ทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สารบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอลตกค้างในเนื้อสัตว์ โดย LC-MS/MS

ลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ทดสอบความถูกต้องวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ 4 ชนิด ได้แก่ สารบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอลตกค้างในเนื้อสัตว์ ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS โดยสารกลุ่มนี้จะถูกดึงออกจากตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริคเจือจาง สกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี solid-phase extraction ด้วย mixed mode cation exchange/reverse phase (MCX) จากนั้นตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค electrospray ionization mode positive วิธีดังกล่าวมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (Linear working range) เท่ากับ 0.5-10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9989, 0.9986, 0.9974 และ 0.9988 ในการวิเคราะห์สารบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล ตามลำดับ ตลอดช่วงการวิเคราะห์มีความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) แสดงโดยค่าเฉลี่ยของ %recovery และ %RSD จากการเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ที่ 5 ระดับความเข้มข้น อยู่ในช่วง 61.7-84.3% และ 8.7-14.9%, 69.1-100.7% และ 8.6-12.6%, 64.8-104.0% และ 7.8-13.9%, 88.1-104.8% และ 3.6-11.6% ตามลำดับ จากผลการทดสอบวิธีดังกล่าวมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สารบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล สารแรคโตพามีน และซาลบิวทามอล ตกค้างในเนื้อสัตว์สำหรับการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย ได้นำวิธีนี้มาตรวจตัวอย่างเนื้อสุกรที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกัน คิดเป็นร้อยละ 90 ของตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด

บทนำ

สารสังเคราะห์กลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β-agonist) มีคุณสมบัติเป็นยาที่ใช้สำหรับรักษาโรคระบบทางเดินหายใจ โดยมีผลไปทำให้มีการขยายตัวของหลอดลม หลอดเลือด และกระตุ้นการเต้นของหัวใจ[1] จากการศึกษาพบว่าสารเคมีกลุ่มนี้สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารได้ โดยพบว่าจะทำให้สัตว์มีเนื้อแดงเพิ่มขึ้น[1, 2] ดังนั้นเกษตรกรจึงนำสารกลุ่มดังกล่าวมาใช้เป็นสาร Repartition agent ในการปศุสัตว์ ซึ่งเป็นการนำมาใช้อย่างผิดวัตถุประสงค์ (drug abuse)

ประเทศในกลุ่มยุโรป[3] และประเทศสหรัฐอเมริกาได้ประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้กับสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ประเทศไทยก็มีการประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้ในการเลี้ยงสัตว์เช่นเดียวกัน โดยออกมาตรการต่างๆ เพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหา อาทิ มีการออกประกาศกระทรวงพาณิชย์[4] ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์[5] เพื่อป้องกันการ

Accepted for publication, 21 December 2007

ลักลอบนำเข้าและการนำสารกลุ่มนี้มาใช้อย่างผิดวัตถุประสงค์ ทั้งมีการรณรงค์ต่อต้านการใช้ยาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมา และในปี พ.ศ. 2546 กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศฉบับที่ 269[6] เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ กำหนดให้อาหารทุกชนิดมีมาตรฐานโดยตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ และเกลือของสารและสารในกระบวนการสร้างและสลาย พร้อมกันนี้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ออกประกาศ เรื่องหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีตรวจ และห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ได้อย่างน้อยต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม[7]

การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในเบื้องต้นใช้วิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) เพราะเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว และมี limit of detection ต่ำ (0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)[8] แต่วิธีนี้เป็น screening test และ semi-quantitation method กรณีตรวจพบ และต้องการใช้ผลดำเนินการทางกฎหมายจะต้องตรวจยืนยันโดยวิธีทางโครมาโตกราฟฟิกอื่นด้วย ดังนั้นเพื่อพัฒนาขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ให้ได้ผลที่ถูกต้อง และสามารถนำไปใช้ประกอบการดำเนินการทางกฎหมาย จึงนำเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งมีความไว ความจำเพาะ และความแม่นมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยได้ทำการทดสอบความถูกต้อง และความแม่นของวิธี กับสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ 4 ชนิด ได้แก่ สารบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน brombuterol hydrochloride (ผลิตภัณฑ์ของ Witega Laboratorien Berlin, purity ≥ 99%) clenbuterol hydrochloride (ผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer, purity 98.5%) ractopamine hydrochloride (ผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer, purity 96.0%) salbutamol sulphate (DMSc Reference Standard, purity 99.2%) และ salbutamol-d3 (ผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer, purity 99.0%)

สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็น reagent grade (ยกเว้นตัวที่ระบุไว้) methanol (Burdick &Jackson, HPLC grade), acetonitrile (JT Baker, HPLC grade), hydrochloric acid, ammonium hydroxide, ammonium acetate, formic acid, glacial acetic acid, Oasis MCX 3 cc (60 mg) Extraction Cartridge (Water Corp., Part No. 186000254)

การเตรียมสารมาตรฐาน

การเตรียมสารมาตรฐาน

Stock standard solution: ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด (brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol) อย่างแม่นยำให้มีเนื้อสาร 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วย methanol ใช้เตรียม standard solution ความเข้มข้น 100 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol

Internal standard: salbutamol-d3 solution มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เตรียม internal standard solution ความเข้มข้น 100 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Sartorius LP620S), เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (Sartorius MC210S), refrigerated centrifuge (Mikro 22R), ultra terrax model T-25, vortex mixer, nitrogen evaporator temperature controlled heating box, vacuum pump and vacuum manifold processor comprising vacuum block, pH meter (Orion model 210A), เครื่องบดเนื้อ, micro pipette ขนาด 10-100 µl, 20-200 µl และ 100-1000 µl, glass funnel, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.45 µm PVDF (Alltech Cat No. 24144), ชุดกรอง mobile phase พร้อม membrane filter 0.45 µm PVDF ขนาด 47 มิลลิเมตร, HPLC vial สีชา ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย binary pump : Agilent 1100 series, autosampler : Agilent 1100 series, micro vacuum degasser : Agilent 1100 series, thermostatted column compartment: Agilent 1100 series, triple quadupole mass spectrometer: API 4000 โดยมีสภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

LC-MS/MS conditions;

- column : analytical column; Zorbax SB C-18 150 mm X 3mm, 5 µm
- mobile phase A : 0.1% formic acid in distilled water
- mobile phase B : acetonitrile
- flow rate : 0.6 ml/min
- injection volume : 10 µl
- column temperature : 25 องศาเซลเซียส

Gradient LC conditions;

time (min)	% mobile phase A	% mobile phase B
0.00	95	5
3.00	80	20
5.00	80	20
5.50	50	50
6.50	50	50
8.00	5	95
11.00	5	95
12.50	95	5
15.00	95	5

MS conditions;

- ionization mode : ESI (Turbo spray), positive mode
- scan type : MRM
- ion spray voltage : 5500 Volts
- temperature (TEM) : 500 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

MS/MS fragmentation conditions :

Component	Precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Dwell time (ms)	DP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
brombuterol	367.3 ± 0.5	212.1 ± 0.5	100	58	40	11
		293.1 ± 0.5	100	58	26	7
clenbuterol	277.2 ± 0.5	132.2 ± 0.5	100	40	39	20
		203.1 ± 0.5	100	40	24	20
ractopamine	302.3 ± 0.5	106.9 ± 0.5	100	46	45	5
		164.0 ± 0.5	100	46	23	8
salbutamol	240.3 ± 0.5	222.3 ± 0.5	100	32	15	24
		148.1 ± 0.5	100	32	26	24
salbutamol-d3	243.4 ± 0.5	151.2 ± 0.5	100	32	26	24

ตัวอย่าง

เนื้อสุกรที่ตรวจไม่พบสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ โดยวิธี ELISA (LOD เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นตัวแทนในการทดสอบวิธี และตัวอย่างเนื้อสุกรที่เคยตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างเนื้อสุกรที่ส่งมาวิเคราะห์ที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารจำนวน 25 ตัวอย่าง และเป็นตัวอย่างที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงครามส่งมาตรวจยืนยัน จำนวน 5 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบ

การเตรียมตัวอย่าง

เนื้อสุกรส่วนเนื้อแดงส่วนสะโพก น้ำหนักประมาณ 300-500 กรัม ตัดส่วนที่เป็นไขมันออกหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ส่วนที่เหลือเก็บไว้เป็น retained portion

การสกัด

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในหลอด screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม internal standard, salbutamol-d3 2.0 นาโนกรัม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เติม 0.01 M HCl 3 มิลลิลิตร นำไป homogenize ประมาณ 30 วินาที โดยแช่หลอดตัวอย่างในอ่างน้ำแข็งขณะที่ homogenize ล้างหัวปั่น homogenizer ด้วย 0.01 M HCl ประมาณ 2 มิลลิลิตร รวมใส่ในหลอดตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้นำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที และ centrifuge ที่ความเร็ว 5,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที กรองส่วนที่ใสด้วยกระดาษ glass microfibre filter ใส่ลงใน test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร

การทำให้บริสุทธิ์

เตรียม Oasis MCX Cartridge ต่อเข้ากับ vacuum manifold ปรับ flow rate ประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที activate cartridge ด้วย 5% ammonium hydroxide ใน methanol 2 มิลลิลิตร ตามด้วย methanol 2 มิลลิลิตร และ equilibrate cartridge ด้วย 10 mM ammonium acetate buffer pH 5 2 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งหมดลงใน cartridge ล้าง test tube

±

ด้วย 10 mM ammonium acetate buffer pH 5 2 มิลลิลิตร แล้วเทลงใน cartridge ตามด้วย 1 M formic acid 2 มิลลิลิตร ทิ้งสารละลายส่วนที่ผ่านออกมาจาก cartridge และปล่อยให้ cartridge แห้งในสภาวะสุญญากาศประมาณ 30 วินาที ล้าง cartridge อีกครั้งด้วย methanol 2 มิลลิลิตร จากนั้น elute cartridge ด้วย 5% ammonium hydroxide ใน methanol 2 มิลลิลิตร เก็บ eluate ที่ได้ใส่ใน test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วย nitrogen ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จนแห้ง ละลาย residue ด้วยสารละลาย 5% methanol ใน mobile phase A 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixer 30 วินาที กรองสารละลายที่ได้โดยถ่ายสารละลายใส่ micro-spin filter tube นำไป centrifuge 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ถ่ายสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เนื่องจาก matrix มีผลต่อการทดสอบ การเตรียม calibration curve ต้องใช้วิธีเติมสารมาตรฐานลงบน matrix (matrix-matched standard curve) โดยเตรียมสารมาตรฐานบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล 6 ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 และ 10.0 นาโนกรัมต่อกรัม เติม internal standard ความเข้มข้น 2.0 นาโนกรัมต่อกรัมในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละตัวที่เตรียม สร้างกราฟของสารมาตรฐาน โดย plot ระหว่างอัตราส่วนความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และความเข้มข้นของ internal standard (concentration ratio) กับอัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ peak area ของ internal standard (peak area ratio) คำนวณหาสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

การทำ Matrix-matched standard curve

ชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรที่ตรวจไม่พบสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ 1 กรัม ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตรจำนวน 6 หลอด จากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนการสกัด และการทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง (แต่ไม่เติม internal standard) นำ eluate ที่ได้ใส่ใน test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 และ 10.0 นาโนกรัม ลงในแต่ละหลอด หลอดละ 1 ความเข้มข้น จากนั้นเติม internal standard 2.0 นาโนกรัมในทั้ง 6 หลอด นำไประเหยด้วย nitrogen ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จนแห้ง ละลาย residue ด้วยสารละลาย 5% methanol ใน mobile phase A 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixer 30 วินาที กรองสารละลายที่ได้โดยถ่ายสารละลายใส่ micro-spin filter tube นำไป centrifuge 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ถ่ายสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

วิเคราะห์ method blank และ matrix blank

method blank: สกัดสารเคมีที่ใช้ทั้งหมดโดยใช้ 0.01 M HCl 5 มิลลิลิตร เติม internal standard 2.0 นาโนกรัม สกัดตามวิธีการสกัด 2 ซ้ำ ฉีด method blank เข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อดูว่ามี mass หรือ peak รบกวนหรือไม่

matrix blank: สกัดเนื้อสุกร (ที่ตรวจไม่พบสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ โดยวิธี ELISA) เติม internal standard 2.0 นาโนกรัม สกัดตามวิธีการสกัด 2 ซ้ำ ฉีด matrix blank เข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อดูว่ามี mass หรือ peak รบกวนหรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยการฉีด matrix-matched standard ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ค่า LOD (โดยประมาณ) มีค่าเท่ากับ 3 เท่าของ signal-to-noise ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล ลงในตัวอย่างเนื้อสุกร ที่ระดับ LOD และเติม internal standard 2.0 นาโนกรัม วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล ลงในตัวอย่างเนื้อสุกรที่ระดับประมาณ 3 เท่าของ LOD และเติม internal standard 2.0 นาโนกรัม วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery และค่า % RSD

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอลลงในตัวอย่างเนื้อสุกร ช่วงความเข้มข้น 0.5-10.0 นาโนกรัมต่อกรัม ที่ 5 ระดับความเข้มข้น 0.50, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 นาโนกรัมต่อกรัม เติม internal standard 2.0 นาโนกรัมต่อกรัม นำไปวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด คำนวณหาค่า r

การทดสอบความแม่นและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

ทดสอบความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐานบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล 5 ระดับในช่วง linear working range และเติม internal standard 2.0 นาโนกรัมต่อกรัม ลงในตัวอย่างวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery และ % RSD

การประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการทดสอบที่ได้จะถูกประเมิน ดังนี้ % Recovery : ช่วงที่ยอมรับได้คือ 60-120% ส่วน %RSD ค่าที่ยอมรับ น้อยกว่า 30%[11]

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Uncertainty)

การประเมินความไม่แน่นอนของการวัด[12] โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณความไม่แน่นอนขยาย โดยใช้ค่า k = 2 ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ตามวิธีที่ได้ทดสอบ

ปริมาณสารที่พบ หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (µg/kg) โดยคำนวณได้จาก

จากสมการเส้นตรง $Y = mC + b$

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

เมื่อ m คือ slope

b คือ intercept

Y คือ peak area ratio

C คือ concentration ratio

ดังนั้น ปริมาณสารที่พบ (μg/kg)

= Cx ความเข้มข้น Internal std

ผล

การวิเคราะห์ method blank ของ reagent และ matrix blank ของตัวเนื้อสุกรที่ตรวจไม่พบสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ โดยวิธี ELISA ไม่พบ peak รบกวน ส่วนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ช่วงความเข้มข้น 0.5-10.0 นาโนกรัมต่อกรัม ได้กราฟที่เป็นเส้นตรง มีค่า r เท่ากับ 0.9999, 0.9986, 0.9941 และ 0.9998 ตามลำดับ

ค่า LOD ของวิธีวิเคราะห์นี้เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการพิสูจน์ค่า LOD โดยการเติมสารมาตรฐานบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอลที่ระดับ LOD ในตัวอย่างเนื้อสุกร วิเคราะห์ 10 ซ้ำ สามารถตรวจพบทุกตัวอย่าง มีค่า signal to noise สูงกว่า 3 ในทุกตัวอย่าง ค่า LOQ ของวิธีวิเคราะห์นี้ เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับ LOQ ลงในตัวอย่างวิเคราะห์ 10 ซ้ำ พบ % Recovery และ % RSD อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ได้ค่าเฉลี่ย % Recovery ของการวิเคราะห์สารบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล เท่ากับ 84.3%, 100.7 %, 104.4% และ 104.8% ส่วน % RSD เท่ากับ 14.3, 12.6, 12.9 และ 6.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ที่ช่วงความเข้มข้น 0.5-10.0 นาโนกรัมต่อกรัม ได้กราฟเส้นตรงมีค่า r เท่ากับ 0.9989, 0.9986, 0.9974 และ 0.9988 ของบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล ตามลำดับ

การทดสอบค่าความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ มี % Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ผลค่าเฉลี่ย % Recovery อยู่ในช่วง 61.7-76.9%, 69.1-84.5 %, 64.8-81.5% และ 88.1-103.2% ตามลำดับ %RSD จากการวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ อยู่ในช่วง 8.7-14.9%, 8.6-11.9%, 7.8-13.9% และ 3.6-11.6% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นกัน รายละเอียดผลการทดสอบความแม่น และความเที่ยงในการวิเคราะห์ (ตารางที่ 1)

ทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ โดยนำการวิเคราะห์สารซาลบิวทามอลในเนื้อสุกรเป็นตัวอย่าง พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง ค่า concentration ratio, C ที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน และ Precision เมื่อได้คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย มีค่าเท่ากับ ± 10.5% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่า Relative standard uncertainty, u(x)/x, ค่า Combined standard uncertainty และ Expanded uncertainty, U (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบความแม่น และความเที่ยง ในการวิเคราะห์ brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol ในเนื้อสุกร ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระดับละ 10 ซ้ำ

สารมาตรฐาน	Spiked level (µg/kg)	% Recovery		%RSD
		Min-max	mean ± SD	
brombuterol	0.5	64.9 - 109.0	84.3 ± 12.1	14.3
	1.0	60.6 - 87.4	76.9 ± 6.7	8.7
	2.5	60.5 - 102.0	74.7 ± 11.2	14.9
	5.0	54.6 - 69.9	61.7 ± 5.3	8.7
	10.0	57.6 - 79.7	69.2 ± 7.2	10.4
clenbuterol	0.5	82.8 - 129.0	100.7 ± 12.7	12.6
	1.0	71.4 - 94.0	84.5 ± 7.4	8.7
	2.5	64.0 - 95.2	78.3 ± 9.0	11.6
	5.0	61.2 - 86.1	69.1 ± 8.2	11.9
	10.0	64.4 - 82.8	72.6 ± 6.2	8.6
ratopamine	0.5	88.0 - 132.0	104.4 ± 13.4	12.9
	1.0	70.5 - 92.9	81.5 ± 8.3	10.2
	2.5	52.3 - 84.5	67.4 ± 9.4	13.9
	5.0	58.7 - 75.0	64.8 ± 5.3	7.8
	10.0	52.6 - 75.0	65.6 ± 6.5	9.9
salbutamol	0.5	97.0 - 119.0	104.8 ± 6.3	6.0
	1.0	95.4 - 107.0	99.1 ± 3.6	3.6
	2.5	88.3 - 129.0	103.2 ± 11.6	11.6
	5.0	82.1 - 96.0	88.1 ± 5.8	6.6
	10.0	80.8 - 102.0	89.5 ± 6.4	7.1

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

Component	Value, x	Standard uncertainty, u	Relative standard uncertainty u(x)/x
1. sample weight	1 g	0.00176 g	0.00176
2. C	1.33 ng/g	0.04501 ng/g	0.03384
3. standard dilution	0.01205 g	0.00019 g	
	50 ml	0.11575 ml	
	0.25 ml	0.00065 ml	
	50 ml	0.11575 ml	
	1 ml	0.00233 ml	
	10 ml	0.02311 ml	
	1 ml	0.00233 ml	
	10 ml	0.02311 ml	
	0.2 ml	0.00055 ml	
			0.01719
4. repeatability	100%	3.63269%	0.03633
Combine standard uncertainty			0.05257
Expanded uncertainty U r; result = 1.33 µg/kg		r × 2 × 0.05257	0.140 µg/kg

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบนี้มาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสุกรที่ผ่านการตรวจสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ โดยวิธี ELISA จำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA ตรวจไม่พบ 9 ตัวอย่าง ตรวจพบ 21 ตัวอย่าง ส่วนผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS ตรวจไม่พบ 12 ตัวอย่าง และตรวจพบ 18 ตัวอย่าง โดยตรวจพบสารซาลบิวทามอล 17 ตัวอย่าง ตรวจพบทั้งสารซาลบิวทามอล และเคลนบิวเทอรอล 1 ตัวอย่าง ผลการเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA และ LC-MS/MS (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA และวิธี LC- MS/MS

วิธีวิเคราะห์	จำนวนตัวอย่าง		
	ตรวจไม่พบ	ตรวจพบ (min-max, μg/kg)	รวม
ELISA	9	21 (1.1-13.4)	30
LC-MS/MS	12	18 (0.7-45.5)	30

วิจารณ์

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ เลือกทดสอบกับสารบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล เนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นใช้วิธี ELISA ซึ่งวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง (100% cross reactivity) ต่อสาร 3 ชนิดได้แก่ บรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล และซาลบิวทามอล จึงต้องให้การตรวจยืนยันครอบคลุมสารทั้ง 3 นอกจากนี้พบว่าข้อมูลการตกค้างของสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในเนื้อสัตว์ที่ตรวจพบ ส่วนมากเป็นสารเคลนบิวเทอรอล กับซาลบิวทามอล และจากข้อมูลการนำเข้าสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในปี พ.ศ. 2544 ของกรมปศุสัตว์และสมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งประเทศไทยรายงานว่าร้อยละ 90 ของฟาร์มสุกรทั่วประเทศมีการนำเข้าสารเคลนบิวเทอรอล และสารซาลบิวทามอล เพื่อนำมาใช้เป็นสารเร่งเนื้อแดง[13] ส่วนสารแรคโตพามีนนั้นเป็นสารที่มีการผลักดันที่จะให้นำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อสัตว์ในการปศุสัตว์ มีการนำเข้าพิจารณาใน Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food, CCRVDF ซึ่งผลอยู่ใน step 4[14] ในการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ ใช้เนื้อสุกรเป็นตัวแทนของเนื้อสัตว์ โดยได้ดัดแปลงวิธีมาจากวิธีของ Williams LD. et al.[15] ซึ่งใช้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ตกค้างใน retina และตับวัว การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัด ion ของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกัน จึงมีความจำเพาะสูง และด้วย detector ชนิด tandem mass spectrometer ตรวจวัดโดยเลือก mass ถึง 2 ครั้ง คือครั้งแรกเลือก precursor ion หรือ parent ion จากนั้นใช้ก๊าซเฉื่อย เช่น ฮีเลียม อาร์กอน หรือไนโตรเจน วิ่งเข้าชนทำให้เกิด fragmentation ได้ product ion หรือ daughter ion เลือก product ion 2-3 ion ที่มี response สูงและไม่มีสารใดรบกวนในการวิเคราะห์ สารบรอมบิวเทอรอล เลือก m/z 367.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 212.1 กับ 293.1 เคลนบิวเทอรอล เลือก m/z 277.2 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 132.2 กับ 203.1 สารแรคโตพามีน เลือก m/z 302.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 106.9 กับ 164.0 ส่วนสารซาลบิวทามอล ใช้ m/z 240.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 222.3 กับ 148.1 โดยใช้ m/z 293.1, 203.1, 164.0 และ 148.1 ในการคำนวณปริมาณสารทั้ง 4 ชนิดตามลำดับ นอกจากนี้มีการนำสาร stable isotope, salbutamol-d3 มาใช้เป็น Internal standard ใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์ ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพ และปริมาณได้

แม้ว่าเทคนิค LC-MS/MS จะมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity)

สูงแต่เนื่องจากสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์เป็นสารที่ไม่ให้มีการตกค้าง (zero tolerance) คือจะต้องตรวจไม่พบ และประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้กำหนดให้ใช้วิธีตรวจและห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ได้ในปริมาณต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม[7] ซึ่งวิธีที่ได้ทดสอบนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของ อย. ได้ คือมีค่า LOD เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งต่ำกว่าข้อกำหนดของ อย. นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ยังได้กำหนดการควบคุมคุณภาพเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องได้แก่ การเลือก identification points และกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities ตามที่ European Communities, EC กำหนด[16] ดังนั้นวิธีที่ได้ทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมในการใช้วิเคราะห์ ใช้เป็นวิธีตรวจยืนยันสารตกค้างดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ และใช้ประกอบในการดำเนินการทางกฎหมายได้

เมื่อพิจารณาความสมเหตุผลของค่าความไม่แน่นอนโดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ค่าความไม่แน่นอนที่ควรเป็นเท่ากับ predicted Horwitz's RSDr × 2[10] เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่ควรเป็น จะเท่ากับ 42.2% สรุปได้ว่าค่าความไม่แน่นอนที่คำนวณในการทดสอบนี้มีค่าสมเหตุผล

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบนี้วิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสุกรที่เคยวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ด้วยวิธี ELISA จำนวน 30 ตัวอย่าง ผลตัวอย่างที่ตรวจไม่พบโดยวิธี ELISA วิธี LC-MS/MS ก็ตรวจไม่พบเช่นเดียวกัน ส่วนตัวอย่างที่ตรวจพบทั้งสองวิธีจะให้ผลไม่ตรงกัน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10 ของตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด โดยผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ตรวจพบ 21 ตัวอย่าง แต่โดยวิธี LC-MS/MS ตรวจพบ 18 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อพิจารณาข้อจำกัดของวิธี LC-MS/MS ที่ได้ทดสอบ คือสามารถวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ได้ 4 ชนิด ในขณะที่วิธี ELISA สามารถวิเคราะห์ครอบคลุมสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ถึง 12 ชนิด แต่อย่างไรก็ตามวิธี LC-MS/MS ที่ได้ทดสอบนี้สามารถวิเคราะห์ครอบคลุมสารที่มี 100% cross reactivity โดยวิธี ELISA ได้ทั้งหมด และจากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าวิธี LC-MS/MS ที่ได้ทดสอบนี้เป็นวิธีที่มีความไวความจำเพาะ สามารถวิเคราะห์ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ สามารถบ่งชี้ชนิดของสารที่ตรวจพบได้ และเป็นที่ยอมรับของสากล ดังนั้นในกรณีตรวจพบสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์โดยวิธี ELISA และต้องการใช้ผลในการดำเนินการทางกฎหมาย จึงจำเป็นต้องตรวจยืนยันด้วยวิธี LC-MS/MS

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์สารบรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวทามอล โดยใช้ LC-MS/MS ที่ได้ทดสอบ เมื่อได้ทดสอบประสิทธิภาพของวิธี พบว่ามีประสิทธิภาพดีและใช้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ได้ โดยมีค่าความแม่น และความเที่ยงของวิธีอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวิเคราะห์สาร 4 ชนิดได้ในคราวเดียวกัน ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในอันที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล และควบคุมคุณภาพตามกฎหมายได้

เอกสารอ้างอิง

1. สุพล เลื่องยศลือชากุล การใช้สารกลุ่ม Phenethanolamine ปรับปรุงคุณภาพซากในสุกรประโยชน์และอันตราย รายงานวิจัย การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์

ครั้งที่ 18 สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. 4-6 พฤศจิกายน 2534 โรงแรมเอเชีย. กรุงเทพฯ.

2. Warriss PD, Kestin SC, Rolph TP, Brown SN. The effects of the beta-agonist salbutamol on meat quality in pig. J Anim Sci 1990; 68 : 128-36.
3. Council Directive 96/22/EC on the prohibition of the use of certain substances having a hormonal and thyreostatic action and β-agonists in animal husbandry. Off J Eur Com (1996) L125.
4. ประกาศกระทรวงพาณิชย์ ฉบับประกาศทั่วไป (พ.ศ. 2545) เรื่อง การนำสารอัลบิวเตอรอล (albuterol) หรือซัลบิวตามอล (salbutamol) เข้ามาในราชอาณาจักร พ.ศ. 2545 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 119 ตอนพิเศษ 33 ง (ลงวันที่ 5 เมษายน 2545) หน้า 15-6
5. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ฉบับประกาศทั่วไป (พ.ศ. 2542) เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของอาหารสัตว์ที่ไม่อนุญาตให้นำเข้ามาเพื่อขายและกำหนดชื่อประเภทชนิดลักษณะคุณสมบัติและส่วนประกอบของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ พ.ศ. 2542 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 116 ตอนพิเศษ 41 ง. (ลงวันที่ 15 มิถุนายน 2542) หน้า 20
6. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 269 (พ.ศ. 2546) เรื่อง มาตรฐานที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 120 ตอนพิเศษ 47ง (ลงวันที่ 23 เมษายน 2546) หน้า 12
7. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 120 ตอนพิเศษ 50ง (ลงวันที่ 24 เมษายน พ.ศ. 2546) หน้า 28
8. เอกสารคู่มือ β-agonists-EIA, A microtiter plate based competitive enzyme immunoassay for analysis and screening of urine, faeces, feed, bile, tissue, plasma, hair and choroid/retina samples. 5061BAG1p[17]05.03 Amhem (Netherlands) : Euro-Diagnostica B.V.
9. EURACHEM Guide. The fitness for purpose of analytical method; A laboratory guide to method validation and related topics (UK) : 1998; 61 : 5-24.
10. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว : 2549. (ISBN : 974-7549-97-2)
11. Fajgelj A, Ambrus A, editors. Principles and practices of method validation. Cornwell (UK) : MPG Books Ltd; 2000. p. 185.
12. EURACHEM/CITAC Guide CG4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2 nd. 2000
13. สุดชฎา ศรประสิทธิ์. ผลกระทบของความร้อนต่อปริมาณสารซาลบูทามอลตกค้างในเนื้อหมูดิบ. ว กรมวิทย พ 2548; 47(4): 266
14. United States Department of Agriculture. Report of the U.S. Delegate, 15 th. Session, Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food, October 26-29, 2004, Alexandria VA. [cite 2007 Jan 4] ; [6 screens]. Available at : URL : http://www. Fsis.usda.gov/regulations_&_policies/Delegate_report_15CCRVDF/index.asp
15. Williams LD, Churchwell MI, Doerge DR. Multiresidue Confirmation of β-agonists in bovine retina and liver using LC-ES/MS/MS. J Chromatography B 2004; 813 : 35-45.
16. European Commission Decision 2002/657/EC. The performance of analytical method and the interpretation of results. Off J Eur Commun 2002 : L221/16-17. (Council Directive 96/23/EC)

Method Validation of Brombuterol, Clenbuterol, Ractopamine and Salbutamol Residues in Animal Tissue Using LC-MS/MS

Ladda Kaewklapanyacharoen

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

ABSTRACT A simultaneous determination of brombuterol, clenbuterol, ractopamine and salbutamol residues in animal tissue using LC-MS/MS was validated. The meat sample was digested by dilute hydrochloric acid, extracted and cleaned up on solid phase extraction mixed mode cation exchange/reverse phase (MCX mode), followed by determination of residues by liquid chromatograph tandem mass spectometry using electrospray ionization in positive ion mode. The result showed that the limit of detection (LOD) was 0.3 µg/kg and limit of quantitation (LOQ) was 0.5 µg/kg. The linear working range for brombuterol, clenbuterol, ractopamine and salbutamol was 0.5-10.0 µg/kg with the correlation coefficient 0.9989, 0.9986, 0.9974 and 0.9988, respectively. Accuracy of the method was shown by mean % recovery of spiking standard to sample matrix at 5 different levels within linear working range were 61.7-84.3, 69.1-100.7, 64.8-104.4 and 88.1-104.8 for brombuterol, clenbuterol, ractopamine and salbutamol, respectively. Precision was shown by relative standard deviation percentage (%RSD) were 8.7-14.9, 8.6-12.6, 7.8-13.9 and 3.6-11.6 for brombuterol, clenbuterol, ractopamine and sabutamol, respectively. Validation data proved that this method could be used for determining brombuterol, clenbuterol, ractopamine and salbutamol in animal tissues for food quality control by law. This method was used to analysed 30 samples of pork that had been analysed by ELISA method. It showed that both methods gave the equivalent results for 90% of the total samples.

Key word : brombuterol, clenbuterol, ractopamine, salbutamol, animal tissue, LC-MS/MS