

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลการตรวจสอบ กลุ่ม Nitroimidazole 7 ชนิดในเนื้อไก่โดยเทคนิค LC-MS/MS

สายนต์ ย้อยดำ^{1*} สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์²

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อ.ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช 80110

² สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ : 075-770008-9 E-mail : s.yoidam@hotmail.com

บทคัดย่อ

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS เพื่อยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างกลุ่ม nitroimidazole 7 ชนิด ได้แก่ metronidazole (MNZ), ipronidazole (IPZ), dimetridazole (DMZ), ronidazole (RNZ), IPZ-OH, HMMNI และ MNZ-OH โดยใช้ diethyl ether เป็นสารสกัด ระเหยให้แห้งแล้วละลายด้วยสารผสมระหว่างน้ำและ acetonitrile อัตราส่วน 1:1 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเทคนิค LC โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมระหว่างน้ำและ acetonitrile ตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของสารกลุ่มนี้ด้วยเทคนิค electrospray ionization (ESI) ได้ผลดังนี้ ค่าร้อยละของการได้กลับคืนเฉลี่ย (mean recovery value) ของ MNZ, IPZ, IPZ-OH, DMZ ที่ช่วงความเข้มข้น 1-3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม เท่ากับ 100.0, 99.6, 101.1, 103.2 และของ MNZ-OH, RNZ, HMMNI ที่ช่วงความเข้มข้น 2-6 ไมโครกรัม/กิโลกรัม เท่ากับ 96.7, 100.1, 97.4 ตามลำดับ ค่าการกระจายในรูปแบบค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (within laboratory reproducibility, %CV) ของ MNZ, MNZ-OH, IPZ, IPZ-OH, RNZ, DMZ, HMMNI ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 8.0, 10.5, 23.1, 10.3, 6.8, 9.3, 17.4 ตามลำดับ ค่า decision limit (CC α) และค่า detection capability (CC β) สำหรับ MNZ, MNZ-OH, IPZ, IPZ-OH, RNZ, DMZ, HMMNI เท่ากับ 1.19, 2.48, 1.52, 1.24, 2.32, 1.22, 2.79 และ 1.32, 2.81, 1.89, 1.40, 2.55, 1.37, 3.34 ไมโครกรัม/กิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษานี้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ตามมาตรฐานสหภาพยุโรป (European Commission Decision 2002/657/EC) ทุกพารามิเตอร์ เป็นการพิสูจน์ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้ตรวจยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างกลุ่ม nitroimidazole และ เมตาโบไลต์ 7 ชนิดดังกล่าวได้

คำสำคัญ : method validation สารตกค้างกลุ่ม nitroimidazole LC-MS/MS เนื้อไก่

บทนำ

สารกลุ่ม nitroimidazole ได้แก่ metronidazole (MNZ), ipronidazole (IPZ), dimetridazole (DMZ), ronidazole (RNZ) รวมทั้งเมตาโบไลต์ของสารกลุ่มนี้ ได้แก่ 1-methyl-2-(2'-hydroxyisopropyl)-5-nitroimidazole(IPZ-OH), 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI) และ 1-(2-hydroxyethyl)-2-hydroxy-methyl-5-nitroimidazole (MNZ-OH) สารกลุ่มนี้ถ้าถูกแสงแดดโดยตรงจะไม่เสถียร มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อปรสิตซึ่งนำมาใช้ป้องกันและควบคุมโรค Histomoniasis และ Coccidiosis ในสัตว์ปีกและใช้รักษาโรค Trichomoniasis ในโค กระบือ (Martin J. et al., 1998) ปัจจุบันสารกลุ่ม nitroimidazole จัดเป็นกลุ่มที่ห้ามใช้ผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์ที่นำมาใช้เพื่อการบริโภค (กรมปศุสัตว์, 2545) และต้องขออนุญาตในการนำเข้า ตามประกาศกระทรวงพาณิชย์ เรื่องการนำเข้าเภสัชเคมีภัณฑ์ เกลือของเภสัชเคมีภัณฑ์ และเภสัชเคมีภัณฑ์ที่สำเร็จรูปเข้ามาในราชอาณาจักร พ.ศ. 2545 ยากลุ่มนี้เป็นที่สงสัยและมีข้อมูลไม่เพียงพอว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic agent) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagenic agent) หรือไม่ อย่างไรก็ตามในวงการแพทย์ใช้ metronidazole หรือชื่อทางการค้า Flagyl และ Servizol ในการรักษาโรคติดเชื้อปรสิต โรคติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม anaerobe ผลข้างเคียงที่สำคัญของ metronidazole คือทำให้เกิดคลื่นไส้ ปวดศีรษะ ลึนรับรสเปลี่ยนไป มีฤทธิ์คล้ายยา disulfiram ซึ่งเป็นยารักษาโรคพิษสุราเรื้อรังทำให้ผู้รับประทานยามีอาการอาเจียนรุนแรงหลังการดื่มสุรา (สุกิจ, 2008) ยังไม่มีการกำหนดค่ามาตรฐานสารตกค้างสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (maximum residue limit) ดังนั้นมาตรฐานของสารกลุ่มนี้คือต้องไม่พบการตกค้างของสารเลย (zero tolerance) การตกค้างในอาหารสัตว์อาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคและกระทบต่อการส่งออก ดังนั้นวิธีวิเคราะห์จึงต้องถูกต้องแม่นยำสูงและสามารถตรวจระบุได้ทั้งชนิดและปริมาณที่ต่ำมากๆ วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) เป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยอาศัยการแยกด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) แล้วตรวจวัดมวลต่อประจุ (m/z) ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด triple quadrupole mass spectrometry (MS/MS) ใน positive mode โดยสแกนแบบ multiple reaction monitoring (MRM) โดยที่เครื่องวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ชุดที่ 1 คัดแยกมวลสารเฉพาะของ precursor ion ที่ต้องการ และเครื่องแยกมวลชุดที่ 2 คัดแยกมวลสารของ product ion หรือ daughter ion ที่ได้จากการแตกตัวของ precursor ion ตามแนวทางของสหภาพยุโรป (European commission decision 2002/657/EC)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ในการตรวจสอบสารตกค้างกลุ่ม nitroimidazole และเมตาโบไลต์ รวม 7 ชนิด ดังกล่าวข้างต้นด้วยการตรวจในครั้งเดียว และประยุกต์ใช้ diethyl ether เป็นสารละลายในการสกัด โดยพารามิเตอร์ที่ศึกษาได้แก่ ระดับความเข้มข้นสำหรับตัดสินใจได้ว่าตรวจพบสารที่ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ α (α -error) (decision limit, critical concentration at α -error หรือ CC α) และระดับความเข้มข้นที่มีความถูกต้องของปริมาณของสารที่ตรวจ

พบได้ถึงความคลาดเคลื่อนทางสถิติ β (β -error) (detection capability, critical concentration at β -error หรือ CC β) ซึ่งในกรณีสารกลุ่ม nitroimidazole เป็นสารห้ามใช้ α -error เท่ากับร้อยละ 1 และ β -error เท่ากับร้อยละ 5 ความถูกต้อง (accuracy หรือ % recovery) ค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายตัว (coefficient of variation: %CV) ของ repeatability และ within laboratory reproducibility ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งานได้ และคงความเป็นเส้นตรงของ calibration curve

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร, beaker ขนาด 25, 50, 250 มิลลิลิตร, volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 มิลลิลิตร, กระบอกตวงขนาด 10 และ 1,000 มิลลิลิตร, lab. bottle 1 ลิตร, pasture pipette, nylon filter pore size 0.45 ไมครอน, syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร, microvial พร้อมฝาขนาด 2 มิลลิลิตร, ชุดกรอง mobile phase พร้อม vacuum pump

เครื่องมือ

เครื่องมือทั่วไป

เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, food blender, homogenizer, vortex mixer, micropipette 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร, centrifuge, ultrasonic bath, nitrogen evaporator

เครื่องมือวิเคราะห์

liquid chromatography (shimadzu รุ่น 20 A) อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ แสดงในตารางที่ 1 และ mass spectrometry (applied biosystem รุ่น API 4000) parameters และค่า retention time โดยประมาณของสาร แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ (A:B) ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	อัตราการใช้ (มิลลิลิตร/นาทีก)	% เฟสเคลื่อนที่ A (deionized water)	% เฟสเคลื่อนที่ B (acetonitrile)
เริ่ม	0.6	90	10
4.0	0.6	70	30
6.0	0.6	60	40
8.0 – 10.4	0.6	0	100
10.6 – 13.0	0.6	90	10

สารเคมี

สารที่วิเคราะห์ 7 ชนิด ได้แก่

metronidazole (MNZ), ipronidazole (IPZ), dimetridazole (DMZ), ronidazole (RNZ), MNZ-OH, IPZ-OH, HMMNI

สาร Internal Standard 6 ชนิด ได้แก่

deuterated metronidazole (MNZ-D3), deuterated ipronidazole (IPZ-D3), deuterated dimetridazole (DMZ-D3), Deuterated ronidazole (RNZ-D3), deuterated IPZ-OH (IPZOH-D3), deuterated HMMNI (HMMNI-D3)

สารเคมีที่ใช้สกัด

diethyl ether (AR grade), acetonitrile (HPLC grade), exane (AR grade), deionized water

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

เนื้อไก่ที่ได้จากการทดสอบแล้วปลอดสารกลุ่ม nitroimidazole ประมาณ 500 กรัม บดรวมกันให้ละเอียดด้วย food blender ซึ่งใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 4 กรัม จำนวน 3 ชุดการทดสอบ ชุดละ 28 หลอด

ตารางที่ 2 parameters ของ mass spectrometry และค่า retention time โดยประมาณของสาร

สาร	retention time (นาที)	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	DP (volts)	collision energy (eV)	CXP	Internal standard
DMZ	7.14	142.15	81.10	40	37	4	DMZ-D3
			95.95	40	24	5	
DMZ-D3	7.14	145.15	99.10	41	23	6	-
MNZ	5.60	172.25	82.15	35	36	4	MNZ-D3
			128.05	35	19	7	
MNZ-D3	5.60	175.25	131.20	31	21	8	-
MNZ-OH	4.65	188.30	122.95	36	21	8	MNZ-D3
			125.95	36	18	8	
RNZ	5.80	201.23	55.16	20	37	2	RNZ-D3
			140.10	20	19	8	
RNZ-D3	5.80	204.23	143.10	16	17	8	-
HMMNI	5.40	158.26	55.10	31	31	2	HMMNI-D3
			140.10	31	17	8	
HMMNI-D3	5.40	161.30	143.10	31	19	10	-
IPZ	9.39	170.25	109.20	41	35	6	IPZ-D3
			124.10	41	25	8	
IPZ-D3	9.39	173.25	127.15	31	27	8	-
IPZ-OH	7.46	186.27	122.00	31	33	18	IPZOH-D3
			168.15	31	19	10	
IPZOH-D3	7.46	189.26	171.15	36	19	10	-

วิธีการ

วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับสร้าง matrix calibration curve

ซังเนื้อไก่บดที่ได้จากการทดสอบแล้วปลอดสารกลุ่ม nitroimidazole ใส่หลอดทดลอง 6 หลอดๆ ละ 4 กรัม แต่ละหลอดเติม Internal standard MNZ-D3, DMZ-D3 IPZ-D3, IPZOH-D3, RNZ-D3, HMMNI-D3 ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 6 เติม สารละลายมาตรฐาน MNZ, DMZ, IPZ, IPZOH, MNZOH, RNZ, HMMNI ให้ได้ความเข้มข้นแสดงในตารางที่ 3 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาที เติม diethyl ether 15 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer ที่ความเร็วสูงสุด 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10°C ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เวลา 10 นาที แยกส่วนใส (ครั้งที่ 1) ถ่ายใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีกครั้ง เก็บส่วนใส (ครั้งที่ 2) ถ่ายใส่หลอดรวมกับส่วนใสครั้งแรก ระเหยแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่ 35°C เติม hexane 1 มิลลิลิตร และ acetonitrile : deionized water (1:1) 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10°C ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เวลา 10 นาที ดูดชั้น hexane ซึ่งอยู่ชั้นบนทิ้งไป กรองสารละลายส่วนล่างด้วย nylon filter pore size 0.45 ไมครอน ใส่ vial นำเข้าเครื่องฉีดสารอัตโนมัติเพื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ต่อไป (สารกลุ่ม nitroimidazole สลายตัวง่ายเมื่อถูกแสงแดด ดังนั้นจึงต้องป้องกันการถูกแสงทุกขั้นตอน)

ตารางที่ 3 : ระดับความเข้มข้นของ matrix calibration curve

สารละลายมาตรฐาน	ความเข้มข้นของแต่ละสาร (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)					
	หลอด 1	หลอด 2	หลอด 3	หลอด 4	หลอด 5	หลอด 6
MNZ, DMZ, IPZ, IPZ-OH	0	1	2	3	4	5
RNZ, HMMNI, MNZ-OH	0	2	4	6	8	10
MNZ-D3, DMZ-D3 IPZ-D3, IPZOH-D3, RNZ-D3, HMMNI-D3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

นำเนื้อไก่ที่ซังใส่หลอดทดลองแล้ว 28 หลอด โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดๆ ละ 7 หลอด แต่ละชุดเติม Internal standard MNZ-D3, DMZ-D3 IPZ-D3, IPZOH-D3, RNZ-D3, HMMNI-D3 ให้ได้ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ชุดที่ 2, 3 และ 4 เติมสารละลายมาตรฐาน MNZ, DMZ, IPZ, IPZOH, MNZOH, RNZ, และ HMMNI แสดงในตารางที่ 4 ทำการสกัดตามวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับสร้าง matrix calibration curve ทำซ้ำทั้งชุดการทดสอบนี้ อีก 2 ชุด รวมเป็น 3 ชุดการทดสอบ

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและ Internal standard ที่เติมในตัวอย่างเพื่อการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

สารละลายมาตรฐาน	ความเข้มข้นของแต่ละสาร (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)			
	ชุดที่ 1 x 7หลอด	ชุดที่ 2 x 7หลอด	ชุดที่ 3 x 7หลอด	ชุดที่ 4 x 7หลอด
MNZ, DMZ, IPZ, IPZ-OH	0	1	2	3
RNZ, HMMNI, MNZ-OH	0	2	4	6
MNZ-D3 , DMZ-D3 IPZ-D3, IPZOH-D3, RNZ-D3, HMMNI-D3	2.5	2.5	2.5	2.5

การคำนวณ

การคำนวณปริมาณ และการยืนยันชนิดของสารโดยเทคนิค LC-MS/MS ตามแนวทาง European commission decision 2002/657/EC

1. ปริมาณของสารแต่ละชนิดคำนวณจากสมการเส้นตรงของ matrix calibration curve ที่สร้างขึ้นระหว่างแกน X และ Y

$X = \text{ความเข้มข้นระดับต่างๆของสารมาตรฐาน} / \text{ความเข้มข้นคงที่ของ Internal standard}$

$Y = \text{intensity peak ของ primary ion} / \text{intensity peak ของ Internal standard}$

2. ยืนยันปริมาณและชนิดของสารตกค้างด้วยพารามิเตอร์ ดังต่อไปนี้

2.1 ion ratio ของสารมาตรฐานแต่ละสาร = intensity peak ของ secondary ion / intensity peak ของ primary ion

2.1.1 คำนวณช่วงความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ของค่าเฉลี่ย ion ratio (ข้อ 2.1) ช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ช่วงความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ 70-110 % (European commission decision 2002/657/EC)

2.1.2 การยืนยันว่าสารที่ตรวจพบเป็นชนิดเดียวกันกับสารมาตรฐานชนิดนั้นๆโดยเปรียบเทียบค่า ion ratio ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ (ข้อ 2.1.1) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

3. retention time ของ sample และสารมาตรฐานต้องตรงกันหรืออยู่ในเกณฑ์ไม่เกินร้อยละ 2.5 ของ retention time ของสารมาตรฐาน

การคำนวณปริมาณ $CC\alpha$ และ $CC\beta$

$CC\alpha$ (decision Limit) = ค่าความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่ spike (A) + (2.33 x SD ของ A)

$CC\beta$ (detection Capacity) = $CC\alpha$ + (1.64 x SD ของ A)

เกณฑ์การยอมรับค่าพารามิเตอร์ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทาง European Commission Decision 2002/657/EC

1. accuracy วิเคราะห์จากค่า % recovery of spike sample ของสารมาตรฐานที่ระดับ 1-10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ต้องอยู่ในช่วง 70-110 %
2. precision วิเคราะห์จากค่า repeatability (CV_r , %) และ reproducibility (CV_{wlr} , %) ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์
มาตรฐานในช่วงความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม แต่หากเป็นไปได้ควรมีค่าต่ำๆ ที่ระดับ 100 ไมโครกรัม / กิโลกรัม reproducibility ไม่เกิน 23 %
3. linearity (r) ต้องมากกว่า 0.995

ผลการทดลอง

ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ประเมินความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ในการตรวจสอบสารตกค้างกลุ่ม nitroimidazole และเมตาโบไลต์ในเนื้อสัตว์ ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดลอง

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ กิโลกรัม)	parameters					
		CC α ($\mu\text{g/kg}$)	CC β ($\mu\text{g/kg}$)	accuracy เฉลี่ย (%)	precision (% CV)	reproducibility (% CV)	Linearity (r)
MNZ	1, 2, 3	1.19	1.32	100.0	7.6, 8.3, 5.7	8.0, 8.3, 6.5	0.9986
DMZ	1, 2, 3	1.22	1.37	103.2	5.6, 6.5, 3.7	9.3, 8.1, 9.0	0.9980
IPZ	1, 2, 3	1.52	1.89	99.6	23.1, 7.2, 5.7	23.1, 8.8, 10.1	0.9986
IPZOH	1, 2, 3	1.24	1.40	101.1	10.3, 9.4, 10.3	10.3, 11.0, 10.3	0.9951
RNZ	2, 4, 6	2.32	2.55	100.1	4.9, 6.9, 5.9	6.8, 6.9, 7.4	0.9980
MNZOH	2, 4, 6	2.48	2.81	96.7	7.7, 8.0, 9.8	10.5, 15.6, 11.1	0.9974
HMMNI	2, 4, 6	2.79	3.34	97.4	10.4, 5.7, 5.6	17.4, 10.2, 7.8	0.9990

หมายเหตุ เกณฑ์การยอมรับ - % recovery of spike sample อยู่ในช่วง 70-110 %

- reproducibility ที่ระดับ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ไม่เกิน 23 %
- ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัมยังไม่มีเกณฑ์การยอมรับ
ที่แน่นอนแต่หากเป็นไปได้ควรมีค่า % CV ที่ต่ำๆ
- linearity (r) ต้องมากกว่า 0.995

สรุปและวิจารณ์

การวิเคราะห์เพื่อยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างกลุ่ม nitroimidazole และเมตาโบไลต์ รวม 7 ชนิด โดยวิธีการสกัดด้วย diethyl ether ขจัดไขมันด้วย hexane และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ได้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้และผลการศึกษาอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งการศึกษานี้พบว่าค่าร้อยละของการกลับคืนเฉลี่ย (% recovery) อยู่ในช่วง 96.7-103.2 และค่าการกระจายในรูปแบบค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (within laboratory reproducibility, %CV) อยู่ในช่วง 6.8-23.1 ซึ่งผลการศึกษาอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ตามมาตรฐานของสหภาพยุโรป (European Commission Decision 2002/657/EC) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Martin และคณะ (1998) ที่ได้พิสูจน์ความใช้ได้ของการวิเคราะห์ในเนื้อไก่ที่ระดับความเข้มข้น 5 µg/kg ของสารตกค้างกลุ่ม nitroimidazole และเมตาโบไลต์ รวม 3 ชนิด คือ DMZ, RNZ และ HMMNI ได้ค่าร้อยละของการกลับคืนเท่ากับ 75, 77 และ 81 ตามลำดับ ค่าการกระจายในรูปแบบค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) เท่ากับ 16.4, 11.3 และ 14 ตามลำดับ จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าในการสกัดสารกลุ่ม nitroimidazole และเมตาโบไลต์โดยวิธีการสกัดด้วย diethyl ether นั้นสามารถสกัดสารในครั้งเดียวกันได้ถึง 7 ชนิด โดยไม่ต้องผ่านการ cleanup ด้วย solid phase extraction (SPE) อีก ใช้เวลาในการสกัดน้อยและ สารละลายที่ใช้ไม่เป็นสารก่อมะเร็งซึ่งแตกต่างกับ Cannavan A. และคณะ (1997) ใช้ dichloromethane ซึ่ง สารละลายตัวนี้เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic agent) และในการสกัดได้สาร 1 ชนิด (DMZ) และใช้ silica gel cleanup Xia X และคณะ (2006) ใช้ acetonitrile ในการสกัดสารกลุ่ม nitroimidazole 4 ชนิด วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก สามารถตรวจหาสารตกค้างที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำ (1-6 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) ในเนื้อสัตว์ได้ มีความถูกต้อง เชื่อถือได้ตามมาตรฐานของประเทศคู่ค้า ซึ่งทำให้มั่นใจได้ว่าคุณภาพเนื้อสัตว์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อและผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ทุกท่านที่ช่วยงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงอย่างดี และขอขอบคุณคณะกรรมการพิจารณาผลงานที่ให้คำแนะนำและแก้ไขเอกสารผลงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2545. ยาสัตว์ตกค้าง ความปลอดภัยทางอาหารและการคุ้มครองผู้บริโภค. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. หน้า 62.
- สุกิจ รุ่งอนันต์. 2008. "Drugs Use Malaria and Amebiasis". [Online]. Available : <http://www.medicine.cmv.ac.th/dept/phamaco/sukit/malaria.pdf>. (18 August 2008)

- Cannavan A. and Kennedy DG. 1997. "Determination of dimetridazole in poultry tissues and eggs using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry". *Analyst.* : 963-966. [Online]. Available : <http://www.pubmed.gov.ncbi>. (19 August 2008)
- Daeseleire, Els., De Ruyck, H. and Renterghem, R.V. 2000. Rapid confirmatory assay for the simultaneous detection of ronidazole, metronidazole and dimetridazole in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *The royal society of chemistry. Belgium.* p.1533-1535.
- European Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, official journal of the European communities. L221/8 (2002).
- Sams, M.J., Strutt, P.R., Barnes, K. A., Damant, A.P. and Rose, M.D. 1998. Determination of dimetridazole, ronidazole and their common metabolites in poultry muscle and eggs by high performance liquid chromatography with UV detection and confirmatory analysis by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *the analyst.* p. 2549-2554.
- Xia, X., Li, X., Shen, J., Ding, S. and Jiang, H. 2006. "Determination of four nitroimidazole in poultry and swine muscle and eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry" : *J. AOAC Int.* p.94-99. [Online]. Available : <http://www.pubmed.gov.ncbi>. (19 August 2008)

Validation of liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) for a Simultaneous Detection of 7 Nitroimidazole Residues in Chicken Meat

Sayan Yoidam^{1*}

Sujittra Phongvivat²

¹ Veterinary Research and Development Centre (Southern Region), Thungsong, Nakhonsithammarat, 80110, Thailand

² Bureau of Quality Control of Livestock Products, Meuang, Pathumtani, 12000, Thailand

* Corresponding author : Tel : 075-770008-9 E-mail : s.yoidam@hotmail.com

Abstract

The determination and confirmation of 7 nitroimidazole residues metronidazole (MNZ), ipronidazole (IPZ), dimetridazole (DMZ), ronidazole (RNZ), 1-(2-hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole (MNZ-OH), 1 – Methyl-2-(2-hydroxyisopropyl)-5-nitroimidazole (IPZO), 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI) in chicken meat with simple extraction method by liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) was validated based on European Commission Decision 2002/657/EC. After samples had been extracted and the solvent evaporated the residues were reconstituted in water/acetonitrile and separated by LC using a C18 column with mobile phase of water/methanol to detect and quantify the residues by an electron spray in the positive ionization mode. The % mean recovery values were 100 for MNZ, 99.6 for IPZ, 101.1 for IPZ-OH, and 103.2 for DMZ when samples were fortified at 1-3 µg/kg, and were 96.7 for MNZ-OH, 100.1 for RNZ, and 97.4 for HMMNI when sample fortified at 2-6 µg/kg. Coefficient of variation (%CV) were 8.0 for MNZ, 10.5 for MNZ-OH, 23.1 for IPZ, 10.3 for IPZ-OH, 6.8 for RNZ, 9.3 for DMZ and 17.4 for HMMNI. The decision limit (CC α) were 1.19 for MNZ, 2.48 for MNZ-OH, 1.52 for IPZ, 1.24 for IPZ-OH, 2.32 for RNZ, 1.22 for DMZ, and 2.79 for HMMNI. The detection capability (CC β) were 1.32 for MNZ, 2.81 for MNZ-OH, 1.89 for IPZ, 1.40 for IPZ-OH, 2.55 for RNZ, 1.37 for DMZ, and 3.34 for HMMNI. The validation results were an acceptable range of European Commission Decision 2002/657/EC. Thus, this method is suitable for determination and confirmation for nitroimidazole group and their metabolite residues in chicken meat.

Keywords : method validation, nitroimidazole residues, LC-MS/MS, chicken meat