

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ในอาหาร โดย LC-MS/MS

ทองสุข ปายะนันท์ และลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในอาหาร จำนวน 4 ชนิด ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มีการใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ คือ furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin และ nitrofurazone โดยสารกลุ่มนี้จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว และตกค้างในเนื้อสัตว์ในรูปอนุพันธ์ (metabolites) ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ซึ่งกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) ประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้ เนื่องจากแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็ง การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างได้ถูกพัฒนาโดยวิธี LC-MS/MS โดยการย่อยตัวอย่างด้วยกรด hydrochloric เจือจาง เพื่อให้สารตกค้างหลุดออกจากส่วนที่จับอยู่กับโปรตีนในตัวอย่าง พร้อมทั้งทำปฏิกิริยา derivatization แล้วทำการสกัดด้วย ethyl acetate หลังจากนั้นดึงไขมันออกด้วย hexane ตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS วิธีดังกล่าวมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ของ AOZ และ AMOZ เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม AHD และ SEM เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ของ AOZ และ AMOZ เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกรัม AHD และ SEM เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linear working range) เท่ากับ 0.3-5.0 ไมโครกรัมต่อกรัม โดยมีค่า correlation coefficient ในช่วง 0.9978-0.9999 โดยมีความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วยค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วง 65-120% และความเที่ยง (precision) แสดงด้วย %RSD อยู่ในช่วง 0.1-15.2 จากการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีพบว่าเป็นไปตามหลักเกณฑ์และเงื่อนไขที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กำหนด และเกณฑ์การควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ที่ European Communities กำหนด ได้ดำเนินการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในเนื้อสัตว์ เครื่องใน สัตว์น้ำ น้ำผึ้ง นมผง ไข่ผง และแป้ง ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2556 รวมทั้งสิ้น 579 ตัวอย่าง ตรวจพบ 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.2 ตรวจพบ AOZ และ SEM ในสัตว์น้ำ 8 ตัวอย่าง ปริมาณที่ตรวจพบ น้อยกว่า 1.0 - 2.4 และ 2.2 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบ SEM ในนมผง ไข่ผง และแป้ง 5 ตัวอย่าง ปริมาณที่ตรวจพบ น้อยกว่า 1.0 - 3.5 ไมโครกรัมต่อกรัม

บทนำ

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ ประกอบด้วย ฟูราโซลิโดน (furazolidone) ฟูรัลทาโดน (furaltadone) ไนโตรฟูราโซน (nitrofurazone) และไนโตรฟูรานโทอิน (nitrofurantoin) ซึ่งเป็นยาเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial agent) ที่สังเคราะห์ขึ้นนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และโรคผิวหนังติดเชื้อในสัตว์ เช่น วัว ควาย สุกร เป็ด ไก่ ปลา และกุ้ง⁽¹⁾ ตลอดจนใช้เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียในการเลี้ยงผึ้ง สูตรโครงสร้างของสารกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยวงแหวนฟูแรนส์เกาะด้วยไนโตรกรุป เรียกว่า 5-nitro-furaldehyde มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำได้เล็กน้อย และจะถูกละลายอย่างรวดเร็วในสัตว์ กลายเป็น metabolites ซึ่งจะจับตัวตามเนื้อเยื่อต่างๆ เรียกว่า tissue-bound metabolites หรือ protein-bound metabolites ซึ่งมีความคงตัวกว่า parent drugs และจะตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ ซึ่ง metabolites ของฟูราโซลิโดน ฟูรัลทาโดน ไนโตรฟูรานโทอิน และไนโตรฟูราโซน คือ 3-amino-2-oxazolididone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ตามลำดับ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) และทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ (genotoxic) ถ้าได้รับการบริโภคในระยะเวลาอันยาวนาน เป็นผลทำให้ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา ญี่ปุ่น สิงคโปร์ และประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) ประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้กับสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร⁽²⁾ ประเทศไทยได้มีการประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้ผสมในอาหารเพื่อการเลี้ยงสัตว์เช่นกัน ปี พ.ศ. 2541 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ออกประกาศห้ามใช้สารเคมีภัณฑ์ชนิดฟูราโซลิโดนและไนโตรฟูราโซนผสมในอาหารและห้ามนำเข้าอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของสารนี้ ต่อมาในปี พ.ศ. 2542 ประกาศดังกล่าวได้รับการปรับให้ครอบคลุมสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ทั้งหมด⁽³⁾ ปี พ.ศ. 2536 กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศฉบับที่ 151 เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหาร โดยกำหนดให้อาหารทุกชนิดต้องตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์⁽⁴⁾ พร้อมกันนี้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ออกประกาศ เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีตรวจ และห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนสาร AOZ และ AMOZ ได้อย่างน้อยต่ำกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม AHD และ SEM ได้อย่างน้อยต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁵⁾

ในช่วงปี พ.ศ. 2545-2546 สหภาพยุโรปได้แจ้งผ่านระบบการเตือนภัยสำหรับอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร (Rapid Alert System for Food and Food Product, RASFF) ว่าตรวจพบยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ตกค้างในกุ้งกุลาดำแช่แข็งและเนื้อไก่แช่แข็งจากประเทศไทย จีน ไต้หวัน อินเดีย เวียดนาม เอกวาดอร์ และบราซิล และในปี พ.ศ. 2547 ถึง 2550 ยังคงตรวจพบการตกค้างของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ โดยเฉพาะ AOZ และ SEM ในอาหารประเภท กุ้ง น้ำผึ้ง ไข่ไก่ แป้ง เนื้อสัตว์บรรจุกระป๋อง และอาหารสำหรับทารก จากกลุ่มประเทศแถบเอเชีย เช่น ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย เวียดนาม จีน อินเดีย บังคลาเทศ ดังนั้นทางกลุ่มสหภาพยุโรปจึงได้ออกมาตรการควบคุมสินค้าจากประเทศดังกล่าวอย่างเข้มงวดตาม Commission Decision 2002 และ Council Directive 96/23/EC^{(6), (7), (8), (9)} โดยให้มีการตรวจสอบสารตกค้างในสินค้าดังกล่าวทุก shipment จากปัญหาดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าคุณภาพของอาหารที่ประชาชนบริโภคภายในประเทศอาจมีการตกค้างของสารกลุ่มนี้อยู่เช่นกัน

การวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ตกค้างในอาหาร โดยทั่วไปจะตรวจวัดในรูปของสารอนุพันธ์ที่จับอยู่กับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ดังนั้นจึงต้องทำการแยกสารเหล่านี้ออก โดยการย่อยสลายพันธะด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ได้สาร metabolites ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กมากยากต่อการตรวจสอบ ดังนั้นจึงต้องทำให้สารเหล่านี้อยู่ในรูปสารอนุพันธ์ที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ขึ้นโดยผ่านขบวนการ derivatization โดยสารที่นิยมใช้เป็นตัวทำให้เกิดอนุพันธ์คือ 2-NBA (2-nitrobenzaldehyde) แล้วทำให้สารบริสุทธิ์ (clean up) ซึ่งมีเทคนิคหลายรูปแบบแล้วแต่ความซับซ้อน

ของ matrix นั้นๆ เช่น การใช้ SPE cartridge, liquid-liquid partition เป็นต้น ทำให้เสียเวลาในการเตรียมตัวอย่าง และค่าใช้จ่ายสูง แล้วทำการตรวจวัดชนิดและปริมาณโดยเครื่อง UV photodiode array, ELISA, LC-MS หรือ LC-MS/MS^{(10), (11), (12), (13)} สำหรับงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างจาก McCracken RJ และ Kennedy DG⁽¹⁾ โดยทำการสกัดด้วยวิธี total residue และปรับปริมาณสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน derivatization ให้เหมาะสม เพียงพอกับสารเป้าหมายที่ต้องการเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ (derivative) เท่านั้น และทำให้สารบริสุทธิ์ด้วย hexane ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้สามารถวิเคราะห์ชนิดตัวอย่างได้หลากหลาย เช่น เนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ แป้ง นมผง ไข่ผง น้ำผึ้ง เตรียมตัวอย่างได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ

ได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) โดยใช้เนื้อกุ้ง เนื้อไก่ น้ำผึ้ง นมผง และไข่ผง เป็นตัวแทน (representative matrix) ทำการวิเคราะห์ method blank, matrix blank, limit of detection, limit of quantitation, linearity and working range, accuracy และ precision ตาม EURACHEM Guide 1998⁽¹⁴⁾ และได้เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing) กับหน่วยงานที่เชื่อถือได้ เพื่อยืนยันว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้อง เหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และเพื่อทราบสถานการณ์การตกค้าง เป็นการเฝ้าระวังความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อป้องกันและเฝ้าระวังการใช้สารเหล่านี้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

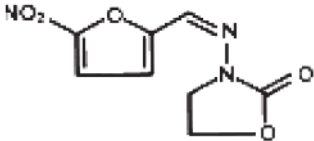
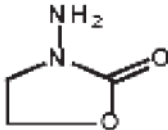
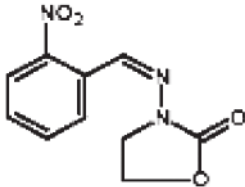
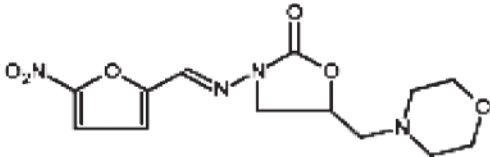
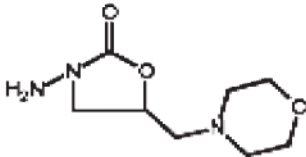
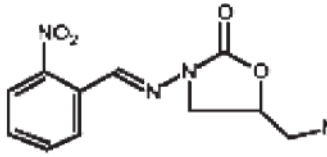
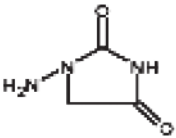
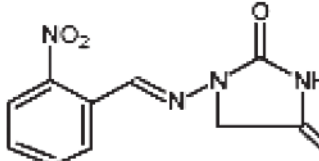
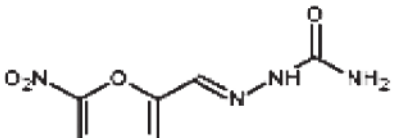
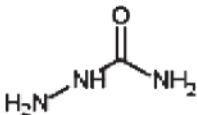
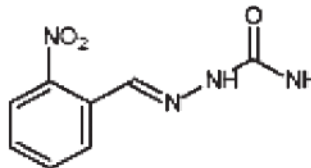
สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน : 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) (ผลิตภัณฑ์ของ Witega Laboratorien Berlin, purity > 99%), semicarbazide (SEM) (ผลิตภัณฑ์ของ CHEM SERVICE, purity 99%) และ internal standard AOZ-d4 (purity > 98%), AMOZ-d5 และ SEM-¹³C (purity > 99%) ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Witega Laboratorien Berlin

สารเคมี : methanol (MeOH), ethylacetate (C₄H₈O₂) และ hexane (C₆H₁₄) เป็น HPLC grade, 2-nitrobenzaldehyde (C₇H₅NO₃), trisodium phosphate dodecahydrate (Na₃PO₄·12H₂O), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide pellets (NaOH) และ ammonium acetate (CH₃COONH₄) เป็น AR grade (ภาพที่ 1)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, refrigerated centrifuge, vortex mixer, turbo nitrogen evaporator temperature controlled, เครื่องบดเนื้อ, micro pipette ขนาด 10-200, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.45 µm PVDF, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย binary pump, autosampler, micro vacuum degasser, thermostated column compartment: Agilent 1100 series, detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer: API 4000 และคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารคือ zorbax SB C-18 150 mm x 3 mm, 5 µm สำหรับ mobile phase ที่ใช้เป็นระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด ซึ่งตัวทำละลาย A คือ 0.5 mM CH₃COONH₄ และตัวทำละลาย B คือ methanol โปรแกรมที่ใช้ในการแยกสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ คือ gradient

Parent compound	Metabolite	Derivative
(a) furazolidone	(b) AOZ	(c) NPAOZ
		
(d) furaltadone	(e) AMOZ	(f) NPAMOZ
		
(g) nitrofurantoin	(h) AHD	(i) NPAHD
		
(j) nitrofurazone	(k) SEM	(l) NPSEM
		

ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ และอนุพันธ์ของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์

โดยใช้ flow rate 0.6 ml/min เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 15 นาที โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ดังนี้

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

สำหรับการวิเคราะห์โดย MS/MS นั้นสารจะถูกทำให้เป็นไอออนบวกโดย electrospray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย Selective Reaction Monitoring (SRM) mode โดยศึกษา mass ที่ m/z (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 MS/MS fragmentation condition

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Dwell time (ms)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
NP-AOZ	236.3 ± 0.5	104.0 ± 0.5 (secondary)	150	40	39	20
NP-AMAZ	335.2 ± 0.5	134.1 ± 0.5 (primary)	150	40	24	20
NP-AHD	249.3 ± 0.5	262.0 ± 0.5 (secondary)	150	46	45	5
NP-SEM	209.3 ± 0.5	291.3 ± 0.5 (primary)	150	46	23	8
NP-AOZ-d ₄	240.3 ± 0.5	104.0 ± 0.5 (secondary)	150	58	40	11
NP-AMAZ-d ₅	340.2 ± 0.5	134.1 ± 0.5 (primary)	150	58	26	7
NP-SEM- ¹³ C	212.2 ± 0.5	166.2 ± 0.5 (secondary)	150	32	15	24
		192.2 ± 0.5 (primary)	150	32	26	24
		134.1 ± 0.5	150	32	26	24
		296.3 ± 0.5	150	32	26	24
		168.0 ± 0.5	150	32	26	24

ตัวอย่าง

1. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี ใช้เนื้อกึ่ง เนื้อไก่ น้ำผึ้ง นมผง และไข่ผง เป็นตัวแทนของกลุ่มเนื้อสัตว์และเครื่องใน เนื้อสัตว์น้ำ น้ำผึ้ง นม ไข่ และแป้งในการทดสอบวิธี
2. การสำรวจปริมาณตกค้างในอาหาร พ.ศ. 2554 - 2556 โดยวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารรวม 579 ตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อสัตว์และเครื่องใน 190 ตัวอย่าง เนื้อสัตว์น้ำ 201 ตัวอย่าง น้ำผึ้ง 9 ตัวอย่าง นมผง 83 ตัวอย่าง ไข่ผง 36 ตัวอย่าง และแป้ง 60 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างอาหารตรวจวิเคราะห์ในปี 2554 - 2556

ปี พ.ศ.	ชนิดตัวอย่าง/จำนวนตัวอย่าง					
	เนื้อสัตว์และเครื่องใน	เนื้อสัตว์น้ำ	น้ำผึ้ง	นมผง	ไข่ผง	แป้ง
2554	16	7	5	38	8	4
2555	92	129	2	30	21	26
2556	82	65	2	15	7	30
รวม	190	201	9	83	36	60

วิธีวิเคราะห์

การสกัด (extraction)

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในที่บดละเอียด น้ำผึ้ง ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ตัวอย่างนมผง แป้ง และไข่ผง ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอด screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม internal standard, AOZ- d₄, AMOZ-d₅ และ SEM-¹³C ที่ระดับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกลิลกรัม เติม 0.2 M HCl 5 มิลลิลิตร เขย่าให้พอเข้ากัน

เติม 100 mM 2-NBA 50 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที และ incubate ที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง นำตัวอย่างตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.3 M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.5 ด้วย 2 M NaOH ปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที สกัดด้วย ethyl acetate 10 มิลลิตร และ 5 มิลลิตร ตามลำดับ โดยเขย่าด้วย shaker เบาๆ centrifuge ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดชั้น organic solvent รวมใส่ในหลอด centrifuge tube ระเหยชั้น organic solvent จนแห้ง

การทำให้สารบริสุทธิ์ (clean - up)

ละลาย residue ด้วย hexane 2 มิลลิตร และสารละลายผสมของ MeOH: 0.5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (1:1) 1 มิลลิตร สำหรับตัวอย่างเนื้อสัตว์ น้ำผึ้ง และ 500 ไมโครลิตร สำหรับตัวอย่างนมผง แบ่ง ไซ่ง จากนั้นนำไปปั่นด้วย vortex mixer วางทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้น hexane ที่เติม hexane 2 มิลลิตร สกัดซ้ำ เพื่อกำจัดไขมันอีกครั้ง ถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ micro-spin filters นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vials สีขาว นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโดยเครื่อง LC-MS/MS

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียม matrix - matched calibration curve โดยชั่ง matrix blank จำนวน 6 หลอด แล้วเติมสารมาตรฐาน AOZ, AMOZ, AHD และ SEM 6 ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เติม internal standard ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกหลอด จากนั้นทำการสกัด และทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง สร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่าง (แกน x) อัตราส่วนความเข้มข้นของสารมาตรฐานและความเข้มข้นของ internal standard (concentration ratio) กับ (แกน y) อัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ peak area ของ internal standard (peak area ratio) คำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient, r)

วิเคราะห์ method blank และ matrix blank

method blank: สกัดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาโดยใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่าง เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

matrix blank: สกัดเนื้อไก่ เนื้อหมู น้ำผึ้ง นมผง และไซ่ง ตามวิธีวิเคราะห์ เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

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

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

ทดสอบค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ปริมาณใกล้เคียงกับระดับที่ต่ำสุดของ matrix matching calibration curve เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นยืนยันค่า LOD โดยทำการทดสอบ 10 ซ้ำ ผลต้องไม่พบ false negative และต้องให้สัญญาณค่า signal/noise >3

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน ประมาณ 2 เท่าของ LOD และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % recovery, % RSD และ HORRAT

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด คำนวณหาค่า r

การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง (accuracy and precision)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงโดยเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.3, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AHD และ SEM ในช่วง linear working range และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย % recovery, % RSD และ HORRAT โดยประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์กำหนดดังนี้

ความแม่นยำ (accuracy) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วง 60 - 120⁽¹⁵⁾ ความเที่ยง (precision) เกณฑ์ยอมรับโดยใช้ HORRAT (Horwitz ratio) ที่ Codex และ EU กำหนดไว้ที่ ≤ 2 โดย HORRAT (Horwitz ratio) คำนวณจาก

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSD}_r}{\text{Predicted RSD}_r}$$

การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing)

เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) เกณฑ์ยอมรับ $|Z| \leq 2$

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽¹⁶⁾ โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ

ปริมาณสารที่พบ หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g/kg}$) โดยคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก standard curve

$$\text{โดยใช้สมการเส้นตรง} \quad Y = aX + b$$

$$\text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ, } C_A (\mu\text{g/kg}) = (Y - b) \times C_{IS} (\mu\text{g/kg}) / a$$

$$\text{โดย } X = \text{concentration ratio, } C_A (\mu\text{g/kg}) / C_{IS} (\mu\text{g/kg})$$

$$Y = \text{peak area ratio}$$

C_A	=	conc. of analyte ($\mu\text{g/kg}$)
C_{IS}	=	conc. of internal standard ($\mu\text{g/kg}$)
a	=	slope ของ calibration curve
b	=	intercept ของ calibration curve

ผล

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM ภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานดังกล่าวได้ในช่วงความเข้มข้น 0.3–5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟที่เป็นเส้นตรงมีค่า r ในช่วง 0.9978–0.9999 และเมื่อวิเคราะห์ method blank ของสารเคมีที่ใช้ทั้งหมด และ matrix blank ของตัวอย่างเนื้อกุ้ง เนื้อไก่ น้ำผึ้ง นมผง และไข่ผง ไม่พบ peak ครอบคลุมในช่วงของการตรวจวัดสารเป้าหมาย

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AHD และ SEM โดยให้สัญญาณพีคมีค่าสูงกว่า 3 เท่าของ signal to noise ในทุกตัวอย่าง ส่วนค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AHD และ SEM ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐาน วิเคราะห์ 10 ซ้ำ โดยมีค่าความแม่นยำจาก % recovery เฉลี่ยในช่วง 65–117 %, % RSD ในช่วง 0.3–10.9 และความเที่ยงจาก HORRAT ในช่วง 0.01–0.4 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ ของ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM

ชนิด ตัวอย่าง	Nitrofuran metabolites											
	AOZ (0.3 $\mu\text{g/kg}$)			AMOZ (0.3 $\mu\text{g/kg}$)			AHD (1.0 $\mu\text{g/kg}$)			SEM (1.0 $\mu\text{g/kg}$)		
	%Rec.	%RSD	HORRAT	%Rec.	%RSD	HORRAT	%Rec.	%RSD	HORRAT	%Rec.	%RSD	HORRAT
เนื้อกุ้ง	81.2	5.4	0.2	99.2	2.7	0.1	101.1	4.1	0.1	100.3	1.1	0.04
เนื้อไก่	96.7	4.4	0.1	100.3	0.3	0.01	99.9	4.8	0.1	80.6	5.8	0.2
น้ำผึ้ง	101.7	7.4	0.2	109.4	3.7	0.1	117.3	3.7	0.1	85.5	6.7	0.2
นมผง	93.4	3.7	0.1	99.1	3.8	0.1	65.1	4.7	0.2	86.0	4.5	0.2
ไข่ผง	87.8	9.8	0.1	91.3	10.7	0.2	112.4	3.8	0.1	88.3	10.9	0.4

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.3–5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟเส้นตรง มีค่า r ในช่วง 0.9825–0.9999 (ตารางที่ 4) การทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AHD และ SEM วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจาก % recovery เฉลี่ยทั้ง 4 ระดับอยู่ในช่วง 61–120% และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย %RSD และ HORRAT อยู่ในช่วง 0.1–15.2 และ 0.0–0.7 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 แสดงความเป็นเส้นตรง ที่ช่วงความเข้มข้น 0.3–5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ชนิดตัวอย่าง	r			
	AOZ	AMOE	AHD	SEM
กุ้ง	0.9999	0.9976	0.9998	0.9978
ไก่	0.9957	0.9956	0.9985	0.9841
น้ำผึ้ง	0.9978	0.9996	0.9951	0.9998
นมผง	0.9950	0.9973	0.9930	0.9848
ไข่ผง	0.9965	0.9995	0.9957	0.9825

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง ในการวิเคราะห์ AOZ, AMOE, AHD และ SEM

ชนิดตัวอย่าง	สารมาตรฐาน	Spiked level (µg/kg)	% Recovery (n=10) Min-Max	Min ± SD	%RSD	HORRAT
เนื้อกุ้ง	AOZ	0.3	72.3 – 87.0	81.2 ± 4.4	5.4	0.2
		2.0	88.5 – 100.5	97.0 ± 5.4	5.6	0.2
		5.0	84.0 – 95.6	90.4 ± 3.9	4.3	0.2
	AMOE	0.3	95.0 – 120.0	99.2 ± 2.7	2.7	0.1
		2.0	99.0 – 120.0	102.6 ± 6.2	6.1	0.2
		5.0	84.4 – 112.6	94.7 ± 8.7	9.2	0.4
	AHD	1.0	100.0 – 106.0	101.1 ± 4.1	1.8	0.1
		2.0	119.5 – 120.0	120.0 ± 0.2	0.1	0.01
		5.0	119.6 – 120.0	120.0 ± 0.1	0.1	0.0
	SEM	1.0	97.5 – 101.0	100.3 ± 1.1	1.1	0.04
		2.0	73.0 – 115.0	96.1 ± 12.7	13.2	0.5
		5.0	70.4 – 74.6	72.8 ± 1.5	2.1	0.1
เนื้อไก่	AOZ	0.3	86.7 – 100.3	96.7 ± 4.4	4.5	0.1
		2.0	71.0 – 100.0	91.3 ± 8.4	9.2	0.5
		5.0	92.8 – 112.0	100.2 ± 5.9	5.9	0.3
	AMOE	0.3	100.0 – 101.0	100.3 ± 0.3	0.3	0.01
		2.0	82.0 – 97.5	89.9 ± 5.1	5.7	0.2
		5.0	88.4 – 98.4	93.5 ± 3.2	3.4	0.10
	AHD	1.0	89.6 – 110.1	99.9 ± 4.8	4.8	0.1
		2.0	90.0 – 100.5	98.5 ± 3.7	3.7	0.1
		5.0	98.2 – 100.2	99.4 ± 0.7	0.7	0.03
	SEM	1.0	72.2 – 86.1	80.6 ± 4.7	5.8	0.2
		2.0	85.0 – 100.0	95.5 ± 6.3	6.6	0.3
		5.0	97.8 – 118.4	100.9 ± 6.2	6.2	0.04
น้ำผึ้ง	AOZ	0.3	88.3 – 109.7	101.7 ± 7.5	7.4	0.2
		2.0	88.0 – 109.0	99.8 ± 7.7	7.7	0.3
		5.0	94.6 – 108.2	101.0 ± 4.0	3.9	0.2
	AMOE	0.3	98.3 – 111.7	109.4 ± 4.1	3.7	0.1
		2.0	100.0 – 101.5	100.5 ± 0.5	0.5	0.02
		5.0	99.8 – 101.5	100.3 ± 0.5	0.3	0.02
	AHD	1.0	110.0 – 120.0	117.3 ± 4.4	3.7	0.1

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง ในการวิเคราะห์ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM (ต่อ)

ชนิดตัวอย่าง	สารมาตรฐาน	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	% Recovery (n=10) Min-Max	Min $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
นมผง	SEM	2.0	100.0 – 101.0	100.5 $\pm$ 0.4	0.4	0.02
		5.0	89.9 – 98.8	93.9 $\pm$ 3.2	3.4	0.1
		1.0	80.9 – 88.3	85.5 $\pm$ 5.7	6.7	0.2
		2.0	89.9 – 101.0	98.3 $\pm$ 4.4	4.4	0.2
		5.0	94.6 – 101.0	99.6 $\pm$ 2.2	2.2	0.1
	AOZ	0.3	85.7 – 98.3	93.4 $\pm$ 3.5	3.7	0.1
		2.0	77.5 – 100.0	91.0 $\pm$ 7.0	7.7	0.3
		5.0	85.4 – 100.4	95.6 $\pm$ 4.6	4.8	0.2
		0.3	96.7 – 104.7	99.1 $\pm$ 3.9	3.8	0.1
		2.0	97.5 – 110.0	102.0 $\pm$ 4.3	4.2	0.2
	AMOZ	5.0	80.0 – 97.4	89.1 $\pm$ 5.7	6.4	0.3
		1.0	60.8 – 69.6	65.1 $\pm$ 3.0	4.7	0.2
		2.0	89.0 – 100.5	96.8 $\pm$ 4.1	4.2	0.2
		5.0	100.0 – 120.0	112.0 $\pm$ 7.7	6.9	0.3
		1.0	81.8 – 93.6	86.0 $\pm$ 3.8	4.5	0.2
ไข่ผง	SEM	2.0	89.0 – 101.0	97.5 $\pm$ 4.0	4.1	0.2
		5.0	88.6 – 99.2	96.1 $\pm$ 3.6	3.7	0.2
	AOZ	0.3	80.0 – 103.3	87.8 $\pm$ 8.6	9.8	0.1
		2.0	100.0 – 101.0	100.3 $\pm$ 0.4	0.4	0.02
		5.0	79.0 – 100.4	95.4 $\pm$ 7.1	7.5	0.3
	AMOZ	0.3	75.3 – 111.3	91.3 $\pm$ 9.8	10.7	0.2
		2.0	98.1 – 120.0	107.2 $\pm$ 7.1	6.6	0.3
		5.0	75.8 – 102.8	94.5 $\pm$ 8.1	8.6	0.4
	AHD	1.0	103.6 – 118.6	112.4 $\pm$ 4.3	3.8	0.1
		2.0	88.5 – 99.5	94.9 $\pm$ 3.9	4.2	0.2
	SEM	5.0	76.8 – 99.4	91.0 $\pm$ 7.7	8.5	0.4
		1.0	72.7 – 108.0	88.3 $\pm$ 9.6	10.9	0.4
		2.0	70.5 – 120.0	104.4 $\pm$ 15.8	15.2	0.7
		5.0	70.4 – 90.6	77.4 $\pm$ 6.8	8.8	0.4

ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีจากการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ ในการทดสอบความชำนาญ ในตัวอย่างไข่ไก่ และเนื้อกุ้ง (FAPAS proficiency test No. 02198 และ No. 02201) พบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยในตัวอย่างไข่ไก่พบสาร AMOZ ค่า assigned value เท่ากับ 2.39 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการทดสอบ เท่ากับ 2.36 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าการประเมิน Z-Score เท่ากับ -0.1 และ ตัวอย่างเนื้อกุ้งพบสาร SEM ค่า assigned value เท่ากับ 1.72 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการทดสอบ เท่ากับ 1.01 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าการประเมิน Z-Score เท่ากับ -1.9 นอกจากนี้ยังได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญระหว่าง ห้องปฏิบัติการกับหน่วยงานภายในประเทศ ผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยได้ทำการทดสอบในตัวอย่าง เนื้อกุ้ง พบสาร AOZ, AHD และ SEM ค่า assigned value เท่ากับ 2.44, 2.19, 1.81 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการทดสอบ เท่ากับ 2.86, 2.66, 2.09 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าการประเมิน Z-Score เท่ากับ 0.78, 0.98 และ 0.70 ตามลำดับ

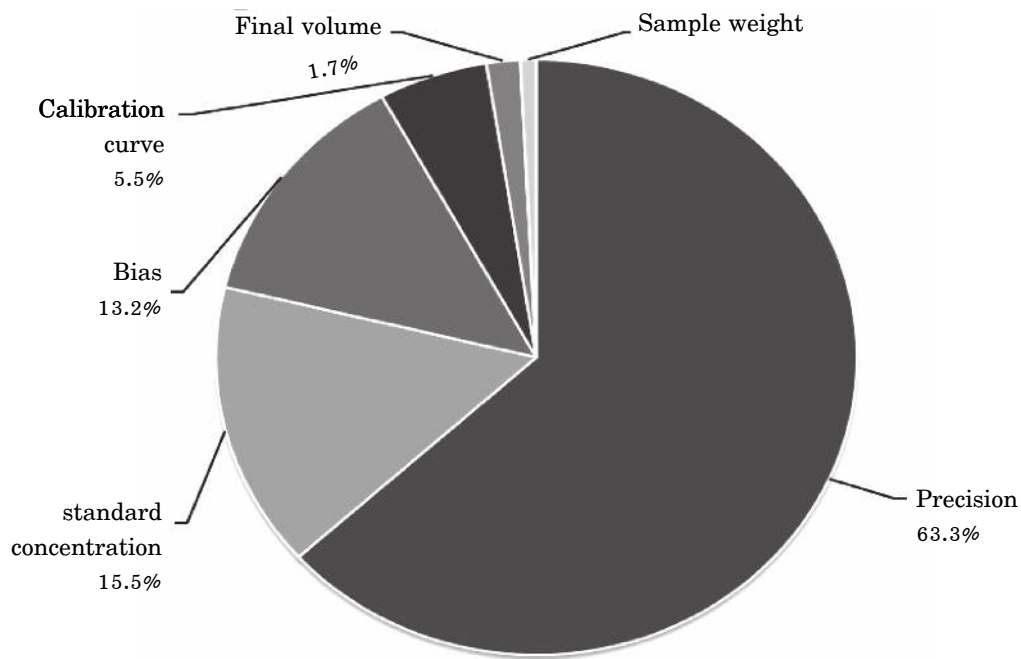
การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ โดยนำการวิเคราะห์สารฟูราโซลิโดน (AOZ) ในเนื้อกุ้งเป็นตัวอย่าง พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง ค่า concentration ratio, C ที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ bias และ precision เมื่อได้คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย มีค่าเท่ากับ $\pm 17.8\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 6 และภาพที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสารจากมากไปหาน้อย ได้แก่ ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (method precision, 63.3%) สารมาตรฐาน (15.5%), ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias, 13.2%) calibration curve (5.5%) final volume (1.7%) การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง (sample weight, 0.8%)

ตารางที่ 6 แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์

component	value, x	standard uncertainty, u	relative standard uncertainty $u(x)/x$
1. sample weight	1 g	0.00113 g	0.00113
2. final volume			
- calibration	1 ml	0.00028 ml	0.00028
- temperature	1 ml	0.00231 ml	0.00231
3. calibration curve	1.0 $\mu\text{g/kg}$	0.00737 $\mu\text{g/kg}$	0.00737
4. standard dilution			
purity	99%	0.25%	0.00252
stock std			
- calibration (balance)	0.01001 g	0.00019 g	0.01898
- calibration (vol. flask)	10 ml	0.00095 ml	0.00010
- temperature (vol. flask)	10 ml	0.02309 ml	0.00231
working std			
- calibration (micro pipette)	0.1 ml	0.00052 ml	0.0052
- calibration (vol. flask)	10 ml	0.001640 ml	0.00016
- temperature (micropipette)	0.1 ml	0.00040 ml	0.0040
- temperature (vol. flask)	10 ml	0.03999 ml	0.0040
5. precision (repeatability)	1.89 $\mu\text{g/kg}$	0.16 $\mu\text{g/kg}$	0.08466
6. bias (recovery)	96.9%	1.7%	0.01754
Combine standard uncertainty			0.08927
Standard uncertainty (u_c)	$= 0.08927 \times 1 \mu\text{g/kg}$		0.089 $\mu\text{g/kg}$
Expanded uncertainty (U), k	$= 2, 2 \times 0.08927$		0.178 $\mu\text{g/kg}$

ตารางที่ 7 การสำรวจการปนเปื้อนของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในอาหาร

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง		ชนิดและปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			
	วิเคราะห์	ตรวจพบ	AOZ	AMAZ	AHD	SEM
เนื้อสัตว์และเครื่องใน	190	0	–	–	–	–
เนื้อสัตว์น้ำ	201	8	0.4 – 2.4	–	–	2.2
น้ำผึ้ง	9	0	–	–	–	–
นมผง	83	1	–	–	–	น้อยกว่า 1.0
ไข่ผง	36	1	–	–	–	1.5
แป้ง	60	3	–	–	–	น้อยกว่า 1.0 – 3.5
รวม	579	13	0.4 – 2.4	–	–	น้อยกว่า 1.0 – 3.5



ภาพที่ 2 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในเนื้อกุ้ง

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ มาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในการสำรวจปริมาณการปนเปื้อนของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2556 โดยวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสัตว์และเครื่องใน และสัตว์น้ำที่จำหน่ายในเขตจังหวัดต่างๆ ทั่วทุกภาคในประเทศไทย รวม 96 ตัวอย่าง และตัวอย่างอาหารที่ส่งตรวจที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และภาคเอกชน รวม 483 ตัวอย่าง ซึ่งในจำนวนนี้มีตัวอย่างอาหารสินค้าถูกอายัดที่ด่านอาหารและยาเนื่องจากคุณภาพไม่ได้มาตรฐานหรือเป็นสินค้าส่งออกที่ถูกส่งกลับ จำนวน 70 ตัวอย่าง

ผลการตรวจวิเคราะห์ ตรวจพบไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในกึ่งสด 8 ตัวอย่าง แป้ง 3 ตัวอย่าง และนมผงไข่ผง อย่างละ 1 ตัวอย่าง ชนิดสารที่พบคือ AOZ และ SEM โดยในตัวอย่างกึ่งสดตรวจพบการตกค้างทั้ง AOZ และ SEM ปริมาณที่ตรวจพบ 0.4-2.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 2.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนแป้ง นมผง และไข่ผง ตรวจพบเฉพาะ SEM ปริมาณที่ตรวจพบน้อยกว่า 1.0-3.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 7)

วิจารณ์

การหาปริมาณสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ตกค้างในอาหารสามารถแสดงได้ใน 2 ลักษณะ คือ การตกค้างแบบ bound residue และ total residue โดย bound residue นั้น จะมีเทคนิคในการวิเคราะห์โดยตัวอย่างจะถูกนำมาล้างไขมันและสิ่งรบกวนออกก่อน ด้วย methanol, ethanol และ diethyl ether ตามลำดับ จากนั้น hydrolysed ด้วยกรด hydrochloric เจือจาง เพื่อให้ส่วนของ metabolite หลุดออกจากส่วนที่ bound อยู่กับโปรตีนในตัวอย่างแล้วทำการ derivatized ให้เกิดเป็นสารอนุพันธ์ของ nitrophenyl (NP) derivative ด้วย 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) และแยกออกด้วย ethyl acetate จากนั้นทำให้สารบริสุทธิ์ด้วย hexane ซึ่งการสกัดด้วยวิธีนี้จะมีขั้นตอนในการสกัดที่ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน ใช้ชนิดและปริมาณสารเคมีจำนวนมาก จำกัดเฉพาะตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์เท่านั้น

สำหรับวิธี total residue นั้น ตัวอย่างจะไม่มีกระบวนการล้างไขมันและสิ่งรบกวนออกจากตัวอย่างก่อน แต่จะนำตัวอย่างนั้นมา hydrolysed ด้วยกรด hydrochloric เจือจาง แล้วจึงทำการ derivatized ด้วย 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างอาหารที่มีไขมันต่ำ

วิธีที่พัฒนานี้ใช้เทคนิคการวิเคราะห์แบบ total residue โดยตัวอย่างจะถูก hydrolysed ด้วยกรด hydrochloric เจือจาง จากนั้นทำการ derivatized ด้วย 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) ซึ่งในขั้นตอนนี้ได้มีการปรับปริมาณของ 2-NBA ที่ใช้ให้เหมาะสม เพียงพอกับสารเป้าหมายที่ต้องการเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ (derivative) เท่านั้น เพื่อลดสิ่งรบกวนอื่น ทำให้ง่ายต่อการทำให้สารบริสุทธิ์ และทำการสกัดด้วย ethyl acetate หลังจากนั้นทำให้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วย hexane ซึ่งขั้นตอนการสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ระยะเวลาสั้น ไม่ยุ่งยาก สามารถตรวจวัดสารได้อย่างจำเพาะ วิเคราะห์หาสารตกค้างได้ครั้งละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน และครอบคลุมชนิดตัวอย่างได้หลากหลาย เช่น เนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ แป้ง ไข่ผง นมผง เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาวิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่าง bound และ total residue จะพบว่าวิธี bound residue จะมีการลดการรบกวนจาก matrix ก่อนการสกัดได้เล็กน้อย และเพื่อให้แน่ใจว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี total residue พบสารไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ มาจากตัวอย่างจริงหรือมาจากการรบกวนของ matrix ศึกษาพบว่าเมื่อนำไปใช้การสกัดแบบ bound residue ผลการทดสอบไม่มีความแตกต่าง

วิธีที่ศึกษานี้สามารถทดสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) สารทั้ง 4 ชนิดนี้มีค่า molecular masses อยู่ระหว่าง 209.3 และ 335.2 g mol⁻¹ โดยใช้เครื่อง liquid chromatograph (LC) ซึ่งมี tandem mass spectrometer

(MS/MS) เป็นตัวตรวจวัด และมีการนำสาร stable isotope, AOZ-d₄, AMOZ-d₅, SEM-¹³C เป็น internal standard ในการตรวจวิเคราะห์ สามารถชดเชยการสูญเสียหรือสลายตัวของสารที่สนใจที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และหลักการคำนวณผลจะใช้สัดส่วน (ratio) ระหว่างปริมาณสารที่สนใจกับสาร internal standard ทำให้ไม่ต้องคำนึงถึง total recovery ของวิธี ซึ่งเป็นข้อดีเหนือกว่าการคำนวณโดยใช้ external standard จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) สูง ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัด ion ของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกันจึงมีความจำเพาะสูง และเลือกใช้เทคนิค electrospray ionization (ESI) เพื่อให้เกิดการไอออไนเซชันดียิ่งขึ้นโดยการเติมสาร ammonium acetate buffer ซึ่งเป็นสาร additives ทำให้การแยกของสารที่ต้องการออกจาก matrix ได้ดียิ่งขึ้น ป้องกันการเกิด co-elute และด้วย detector ชนิด tandem mass spectrometer ตรวจวัดโดยเลือก mass ถึง 2 ครั้ง ครั้งแรกเลือก precursor ion หรือ parent ion จากนั้นใช้ก๊าซเฉื่อย รุ่งชนทำให้เกิดการ fragmentation ได้ product ion หรือ daughter ion เลือก product ion 2 ion ที่มีค่า response สูง และไม่มีสารอื่นรบกวน การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์นั้น สาร AOZ เลือก m/z 236.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 104.0 กับ 134.1 AMOZ เลือก m/z 335.2 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 262.0 กับ 291.3 AHD เลือก m/z 249.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 104.0 กับ 134.1 ส่วน SEM ใช้ m/z 209.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 166.2 กับ 192.2 ในการคำนวณปริมาณสารทั้ง 4 ชนิดตามลำดับ

เนื่องจากสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ถูกกำหนดให้เป็นสารที่ห้ามใช้ในกลุ่มสหภาพยุโรปกับสัตว์ที่นำมาบริโภคโดยเด็ดขาด และประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ กำหนดให้ใช้วิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์โดย AOZ และ AMOZ ต่ำกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม AHD และ SEM ต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งวิธีที่ได้ทดสอบนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ในการวิเคราะห์ยังได้กำหนดการควบคุมคุณภาพเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง ได้แก่ การเลือก identification point ซึ่งเป็นระบบการคิดคะแนนเพื่อยืนยันชนิดสารในการแปลผลข้อมูลโดยใช้จำนวน parent ion เริ่มต้น และ daughter ion และกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities ตามที่ European Communities, EC กำหนด⁽⁶⁾ นอกจากนี้ค่า precision ที่ได้มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ Codex และ EU กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังได้มีการวางแผนการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยกำหนดไว้ไม่เกิน 10 ตัวอย่าง โดยจะทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ spiked sample ที่ระดับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า % recovery ควรอยู่ในช่วง 60-120% และในปี 2556 วิธีตรวจวิเคราะห์นี้ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ได้ทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมในการใช้วิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์

เมื่อพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นควรน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz's $RSD_r^{(17)}$ เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็น เท่ากับ 59.7% แต่จากวิธีนี้ค่าความไม่แน่นอนที่พิจารณาจากแหล่งความไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อปริมาณสารมีค่า 17.8% ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่ควรจะเป็นประมาณ 3.4 เท่า หรือมีค่าเป็น 30% ของค่าที่ควรจะเป็น ทั้งนี้เนื่องมาจากเป็นเทคนิคการวิเคราะห์แบบ internal standard calibration โดยใช้ internal standard ใส่ลงในตัวอย่างและในสารมาตรฐานคำนวณโดยใช้สัดส่วน (ratio) ระหว่างปริมาณสารที่สนใจกับ

internal standard สามารถชดเชยการสูญเสียของสารที่สนใจที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัด ทำให้สามารถลดค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่เกิดจาก total recovery ลงได้ เช่น ค่าความไม่แน่นอนจากความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias) เป็นต้น นอกจากนี้การเลือกใช้สารมาตรฐานที่มีค่าความไม่แน่นอนของความบริสุทธิ์น้อย มีผลทำให้ค่าความไม่แน่นอนของวิธีลดลงได้เช่นกัน

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้นี้ วิเคราะห์ตัวอย่าง proficiency test เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ ในการทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกประเทศ ซึ่งพบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ($|Z| < 2$) ซึ่งการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญหรือเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการเป็นการบ่งชี้ประสิทธิภาพวิธีว่าเป็นวิธีที่ยอมรับได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ที่เข้าร่วมการทดสอบในรอบเดียวกัน ทำให้ยอมรับได้ว่าวิธีที่ได้พัฒนามีความแม่นยำเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์

สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ในตัวอย่าง จำนวนทั้งหมด 579 ตัวอย่าง พบการตกค้าง 13 ตัวอย่าง โดยพบในกุ้ง นมผง ไข่ผง และแป้ง คิดเป็นร้อยละ 2.2 โดยพบปริมาณมากกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 9 ตัวอย่าง เกินค่ามาตรฐาน สำหรับผลการตรวจพบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ในกุ้ง จากการศึกษาวิธีการเลี้ยงกุ้งพบว่า จะใช้ระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาหนาแน่น (intensive culture) มีการใช้ยาฟูราโซลิโดน และสารเคมีในระหว่างขบวนการเลี้ยง ทั้งวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรค รักษาโรค และการจัดการคุณภาพดินและน้ำปัญหาที่เกิดขึ้นกับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลแบบพัฒนาหนาแน่น คือ การเกิดโรคระบาด ทำให้เกษตรกรใช้ยาและ/หรือสารเคมีเพื่อป้องกันและรักษาโรค^{(19), (20), (21)} ส่วนตัวอย่าง นมผง ไข่ผง และแป้ง พบสาร SEM ที่ไม่ได้เกิดจากการใช้สารนี้โดยตรง แต่อาจเป็นไปได้ว่าความร้อนจากกระบวนการผลิตเป็นสาเหตุทำให้เกิดสาร SEM ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by-product) จากสาร azodicarbonamide ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง แต่จะสลายตัวที่อุณหภูมิสูง และสารนี้ยังใช้เป็นสารที่ใส่ในขบวนการผลิตแป้ง (food additive)⁽²²⁾ อีกด้วย

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM มีคุณลักษณะเฉพาะ แสดงสมรรถนะที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับและเหมาะสม มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไว และความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ เหมาะกับการใช้งาน (fitness for intended use) และให้ผลทุกพารามิเตอร์ผ่านเกณฑ์ยอมรับของสากล ทำให้ผลการทดสอบถูกต้อง เชื่อถือได้โดยการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) ซึ่งใช้เนื้อไก่ เนื้อกุ้ง น้ำผึ้ง นมผง และไข่ผง เป็นตัวแทนของกลุ่มเนื้อสัตว์และเครื่องใน เนื้อสัตว์น้ำ น้ำผึ้ง นม ไข่ และแป้ง ซึ่งเป็นตามระบบคุณภาพของ ISO/IEC 17025: 2005 และเป็นไปตามหลักเกณฑ์และเงื่อนไขของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อดำเนินคดีความ หรือเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย เพื่อความยุติธรรมทั้งแก่ผู้ประกอบการและคุ้มครองผู้บริโภคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางกนกพร อธิสุข นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญด้านมาตรฐานของอาหาร ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และตรวจทานต้นฉบับ ตลอดจนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวกรพรรณ ส่งศรี และนางสาวสิริลักษณ์ ชัยรินทร์ ที่ช่วยเตรียมและสกัดตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. McCracken RJ, Kennedy DG. Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *J Chromatogr B* 1997; 691: 87-94.
2. Valera-Tarifa NM, Plaza-Bolanos P, Romero-Gonzalez R, Martinez-Vidal JL, Garrido-Frenich A. Determination of nitrofurans metabolites in seafood by ultra high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Food Comp Anal* 2013; 30(2): 86-93.
3. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ปัญหาตกค้างในเนื้อสัตว์และแนวทางแก้ไข. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2545. หน้า 145-146.
4. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 151 (พ.ศ. 2536) เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหาร ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนพิเศษ 9ง. (ลงวันที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2537) หน้า 107.
5. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหารราชกิจจานุเบกษา เล่ม 120 ตอนพิเศษ 50ง (ลงวันที่ 24 เมษายน 2546) หน้า 28.
6. Commission Decision 2002/657/EC of implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities L* 221/8. August 2002.
7. Council Directive 96/23/EC of on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Communities L* 125/10. April 1996.
8. Regulation (EC) 178/2002 of the European Parliament and of the Council of laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities L* 31/1. January 2002
9. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report 2008. Luxembourg: European Commission; 2009.
10. Verdon E, Couedor P, Sanders P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry-in-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. *Anal Chim Acta* 2007; 586(1-2): 336-47.
11. Szilagyi S, de la Calle B. Development and validation of an analytical method for the determination of semicarbazide in fresh egg and in egg powder based on the use of liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2006; 572: 113-20.
12. Chu PS, Lopez MI. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans. *J Agric Food Chem* 2005; 53(23): 8934-9.
13. Cooper KM, Elliott CT, Kennedy DG. Detection of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), a tissue-bound metabolite of the nitrofurans furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay. *Food Addit Contam* 2004; 21(9): 841-8.
14. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical method: a laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom: LGC (Teddington) Ltd; 1998. p. 5-24.

15. Fajgelj A, Ambrus A. Principles and practices of method validation. Budapest, Hungary; 1999.
16. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A, editors. EURACHEM/CITAC Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. United Kingdom: EURACHEM; 2000.
17. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2549.
18. Vass M, Hruska K, Franek M. Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. Vet Med 2008; 53(9): 469-500.
19. ธงชัย นิตริฐสุวรรณ, วีระพร ศรีอรุณพรหม. การใช้ยาและสารเคมีในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอลิเกา จังหวัดตรัง ปี 2542. ตัง : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล; 2543. หน้า 45.
20. ลีลา เรืองแป้น, สถาพร ดิเรกบุษราคัม, เยาวนิตย์ ดนยดล, ยุบลรัตน์ ศรีแก้ว. ประสิทธิภาพของยารักษาโรคกุ้งกุลาดำในท้องตลาดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสโอ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 19/2540. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง; 2540. หน้า 10.
21. Gräslund S, Karlsson K, Wongtavatchai J. Responsible use of antibiotics in shrimp farming. Aquaculture Asia Magazine 2002; 7(3): 17.
22. McCracken R, Hanna B, Ennis D, Cantley L, Faulkner D, Kennedy D. The occurrence of semicarbazide in the meat and shell of Bangladeshi fresh-water shrimp. Food Chem 2013; 136(3-4): 1562-7.

Method Development and Validation for Determination of Nitrofurantoin Metabolites in Food by LC-MS/MS

Thongsuk Payanan and Ladda Kaewklapanyacharoen

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

ABSTRACT Method for analysis of metabolites from nitrofurantoin drugs (furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin and nitrofurazone) in food which are mainly employed for the treatment of bacterial diseases in livestock was studied and developed. Nitrofurantoin drugs are rapidly metabolized to form 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) and semicarbazide (SEM) and also strongly bound to proteins in target animals. Due to their carcinogenicity, nitrofurantoin drugs were prohibited to use as veterinary drugs in the EU. The development of an analytical method for the simultaneous determination of four nitrofurantoin metabolites was developed by LC-MS/MS. Sample was digested by diluted hydrochloric acid to release the metabolites from the protein in sample and then a derivatization step was performed. Next, the nitrofurantoin derivatives have been extracted with ethyl acetate and then defatted with hexane. Afterwards, LC-MS/MS was employed for qualitative and quantitative analysis of these compounds. Limits of detection (LOD) were 0.1 µg/kg for AOZ and AMOZ and 0.5 µg/kg for AHD and SEM. Limit of quantitation (LOQ) were 0.3 µg/kg for AOZ and AMOZ and 1.0 µg/kg for AHD and SEM. Method linear working range was 0.3–5.0 µg/kg with the correlation coefficient ranged from 0.9978–0.9999. The accuracy of method was presented in form of % mean recovery which equals to 65–120% while method precision (0.1–15.2%) was represented with % RSD value. From the validation results, this method was fit for intended use with for the regulations legislated by the Thai Food and Drug Administration and the EU commission. In 2011–2013, the proposed method was performed in meat, offal, aquatic animals, honey, milk powder, egg powder, and flour to inspect the nitrofurantoin metabolites residue. From 579 samples, the residues were found in 13 samples (2.2%). In 8 aquatic animal samples, AOZ was found in range of less than 1.0 to 2.4 and SEM was found at 2.2 µg/kg. Moreover, SEM was also found in range of less than 1.0 to 3.5 µg/kg in 5 samples of milk powder, egg powder, and flour.

Key words: Nitrofurantoin metabolites, LC-MS/MS, food