาตรฐาน		ช่วง	ค่าเฉลี่ย	ค่ามัธยฐาน
2551	กุ้ง	38 (100)	11 (28.9)	7 (18.4)	SEM	<0.3 - 2.3	1.2	1.2
	เนื้อหมู	42 (100)	8 (19)	6 (14.3)	AOZ	0.18-6.7	2.1	0.93
	เครื่องในหมู	25 (100)	10 (40)	9 (36)	AOZ	<0.2-10	4.4	3.6
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	52 (100)	-	-	-	-	-	-
	รวม	157 (100)	29 (18.5)	22 (14.0)				
2552	กุ้ง	5 (100)	1 (20)	1 (20)	SEM	1.8	1.8	1.8
	เนื้อหมู	12 (100)	4 (25)	4 (25)	AOZ	0.41-32	13.4	10.6
	เครื่องในหมู	28 (100)	11 (39.3)	9 (32.1)	AOZ	<0.2-30	5.7	3.5
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	24 (100)	-	-	-	-	-	-
	รวม	69 (100)	16 (23.2)	14 (20.3)				
2553	กุ้ง	40 (100)	5 (12.5)	4 (10)	SEM	<0.3-1.7	1.0	1.0
	เนื้อหมู	33 (100)	6 (18.2)	3 (9.1)	AOZ	<0.1-14	5.6	4.1
	เครื่องในหมู	1 (100)	-	-	-	-	-	-
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	37 (100)	-	-	-	-	-	-
	รวม	111 (100)	11 (9.9)	7 (6.3)				
2554	กุ้ง	10 (100)	-	-	-	-	-	-
	เนื้อหมู	20 (100)	4 (15)	4 (15)	AOZ	0.72-44.5	14.4	2.4
	เครื่องในหมู	9 (100)	6 (66.7)	6 (66.7)	AOZ	0.47-13.5	4.9	2.6
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	26 (100)	-	-	-	-	-	-
	รวม	65 (100)	10 (15.4)	10 (15.4)				
รวม	กุ้ง	93 (23.1)	17 (4.2)	12 (3.0)	-	-	-	-
	เนื้อหมู	107 (26.6)	22 (5.5)	17 (4.2)	-	-	-	-
	เครื่องในหมู	63 (15.7)	27 (6.7)	24 (6.0)	-	-	-	-
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	139 (34.6)	-	-	-	-	-	-
	รวม	402 (100)	66 (16.4)	53 (13.2)				

วิจารณ์

ในการทดสอบมีการเติมสาร internal standard (ISTD) ซึ่งเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีจะใช้สารที่มีโครงสร้างสารเหมือนสารมาตรฐาน แต่มีมวลโมเลกุลมากกว่าจากการแทนที่บางอะตอมด้วยสารที่เป็นไอโซโทป ได้แก่ deuterium, carbon[13] และ nitrogen[15] ลงไปในตัวอย่างและสารมาตรฐานที่จะเตรียมกราฟมาตรฐานโดยเติมครบทั้ง 4 ชนิด เป็นการลดความผิดพลาดของการวิเคราะห์ เนื่องจากสารรบกวนในตัวอย่าง (matrix effect) และการสูญเสียสารที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของการสกัดตัวอย่างเพิ่มความถูกต้องของผลที่ได้ร่วมกับการใช้เทคนิค MRM (Multiple Reaction Monitoring) ที่เลือกวัดเฉพาะไอออนของสารที่สนใจคือ ค่ามวลสารต่อประจุ (mass to charge ratio; m/z) ที่ตั้งค่าไว้โดย MS ตัวที่ 1 จะให้ selected precursor ion ผ่านเข้ามา ทำให้เกิดการแตกตัว (fragmentation) และ MS ตัวที่ 2 ให้ product ions (base peak and confirmative ions) ผ่านเข้าสู่

detector เท่านั้น ทำให้ background noise จากสารรบกวนลดลง เพิ่มค่า signal to noise ของสาร ส่งผลให้สัญญาณวัดที่ระดับต่ำมีความไวดีขึ้น

การคัดเลือกตัวแทนตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าเนื้อกุ้งมีสารรบกวนที่ peak ของ SEM เมื่อเทียบสัญญาณ S/N กับ spiked sample ที่ระดับ LOD ที่ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ระดับของสารรบกวนมีค่าต่ำซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ ส่วนเนื้อไก่และตับหมูไม่พบสารรบกวนของสารที่สนใจ

การทดสอบความถูกต้องของวิธีได้ทดสอบค่า linearity and working range, LOD, LOQ, accuracy และ precision ตาม performance characteristics ที่กำหนด ค่าอยู่ในเกณฑ์สามารถนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ 0.1–2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า LOD และ LOQ ของวิธี 0.05–0.3 และ 0.1–1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ โดยมีค่า % recovery 60- 120[11] และ HORRAT น้อยกว่า 2

กรณีตัวอย่างตับหมูและเครื่องในอื่น ๆ พบว่าสารรบกวนในตัวอย่างทำให้ความไวการวัดลดลง จึงเพิ่มขั้นตอนสกัดด้วย n-hexane ในสารละลายตัวอย่าง พบว่าช่วยเพิ่มความไวการวัด AMOZ ซึ่งออกมาเป็น peak สุดท้าย แต่ไม่มีผลต่อสารตัวอื่น ๆ ดังนั้นค่า LOD และ LOQ ของเครื่องในสัตว์จึงสูงกว่าตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์ แต่ยังสามารถวัดได้ต่ำถึงระดับที่กำหนด ดังนั้นถ้าต้องการลดสารรบกวนและเพิ่มความไวในการวัดของวิธีวิเคราะห์จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ SPE (Solid-Phase Extraction)

ประเมินความไม่แน่นอนของการวัด พบค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ ± 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (± 18.8%) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอนขยายอยู่ในเกณฑ์ของ codex[12] (น้อยกว่าร้อยละ 44 ที่ระดับการวัด 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สัดส่วนของความไม่แน่นอนที่มีมากที่สุด ได้แก่ ค่าความเข้มข้นสารที่ได้จากกราฟมาตรฐาน คิดเป็นร้อยละ 49.63 เนื่องจากกราฟมาตรฐานได้จากการเตรียมสารมาตรฐานที่ต้องแยกเตรียมแต่ละความเข้มข้นและไม่ได้มีเนื้อตัวอย่างอยู่ จึงอาจมีผลต่อค่าความเข้มข้นที่อ่านได้ ถ้าต้องการลดความไม่แน่นอนในส่วนนี้ควรเตรียมกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve คือ มีเนื้อตัวอย่างในการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่าง เพิ่มจำนวนระดับความเข้มข้นและการทำซ้ำในแต่ละระดับของสารมาตรฐาน รองลงมาคือ ค่าความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำร้อยละ 39.90 ซึ่งลดความไม่แน่นอนได้โดยการเพิ่มจำนวนวิเคราะห์ซ้ำของตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้นำวิธีวิเคราะห์ที่ทำการทดสอบความถูกต้อง ตรวจตัวอย่างในโครงการทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing) ของ FAPAS โดยผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ มีค่า Z- score <2 ทำให้มั่นใจความถูกต้องของผลวิเคราะห์ และยืนยันชนิดของสารโดยพิจารณาค่า relative retention time อัตราส่วนระหว่าง retention time ของสารที่สนใจ กับสาร internal standard ในตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งผลทดสอบมีค่าอยู่ในเกณฑ์ร้อยละ ± 2.5 และคำนวณหาค่า % relative intensity ร้อยละของอัตราส่วนระหว่างสัญญาณที่วัดได้ของ confirmatory product ion กับสัญญาณที่วัดได้ของ quantitative product ion ในตัวอย่าง นำค่าที่ได้เทียบกับค่าที่ได้จากสารมาตรฐาน พบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ร้อยละ ± 20 (relative) และร้อยละ ± 25 (relative) เมื่อ % relative intensity ของ SEM ให้ค่ามากกว่า 50 และ AOZ, AMOZ และ AHD ให้ค่า % relative intensity มากกว่าร้อยละ 20–50 ตามลำดับ[13] บ่งชี้ได้ว่าสารที่ตรวจพบในตัวอย่างมีโครงสร้างทางเคมีเหมือนสารมาตรฐาน

สำรวจหาปริมาณตกค้างของสารไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ในเนื้อกุ้ง เนื้อไก่ เครื่องในไก่ เนื้อหมู และเครื่องในหมูที่เก็บจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ต โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ระหว่าง พ.ศ. 2551–2554 รวม 402 ตัวอย่าง จากการสำรวจไม่พบยาชนิด AHD และ AMOZ ตกค้างในตัวอย่างทุกชนิด และไม่พบการตกค้างของกลุ่มยานี้ในเนื้อกับเครื่องในของไก่ แต่พบ SEM ตกค้างในกุ้ง ระหว่าง <0.3 – 2.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 4.2 พบ AOZ ตกค้างในเนื้อหมูและเครื่องในหมู ระหว่าง <0.1–44.5 และ <0.2–30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

คิดเป็นร้อยละ 5.5 และ 6.7 ตามลำดับ จากข้อมูลที่ได้รับแจ้งจากเจ้าของแผงค้าเนื้อไก่ส่วนใหญ่ระบุแหล่งที่ซื้อมาเป็นชื่อฟาร์มเลี้ยงที่ได้การรับรองมาตรฐานจากหน่วยงานรัฐ จึงเป็นไปได้ว่ามีความปลอดภัยจากการใช้ยาจริง ส่วนกรณีของ SEM เป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติในสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง ได้แก่ ปู กั้ง และกุ้ง ซึ่งไม่ได้มาจากการใช้ nitrofurazone[14] จากการศึกษาของ van Poucke, C. และ คณะ[15] โดยเลี้ยงกุ้งแบบควบคุม ไม่มีการใช้ยา ตรวจพบ total SEM และ bound SEM ในเนื้อกุ้ง 0.76 และ < 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพบการตกค้างและค่าเกินมาตรฐานอาจต้องยืนยันการตรวจซ้ำด้วยชนิด bound SEM ซึ่งตรวจหาโดยเพิ่มขั้นตอนการล้าง free metabolites ออกจากตัวอย่างด้วย methanol และน้ำ ก่อนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด[16] ซึ่งค่าที่พบจะน้อยลงหรืออาจต้องตรวจสอบการใช้ตัวยาที่ฟาร์มเลี้ยงโดยตรง ส่วนการตกค้างของ AOZ ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ของ furazolidone ในเนื้อหมูและเครื่องในหมู ตรวจพบระหว่างช่วงปีที่สำรวจทุกปี ทั้งตัวอย่างที่ไม่เกินเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด และตัวอย่างที่สูงเกินมาตรฐานกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเฉลี่ยที่พบด้วยวิธีทางสถิติในช่วงปีสำรวจ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงถึงยังมีการใช้ furazolidone ในสัตว์ จากข้อมูลการเก็บตัวอย่างแจ้งแหล่งที่ซื้อเป็นชื่อจังหวัด ชื่อโรงฆ่าสัตว์ หรือซื้อต่อจากแผงค้าอื่นโดยไม่ระบุชื่อของแหล่งเลี้ยง ทำให้ไม่ทราบว่ามาจากฟาร์มมาตรฐานหรือไม่ ซึ่งต่างจากกรณีของเนื้อไก่ ส่วนตัวอย่างเนื้อหมูอนามัยที่มีเครื่องหมายรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารจากหน่วยงานของรัฐ ไม่พบการตกค้าง อาจเนื่องจากเป็นหมูที่เลี้ยงจากฟาร์มระบบปิดที่เน้นป้องกันโรคโดยไม่ใช้ยาและสารเคมีต้องห้าม ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้ผู้บริโภคปลอดภัย

สรุป

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ตกค้างในเนื้อสัตว์ด้วย LC-MS/MS มีความจำเพาะให้ผลการตรวจที่แม่นยำถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยมีความไวในการวัดที่ดี มีประสิทธิภาพ ตรวจหาสารที่ระดับต่ำกว่าหรือเท่ากับค่า MRPLs ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสหภาพยุโรป สามารถยืนยันชนิดของสารได้ ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานอาหาร และการที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตสินค้าปศุสัตว์และสัตว์น้ำเพื่อบริโภคที่สำคัญ หน่วยงานต่าง ๆ ที่มีหน้าที่ในการกำกับดูแลควรกำหนดแผนการติดตามอย่างต่อเนื่องและใช้มาตรการเด็ดขาดเพื่อควบคุมคุณภาพอาหารให้มีความปลอดภัยปราศจากสารตกค้างที่เป็นอันตราย เริ่มตั้งแต่การเลี้ยงสัตว์ไปจนถึงการแปรรูปสู่ผู้บริโภค เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าและสร้างภาพลักษณ์ที่ดีด้านอาหารทั้งบริโภคเองในประเทศและส่งออก ที่สำคัญคือ เกษตรกรผู้เลี้ยงควรมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้ยาและจัดระบบฟาร์มเลี้ยงที่ดีเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารต้องห้าม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณนิภาภรณ์ ลักษณ์สมยา นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำแนะนำในด้านวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

1. มาลินี ลิ้มโภคา. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ : สัตว์บกและสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์; 2541. หน้า 256-268.
2. Commission Decision 2003/181/EC 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. Off J Eur Commun 2003; L71: 17-18.

3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 299 (พ.ศ. 2549) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีบางชนิด (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 97 ง (วันที่ 18 กันยายน 2549) หน้า 6.
4. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 97 ง (วันที่ 18 กันยายน 2549) หน้า 15.
5. van Rhijn JA, Mulder PPJ. Muscle of poultry, rabbit and aquaculture products-detection and identification of residues of metabolites of furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin, and nitrofurazone-LC-MS/MS confirmatory analysis. Wageningen, The Netherlands: State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT); 2002.
6. Leitner A, Zöllner P, Lindner W. Determination of the metabolites of nitrofuran antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2001; 939(1-2): 49-58.
7. U.S. Food and Drug Administration. Detection of nitrofuran metabolites in shrimp. [online]. April 2004; [9 screens]. Available from: URL: http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm239765.htm.
8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
9. EURACHEM/CITAC Guide CG4. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. United Kingdom; 2000.
10. กัลยา วานิชย์บัญชา. การใช้ SPSS for Windows ในการวิเคราะห์ข้อมูล. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2549.
11. CAC/GL 71-2009, Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. [online]. 2009. Available from: URL: http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/
12. CAC/GL 54-2004, Guidelines on measurement uncertainty. [online]. 2004. Available from: URL: http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/.
13. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. Off J Eur Commun 2002; L221: 8-36.
14. Seafood Importers and Processors Alliance (SIPA ivzw), Press release. Illegal veterinary drug marker Semicarbazide occurs naturally in crustaceans. [online]. 2010; [2 screens]. Available from: URL: http://www.asemaquaculture.org/files/sipa/sipa_press_release.pdf.
15. van Poucke C, Detavernier C, Wille M, Kwakman J, Sorgeloos P, van Peteghem C. Natural presence of semicarbazide in laboratory grown Macrobrachium rosenbergii and other crustaceans. [online]. 2011; [22 screens]. Available from: URL: http://www.asemaquaculture.org/files/sipa/van_poucke.pdf.
16. Horne E, Cadogan A, O'Keeffe M, Hoogenboom LAP. Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high-performance liquid. Analyst 1996; 121(10): 1463-8.

Method Validation and a Survey for Total Nitrofuran Metabolites in Animal Tissues by LC-MS/MS

Malee Jaroenvitvorakul

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

ABSTRACT Nitrofurans were used effectively as medication of animals in the past. Due to the evidences of their properties as carcinogenicity and mutagenicity, Thailand and many countries revised the legislation and regulations to prohibit the drugs used in food producing animals. The European Union established the Minimum Required Performance Limits (MRPLs) of analytical method for nitrofuran metabolites namely 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) and semicarbazide (SEM) in animal products at 1.0 μg/kg. The determination method has been developed and validated. The four isotope-labelled analogues were added in the sample as internal standard. Acid hydrolysis to release the side chains of metabolites from protein-bound residues was required and metabolites were derivatised. After pH adjustment to 7.0 ± 0.5 and liquid-liquid extraction, the residues were confirmatively determined by LC-MS/MS. The method validation showed the linearity of working range between 0.1-2.0 μg/kg with correlation coefficient valued 0.9860 -1.0000. The accuracy (% recovery) ranged within 88.9-112.0% and the precision was evaluated by HORRAT method and given the values lower than 2. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.05-0.3 μg/kg and 0.1-1.0 μg/kg, respectively.

The survey research on nitrofuran metabolites abuse from 402 samples of edible animal tissues, sold in the local markets and supermarkets in Bangkok was conducted during 2008-2011. The result showed that AOZ was found in pork and visceras 12.2 % and SEM in shrimp 4.2%. The amount range of AOZ and SEM were <0.1-44.5 μg/kg and <0.3-2.3 μg/kg, respectively. The detections of AOZ and SEM were not significantly different ($p>0.05$) at the survey period, indicating both of drugs were still used in animal farms. Therefore, monitoring of drug residues and strictly law enforcement are further needed.

Key words : Nitrofuran metabolites, animal tissues, LC-MS/MS