
การวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดงคลอนบิวเตอร์อลในเนื้อหมู โดยใช้เทคนิค **Exact-matching double IDMS:** ผลการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด **APMP.QM-S6** **Clenbuterol in Porcine Meat**

กิตติยา เขียร์แมน พรหทัย กันแก้ว ปรียาภรณ์ พุกรอด ศรภุชณ์ มาบำรุง และปนัดดา ชิลวา
ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพ สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ คลองห้า คลองหลวง ปทุมธานี 12120

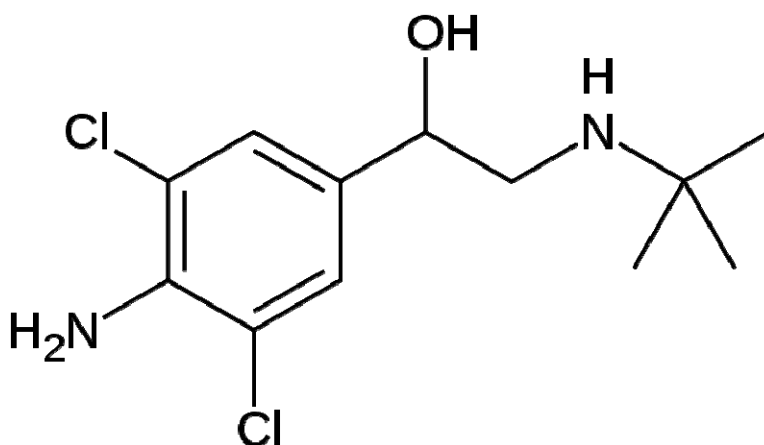
บทคัดย่อ สารคลอนบิวเตอร์อล (clenbuterol) เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β -agonists) มีการแอบใช้เป็นตัวเร่งเนื้อแดง และเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงเพื่อเป็นอาหาร มีการออกกฎหมายห้ามใช้สารคลอนบิวเตอร์อลในหลายๆ ประเทศ เนื่องจากส่งผลกระทบต่อสุขภาพ ดังนั้นฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพของสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (มว.) จึงได้เข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดระดับนานาชาติ APMP.QM-S6: Clenbuterol in porcine meat ซึ่งเป็นการวัดสารคลอนบิวเตอร์อลในเนื้อหมูดัดแปลงเทคนิคการวัดที่ใช้คือ เทคนิค exact-matching double IDMS โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะต่าง (alkaline hydrolysis) การตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด (acid precipitation) การกำจัดไขมัน (defatting) การสกัดตัวอย่างแบบของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction) การสกัดตัวอย่างแบบของแข็ง (solid phase extraction, SPE) แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ high performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (HPLC-MS/MS) ผลการวัดมีสมบัติการสอบกลับได้ (metrological traceability) เนื่องจากมีการประเมินความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานที่ใช้ ผลการวัดในตัวอย่าง APMP.QM-S6 พบที่ระดับความเข้มข้น $5.0 \mu\text{g/kg}$ มีค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ 5.0% และผลการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด APMP.QM-S6 ของประเทศไทย สอดคล้องกับสถาบันมาตรวิทยาประเทศอื่นๆ เป็นอย่างดี โดยค่าอ้างอิงของการเปรียบเทียบผลการวัด (Supplementary Comparison Reference Value, SCRv) มีค่าเท่ากับ $5.216 \mu\text{g/kg}$ และค่าความไม่แน่นอน $0.131 \mu\text{g/kg}$

Accepted for publication, 10 November 2014

บทนำ

สารเร่งเนื้อแดง clenbuterol (clenbuterol) โครงสร้างดังภาพที่ 1 เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β -agonists) ซึ่งในทางการแพทย์ใช้ผลติยารักษาคน สาร clenbuterol มีสรรพคุณในการขยายหลอดลม รักษาโรคหอบหืด ช่วยให้อากาศไหลเวียนสะดวก ช่วยให้อากาศขยายตัว และเพิ่มการสลายตัวของไขมันที่สะสมในร่างกาย แต่อาจมีผลข้างเคียง เช่น ทำให้มีอาการกล้ามเนื้อสั่น หัวใจเต้นเร็วกว่าปกติ กระวนกระวาย วิงเวียน ปวดศีรษะ เป็นต้น⁽¹⁾ อย่างไรก็ตาม มีการลักลอบนำสาร clenbuterol มาใช้ผิดวัตถุประสงค์ คือ ใช้เป็นสารเร่งเนื้อแดงโดยผสมในอาหารและน้ำสำหรับเลี้ยงหมู เพื่อให้หมูมีเนื้อแดงมาก มีไขมันน้อยซึ่งทำให้ได้ราคาดี⁽²⁾

การบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีสารเร่งเนื้อแดงตกค้างอยู่ จะส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาทที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด หลอดลม กระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น อาจมีอาการมือสั่น กล้ามเนื้อกระตุก ปวดศีรษะ หัวใจเต้นเร็วผิดปกติ กระวนกระวาย วิงเวียนศีรษะ บางรายมีอาการเป็นลม นอนไม่หลับ คลื่นไส้ อาเจียน มีอาการทางจิตประสาท และเป็นอันตรายมากสำหรับหญิงมีครรภ์ ผู้ที่เป็นโรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน และโรคไฮเปอร์ไทรอยด์⁽¹⁾ การตรวจวัดการตกค้างของสารเร่งเนื้อแดง clenbuterol สามารถตรวจได้จากการตกค้างที่ส่วนต่างๆ ของสุกร ได้แก่ เครื่องใน ตับ ไต เนื้อ และไขมัน นอกจากนี้ยังพบในปัสสาวะด้วยเช่นกัน ซึ่งสามารถตรวจวัดการตกค้างได้โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS หรือ GC-MS⁽³⁾



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเร่งเนื้อแดง clenbuterol (Clenbuterol)

คณะกรรมการอาหารและยา (Codex Alimentarius Commission - CAC) ได้กำหนดมาตรฐานอาหารให้มีระดับปริมาณสาร clenbuterol ที่ยอมให้ตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit, MRL) ในเนื้อสัตว์ (muscle) ที่ระดับ 0.2 $\mu\text{g/kg}$ (Codex Alimentarius, Maximum Residue Limits for Clenbuterol, year of adoption 2003)⁽⁴⁾

กิจกรรมการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด (International laboratory comparison) เป็นภารกิจสำคัญของสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติในการเป็นตัวแทนของประเทศไทย เพื่อแสดงความสามารถในการวัดในรายการนั้นๆ ดังนั้นในกลางปี 2556 สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (มว.) ได้เข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดนานาชาติระดับภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก (Asia-Pacific Metrology Programme, APMP) ในรายการ APMP.QM-S6: clenbuterol in porcine meat โดยมีสถาบันมาตรวิทยาแห่งเขตปกครองพิเศษฮ่องกง (Government Laboratory, Hong Kong, China (GLHK)) เป็นเจ้าภาพ ห้องปฏิบัติการของสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ หรือห้องปฏิบัติการที่ทำหน้าที่แทนสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (designated institute) จากประเทศต่างๆ เข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดรวมทั้งหมด

7 ห้องปฏิบัติการ ได้แก่ บราซิล ไทย จีน ฮองกง กรีซ เม็กซิโก และนิวซีแลนด์ นอกจากนี้ยังมี 2 ห้องปฏิบัติการจากประเทศไทยที่มีความเชี่ยวชาญ และมีประสบการณ์ในการวัดเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดแบบ pilot study (APMP.QM-P22) ซึ่งถูกจัดควบคุมไปด้วย โดยผู้จัดได้กำหนดให้แต่ละห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการจะต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูบดแห้ง⁽⁵⁾

เทคนิคการวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง clenbuterol ที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมีของ มว. นำมาใช้ในการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดนานาชาติครั้งนี้ คือ เทคนิค exact-matching double IDMS ซึ่งมีศักยภาพเป็นวิธีมาตรฐานปฐมภูมิ (primary method) และสามารถสอบกลับไปยัง SI units ได้^(6, 7) โดยอาศัยหลักการเติมไอโซโทป (isotopic analogue) ของสารที่ต้องการวัด (D_9 -clenbuterol) ที่ทราบปริมาณแน่นอนลงในทั้งสารมาตรฐาน (calibration standard) และตัวอย่าง (sample) ในปริมาณเท่ากัน ซึ่งจะเรียกว่า calibration blend solution และ sample blend solution ปริมาณของสาร clenbuterol ใน calibration blend solution จะถูกเติมให้เท่ากับในตัวอย่างที่ได้ค่ามาคร่าว ๆ ก่อนหน้านี้ จากนั้นทำการวัดความเข้มของพีค (peak intensity) ของไอออนสารมาตรฐาน (clenbuterol) เอง และตัว isotopic analogue (D_9 -clenbuterol) โดยใช้ mass spectrometer และวัดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของจำนวนไอโซโทป และคำนวณความเข้มข้นของสารที่สนใจจากสมการที่ (1)⁽⁸⁾

$$w_x = w_{z, c} \frac{w_{zc}, m_y, m_{z, c}, R_B}{m_x, m_{y, c}, R_{B, C}} \quad (1)$$

โดยที่ $w_x, m_{z, c}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่าง และใน calibration standard ตามลำดับ $w_x, m_{z, c}$ คือ มวลของตัวอย่าง และมวลของ calibration standard ตามลำดับ $w_y, m_{y, c}$ คือ มวลของ isotopic analogue ที่เติมลงในตัวอย่าง และใน calibration standard ตามลำดับ และ $R_B, R_{B, C}$ คือ อัตราส่วนของจำนวน isotope ที่เติมลงในตัวอย่าง และใน calibration blend ตามลำดับ

รายงานฉบับนี้ได้นำเสนอวิธีการวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง clenbuterol โดยใช้เทคนิค exact-matching double IDMS การประมาณค่าความไม่แน่นอนและการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาของผลการวัด รวมถึงผลของการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด APMP.QM-S6 เพื่อเป็นการเผยแพร่ความรู้ให้แก่ห้องปฏิบัติการทดสอบในประเทศได้นำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการตนเอง และสามารถปรับปรุงเพื่อให้ได้ผลการวัดที่มีความถูกต้องมากขึ้น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่าง APMP.QM-S6 เป็นตัวอย่างเนื้อหมู ที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze dried และมีการบดให้ละเอียด ลักษณะตัวอย่างเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน บรรจุอยู่ในขวดสีชา ปริมาณ 2 g โดยตัวอย่างได้ผ่านการฉายรังสีแกมมา (12 kGy, 18 hours) ผู้จัดได้ระบุว่าตัวอย่างมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1 g/kg - 50 µg/kg และกำหนดให้มีการวิเคราะห์ความชื้นในตัวอย่างหมูบดแห้ง เพื่อใช้ในการรายงานผลออกมาเป็น mass fraction ของสาร clenbuterol ต่อน้ำหนักแห้ง

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : clenbuterol.HCl ผลิตภัณฑ์ Dr. Ehrenstorfer, D_9 -clenbuterol.HCl ผลิตภัณฑ์ Dr. Ehrenstorfer

สารเคมี : acetonitrile (HPLC grade LAB-SCAN), dichloromethane (AR grade LAB-SCAN), hexane (HPLC grade LAB-SCAN), methanol (HPLC grade LAB-SCAN), sodium hydroxide AR grade, conc. HCl (SIGMA-ALDRICH), ethyl acetate (HPLC grade LAB-SCAN), 2-propanol, acetic acid (AR grade MERCK), phosphate buffer (pH 6.0), Tris buffer (pH 8.0), Protease Type XIV of *Streptomyces griseus*, (SIGMA), formic acid, KH_2PO_4 AR grade, KOH (LOBA CHEMIE)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง มีความละเอียด 5 ตำแหน่ง, 2 ตำแหน่ง, shaking incubator, centrifuge (Eppendorf 5810 centrifuge, Fronine Laboratory), evaporator (Caliper TurboVap, Life Science, Inc.) และ LC-MS/MS (Shimadzu LC system equipped with API 4000 QTRAP MS/MS, AB Sciex) คอลัมน์ที่ใช้คือ Phenomenex Gemini, 5 μ , C_{18} , 110 Å (150 × 4.6 mm) และ Guard column คือ Phenomenex C_{18} (4.0 × 2.0 mm), Injection volume: 5 μL , Column temperature: 40°C, Sample temperature: 15°C โดยใช้สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS (ตารางที่ 1 และตารางที่ 2) ทำการวิเคราะห์ด้วย Multiple Reaction Monitoring (MRM) ESI positive mode

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง HPLC สำหรับใช้ในการหาปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูดแห้ง

Time (min)	Module	Event	Parameter
0.10	System Controller	Start	
1.00	Pumps	Pump B conc.	5
3.00	Pumps	Pump B conc.	15
3.01	Pumps	Pump B conc.	40
10.00	Pumps	Pump B conc.	50
12.00	Pumps	Pump B conc.	95
13.00	Pumps	Pump B conc.	5
15.00	System Controller	Stop	

ตารางที่ 2 สภาวะของเครื่อง MS/MS สำหรับใช้ในการหาปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูดแห้ง

Analyte	Reaction	Dwell Time (s)	Declustering Potential, EP (eV)	Entrance Potential, DP(eV)	Collision Energy, CE (eV)	Collision Cell Exit Potential, CXP (eV)
Clenbuterol*	277.1 > 203.0	0.1	50	10.0	24	15
Clenbuterol**	277.1 > 168.1	0.1	50	10.0	42	15
D ₉ -clenbuterol*	286.2 > 204.1	0.1	48	10.0	24	15
D ₉ -clenbuterol**	286.2 > 169.1	0.1	48	10.0	42	15

หมายเหตุ : สำหรับ *คือไอออนหลัก (primary ion) ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ (quantification) และ **คือ ไอออนรอง (secondary ion) ที่ใช้ในการยืนยัน (confirmation)

การเตรียมสารละลายและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน clenbuterol เป็นสารมาตรฐานที่หาซื้อได้จากตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย ทั้งนี้ทางห้องปฏิบัติการได้ทำการประเมินความบริสุทธิ์ของสารโดยใช้ mass balance approach ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography UV-detector (HPLC-UV) ในการหาปริมาณ organic impurities/related structure impurities, ใช้เทคนิค Thermogravimetric analysis (TGA) ในการหาปริมาณ volatile and non-volatile residues และใช้เทคนิค Karl Fischer titration (KFT) ในการหาปริมาณน้ำ ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานจะใช้เครื่องชั่งที่มีความละเอียดเลขหลังจุดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และได้รับการสอบเทียบ โดยชั่งสารมาตรฐานของแข็งมาอย่างต่ำ 10 mg ลงในขวดแก้วสีชาขนาด 40 mL จากนั้นเติม methanol ประมาณ 25 g แล้วทำการชั่งน้ำหนักของสารละลายอย่างถูกต้องอีกครั้ง จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้น (stock standard solution) ที่มีความเข้มข้นเป็นหน่วย mass fraction, mg/g โดยความเข้มข้นคำนวณจากน้ำหนักของสารมาตรฐานในหน่วย mg ต่อน้ำหนักรวมของสารมาตรฐานและตัวทำละลายในหน่วย g การเตรียมสารละลาย intermediate standard solution เตรียมโดยการเจือจางสารละลาย stock standard solution ด้วย methanol โดยการชั่งเช่นเดียวกัน แล้วคำนวณความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียมได้ในหน่วย mg/g สำหรับ working solution หรือที่เรียกว่าสารละลายมาตรฐานที่นำไปใช้งานจริง สามารถเตรียมได้ในทำนองเดียวกัน สารละลายทั้งหมดที่ได้จากการเตรียมจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และจะต้องทำการเตรียม working solution ใหม่เสมอสำหรับแต่ละ batch ของการทดลอง นอกจากนี้สารละลาย stock solution, intermediate solution และ working solution ของ Isotopically-labelled analogue (D_9 -clenbuterol) สามารถเตรียมได้ในทำนองเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน clenbuterol ดังที่กล่าวมาข้างต้น

การหาความชื้นในตัวอย่าง

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหุบุด 0.5 g ด้วยเครื่องชั่งที่มีความละเอียด 5 ตำแหน่ง แล้วนำไปเก็บใน dessicator ซึ่งมีสาร anhydrous calcium sulphate (DRIERITE®) เป็นสารดูดความชื้น หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาอย่างต่ำ 20 วัน นำออกมาชั่งน้ำหนักที่เหลือ คำนวณน้ำหนักที่หายไปเป็นค่าความชื้น จากนั้นนำไปเก็บต่อใน dessicator เป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วนำมาชั่งอีกครั้ง ทำซ้ำไปเรื่อย ๆ จนกว่าน้ำหนักที่ได้คงที่ ซึ่งการหาความชื้นในตัวอย่างจะต้องทำไปพร้อม ๆ กันกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างประกอบด้วย 6 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ การเตรียม blends การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ต่อด้วยการตกตะกอนด้วยโปรตีน (protein precipitation) การกำจัดไขมันในเนื้อสัตว์ (defatting) การสกัดตัวอย่างแบบของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction) และการสกัดตัวอย่างแบบของแข็ง (solid phase extraction, SPE) สุดท้ายนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS

1. การเตรียม blends สองชนิด คือ calibration blend (CB, สารมาตรฐาน) และ sample blend (SB, ตัวอย่าง) สำหรับ calibration blend เตรียมจากตัวอย่างหุบุดแห้งที่ไม่มีการปนเปื้อนของสาร clenbuterol 0.5 g (sample blank) และทำการเติมสารละลายมาตรฐาน clenbuterol ให้มีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณ clenbuterol ในตัวอย่างที่หาค่าได้คร่าว ๆ จากเทคนิค external calibration curve สำหรับ sample blend เตรียมโดยการชั่งตัวอย่างหุบุดแห้ง APMP.QM-S6 ปริมาณ 0.5 g แล้วทำการเติมสารละลาย D_9 -clenbuterol ลงในทั้ง sample blend และ calibration blend ในปริมาณที่มีค่าจำนวนโมลเท่ากับจำนวนโมลของสารละลายมาตรฐาน clenbuterol (ที่ถูกเติมลงไปใน calibration blend ก่อนหน้านี้) จากนั้นเติมสารละลาย เติม Tris buffer pH 8.0 ปริมาณ 10 mL

2. การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยการเติมเอนไซม์ protease type XIV of *Streptomyces griseus* ปริมาณ 100 μL (50 g/1 mL ของ tris buffer, pH 8) และปั่นผสม จากนั้น incubate ไว้ที่ 55 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (ข้ามคืน) ปั่นผสมให้เข้ากัน ปลอ่ยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. วิธีการตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) โดยการปรับสารถละลายให้เป็นกรด (pH = 1) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (ประมาณ 350 μL) และปั่นสารถละลายผสม ปลอ่ยทิ้งไว้ 10 นาที ให้โปรตีนตกตะกอน ทำการแยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นสารถละลายโดยนำตัวอย่างเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารถละลายสีเหลืองใสหลอดพลาสติกใหม่ โดยกรองผ่านตัวกรองใยแก้วขนาด 1 μm จะได้สารถละลายสีเหลืองอ่อนประมาณ 10 mL

4. วิธีการกำจัดไขมันในเนื้อสัตว์ (defatting) โดยการเติม hexane 10 mL ปั่นผสม แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนสารถละลาย hexane ออก แล้วปรับสารถละลายของเหลวให้เป็นด่าง (pH = 9.5 – 10) ด้วย 10 M NaOH (ประมาณ 500 μL)

5. วิธีการสกัดตัวอย่างแบบของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction) สกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายผสม ethyl acetate: isopropanol (99:1, v/v) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 mL นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนสารถละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) แล้วระเหยส่วนที่สกัดได้ให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 °C เติม methanol 100 mL และเติมสารถละลาย phosphate buffer (pH = 6.0) 5 mL แล้วทำการ sonicate 1 นาที

6. วิธีการสกัดตัวอย่างแบบของแข็ง (solid phase extraction, SPE) โดย clean-up ตัวอย่างด้วย VertiPak™ C8/SCX SPE Tubes 6 mL ใช้สภาวะดังนี้ คือ condition: methanol 2 mL, equilibrate: Milli-Q water 2 mL และ phosphate buffer (pH = 6.0) 2 mL, loading: บรรจุตัวอย่างประมาณ 5 mL, wash 1: ล้างด้วย 1 M acetic acid 1 mL ทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ, wash 2: ล้างด้วย methanol 2 mL ทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ และ elute: ชะด้วยตัวทำละลายผสม ethyl acetate : ammonia (32%), 97:3 (v/v) 12 mL (6 mL $\times$ 2 ครั้ง)

ระเหยส่วนที่สกัดได้ให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 °C เติมสารถละลายผสม 0.1% formic acid ในตัวทำละลาย Milli-Q water: acetonitrile (9:1, v/v) ปริมาณ 750 μL ผสมโดย sonicate กรองด้วย PTFE filter 0.2 μm ใส่ขวดเพื่อฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

การคำนวณหาปริมาณโดย Exact-Matching Calibration

สำหรับการคำนวณหาปริมาณสาร clenbuterol เกิดจากการนำอัตราส่วนพื้นที่พีคที่วัดได้ทั้ง primary และ secondary ions ใน sample blend และ calibration blend มาคำนวณโดยใช้สมการที่ (2)

$$w_x = F_P \cdot F_E \cdot F_I \cdot w_{Z,C} \cdot \frac{m_Y \cdot m_{Z,C}}{F_{drymass} \cdot m_X \cdot m_{Y,C}} \cdot \frac{R'_B}{R'_{B,C}}, F_{drymass} = \left[1 - \frac{\%moisture}{100} \right] \quad (2)$$

w_x คือ mass fraction ของ clenbuterol ในตัวอย่างเนื้อหมูปดแห้งที่ต้องการหา มีหน่วย $\mu\text{g/kg}$

$w_{Z,C}$ คือ mass fraction ของ clenbuterol ใน calibration standard มีหน่วย $\mu\text{g/kg}$

m_x คือ มวลของตัวอย่างเนื้อหมูปดแห้งที่ชั่งมาเพื่อใช้ในการเตรียม sample blend มีหน่วย g

m_y คือ มวลของสารถละลาย internal standard (D_9 -clenbuterol) ที่เติมลงไปในตัวอย่างเป็นหมูปดเพื่อเตรียม sample blend มีหน่วย g

$m_{Z,C}$ คือ มวลของสารละลายมาตรฐาน clenbuterol ที่เติมลงไปเพื่อใช้เตรียม calibration blend มีหน่วย g

$m_{Y,C}$ คือ มวลของสารละลาย internal standards (D_9 -clenbuterol) ที่เติมลงไปเพื่อเตรียม calibration blend มีหน่วย g

R'_B และ $R'_{B,C}$ คือ อัตราส่วนพื้นที่พีคที่วัดได้ใน sample blend และใน calibration blend ตามลำดับ โดยคำนวณจากไอออนของ clenbuterol ทหารด้วยไอออนของ D_9 -clenbuterol

F_P และ F_E คือ method precision effect, interference effect และ extraction effect ตามลำดับ ซึ่งจะกำหนดให้มีค่าเท่ากับ 1 แต่จะนำค่าความไม่แน่นอนจากผลกระทบเหล่านี้มารวมอยู่ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดรวม (combined standard uncertainty)

F_P คือ dry mass correction factor ซึ่งได้มาจากการหาความชื้นในตัวอย่างหมูปดแห้ง

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ยึดหลักการตาม Eurachem Guide⁽⁹⁾ และ JCGM 100:2008 (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement)⁽¹⁰⁾ สำหรับการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากการใช้เทคนิค exact-matching double IDMS นั้น จะขึ้นอยู่กับสมการหลักที่ใช้ในการคำนวณ (สมการที่ 2) และการรวมค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากแหล่งต่างๆ สามารถรวมกันได้ดังสมการที่ (3)

$$\frac{u(w_x)}{w_x} = \sqrt{\left(\frac{u(w_{Z,C})}{w_{Z,C}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_Y)}{m_Y}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{Y,C})}{m_{Y,C}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_X)}{m_X}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{Z,C})}{m_{Z,C}}\right)^2 + \left(\frac{u(F_P)}{F_P}\right)^2 + \left(\frac{u(F_I)}{F_I}\right)^2 + \left(\frac{u(F_{drymass})}{F_{drymass}}\right)^2 + \left(\frac{u(F_E)}{F_E}\right)^2} \quad (3)$$

โดยที่ $u(w_{Z,C})$ เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของ mass fraction ของสารละลายมาตรฐาน clenbuterol ที่ใช้ในการเตรียม calibration blend คำนวณจากค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของความบริสุทธิ์ของ clenbuterol น้ำหนักของสารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และการเปรียบเทียบสารละลายมาตรฐาน (standard comparison) $u(m_Y)$, $u(m_{Y,C})$, $u(m_X)$, $u(m_{Z,C})$ เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของน้ำหนักต่างๆ คำนวณจาก bias และ precision ของเครื่องชั่ง

F_P เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของปัจจัย precision ของวิธี ซึ่งคำนวณจาก standard deviation of the mean (sdm) ของการซ้ำ

F_E เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของปัจจัยจากการสกัด ซึ่งคำนวณมาจาก bias ของการสกัด liquid-liquid extraction และ solid phase extraction

F_I เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของปัจจัยจากตัวรบกวนใน mass spectrometer (interference effect) ซึ่งคำนวณมาจาก bias ระหว่าง primary ion pair และ secondary ion pair

$F_{drymass}$ เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของปัจจัย dry mass correction ซึ่งคำนวณมาจากการวิเคราะห์หาความชื้นในตัวอย่าง

สำหรับค่าความไม่แน่นอนจาก R'_B และ $R'_{B,C}$ ซึ่งเป็นค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากการวัด isotope amount ratios ใน sample blend และ calibration blend ตามลำดับ จะถือว่าถูกคิดรวมอยู่ในปัจจัย precision ของวิธีอยู่แล้ว ซึ่งถ้าหากมีปัจจัยอะไรก็ตามที่ส่งผลกระทบต่อการวัด ratio R'_B และ $R'_{B,C}$ ก็จะถือว่ามีส่วนน้อยมาก

และสามารถหักล้างกันได้ที่สุดในที่สุด เนื่องจากทั้ง sample blend และ calibration blend ถูกเตรียมให้เหมือนกัน (exact-matched) ทั้งในเรื่องความเข้มข้น, ตัวกลาง และ isotope ratio

การควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์

เนื่องจากไม่มีวัสดุอ้างอิงรับรองของสารเคลือบเตอรอลที่อยู่ในตัวกลางที่เหมือนกับตัวอย่างจริง (ในเนื้อหมู) ที่วิเคราะห์ ดังนั้นการควบคุมคุณภาพ (quality control, QC) จึงดำเนินการจากการวิเคราะห์ spiked sample จำนวน 2 ซ้ำ ทุกครั้งควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง โดยให้ค่า accuracy (% recovery) และ precision (% RSD) อยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนด

ผล

ผลจากการวัดค่าความชื้นในตัวอย่างหมูปอด APMP.QM-S6 ได้ค่าความชื้นเท่ากับ $1.07\% \pm 0.04\%$ ($k = 2.0$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $n = 4$) ซึ่งค่าความชื้นที่ได้นำไปใช้ในการคำนวณ mass fraction ของสารเคลือบเตอรอลต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้งต่อไป ผลจากการประเมินความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานเคลือบเตอรอลโดยใช้เทคนิค HPLC-UV, TGA และ KFT ได้ค่าความบริสุทธิ์ $99.32\% \pm 0.13\%$ ($k = 2.0$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) นอกจากนี้ผลจากการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์โดยใช้ spiked sample ทำการสร้าง control chart ตลอดช่วงระยะเวลาของการวิเคราะห์ ได้ผลอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับ ทั้ง accuracy (% recovery, ในช่วง 95% - 105%) และ precision (% RSD < 3%)

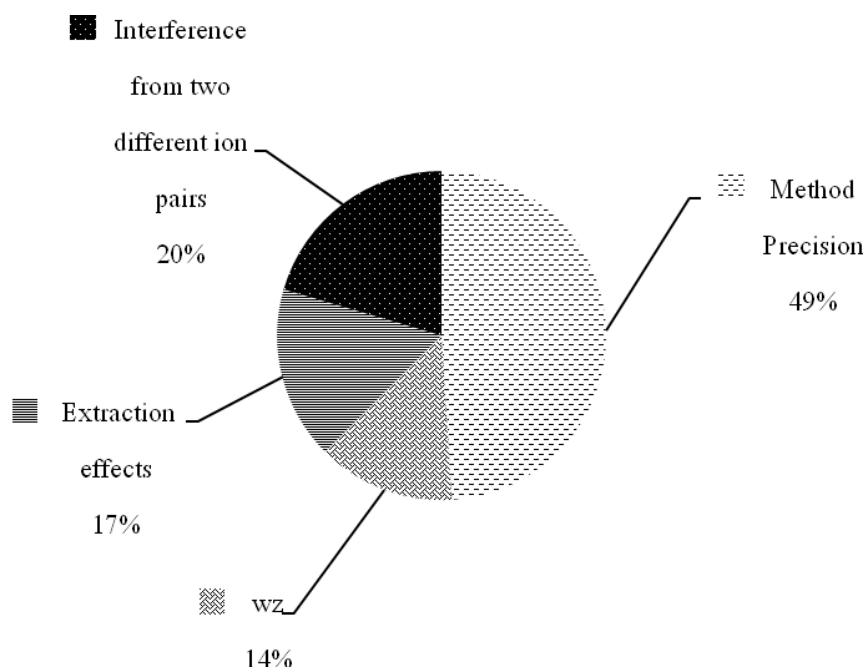
ผลการตรวจวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดงในตัวอย่าง APMP.QM-S6 ด้วยเทคนิค exact-matching double IDMS โดยค่าที่ห้องปฏิบัติการรายงาน เกิดจากค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 การทดลอง (iterations) โดยแต่ละการทดลองทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ และมีการปรับแก้ค่าด้วยค่าความชื้นที่วัดได้ มีค่าเฉลี่ย และค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ $5.00 \mu\text{g/kg} \pm 0.25 \mu\text{g/kg}$ ($k = 2.03$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ซึ่งค่าอ้างอิงของโปรแกรมเปรียบเทียบผลการวัด (Supplementary Comparison Reference Value, SCRv) เท่ากับ $5.216 \mu\text{g/kg} \pm 0.131 \mu\text{g/kg}$ ($k = 2.78$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)⁽¹¹⁾ แหล่งของความไม่แน่นอนของการวัดหาปริมาณสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูปอดแห้ง แสดงรายละเอียด (ตารางที่ 3) และเมื่อเทียบเป็นสัดส่วนแหล่งของความไม่แน่นอนจากแหล่งต่างๆ (ภาพที่ 2) พบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่ใหญ่ที่สุดมาจาก precision ของวิธี (49%) รองลงมาจากตัวรบกวน (interference) ในระบบ mass spectrometer (20%) จากการสกัด (extraction, 17%) และแหล่งความไม่แน่นอนจากการเตรียมสารมาตรฐาน (m_y , 14%) สำหรับแหล่งความไม่แน่นอนจากแหล่งอื่นๆ เช่น จากการชั่ง (m_y , $m_{z,c}$, m_x , $m_{y,c}$) และจากปัจจัย dry mass correction ($F_{drymass}$) มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับจาก 4 แหล่งที่กล่าวมา

ตารางที่ 3 Uncertainty budget ของการวัดหาปริมาณสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูปอดแห้ง

Parameter (unit)	Typical value	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty (%)
$w_{z,c}$ ($\mu\text{g/kg}$)	8.3414	0.076265	0.9143%
m_y (g)	0.28809	0.000049	0.0172%
$m_{z,c}$ (g)	0.28933	0.000049	0.0171%
m_x (g)	0.51371	0.000049	0.0096%
$m_{y,c}$ (g)	0.29174	0.000049	0.0170%

ตารางที่ 3 Uncertainty budget ของการวัดหาปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูบดแห้ง (ต่อ)

Parameter (unit)	Typical value	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty (%)
$F_{drymass}$ (1)	0.98928	0.000061	0.0062%
F_P (1)	1.000	0.01697	1.697%
F_E (1)	1.000	0.0100	1.000%
F_I	1.000	0.0110	1.097%
Combined relative standard uncertainty			2.43%



ภาพที่ 2 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวัดปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูบดแห้ง

เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ มว. (NIMT) รายงานกับค่าที่รายงานโดยประเทศอื่นๆ ที่เข้าร่วม พบว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ได้ผลการวัดอยู่ในช่วงของค่าอ้างอิง และค่าความไม่แน่นอนของ SCRv ของโปรแกรมการเปรียบเทียบผลการวัดที่เสนอโดยเจ้าภาพผู้จัด ยกเว้นห้องปฏิบัติการ A และ F (ตารางที่ 4)

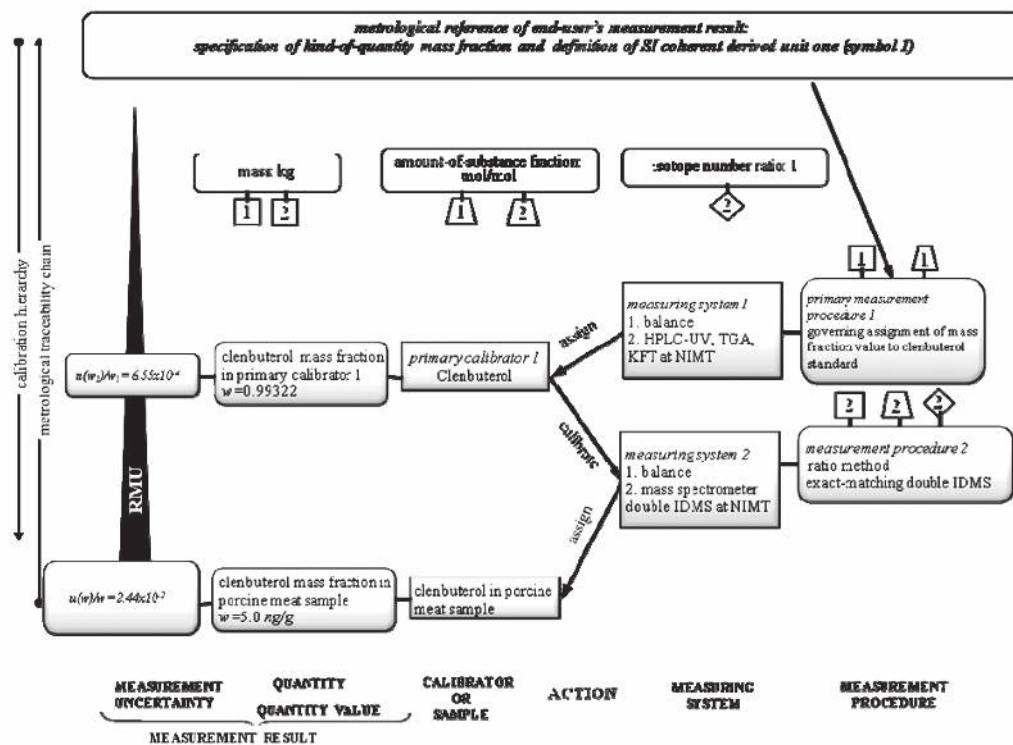
ตารางที่ 4 ค่าปริมาณสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูดแห้ง และ expanded uncertainty (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) รายงานโดยประเทศต่างๆ ที่เข้าร่วม APMP.QM-S6⁽¹¹⁾

NMIs/DIs	Mass fraction ($\mu\text{g/kg}$) on dry mass basis	Expanded uncertainty ($\mu\text{g/kg}$)
A	4.43	0.82
มว. (NIMT)	5.00	0.25
B	5.18	0.50
C	5.30	0.40
D	5.30	0.68
E	5.30	0.29
F	9.97	0.89
ค่าอ้างอิง (SCRV)	5.216	0.131

หมายเหตุ : เนื่องจากการเผยแพร่ผลการวัดของประเทศอื่นด้วย จึงใช้สัญลักษณ์ A, B, C, D, E และ F แทนชื่อของประเทศอื่นๆ ที่เข้าร่วม

การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาของผลการวัด

ผลการวัดสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูดแห้งที่ได้สามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาโดยการเชื่อมโยงไปสู่หน่วยการวัดที่ได้มาจาก SI คือ หน่วย mass fraction ซึ่งรายงานในหน่วย $\mu\text{g/kg}$ สามารถแปลงหน่วยได้เป็น g/g เท่ากับ 1 (SI coherent derived unit “one” (1)) ในการอธิบายความสามารถในการสอบกลับได้ของผลการวัดครั้งนี้ สามารถแสดงผ่าน 3 กระบวนการด้วยกัน กล่าวคือ กระบวนการแรกสารมาตรฐานเคลือบเตอรอลที่นำมาใช้ในการเตรียมเป็น calibrator ได้รับการประเมินค่าความบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค HPLC-UV, TGA และ KFT ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ที่ได้มีสมบัติในการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา กระบวนการที่สอง ทุกขั้นตอนในการเตรียมสารละลายมาตรฐานหรือการเตรียมตัวอย่าง จะเตรียมโดยใช้เครื่องชั่งที่ได้รับการสอบเทียบ ซึ่งจะทำให้ผลการวัดที่ได้จากเครื่องชั่ง คือ มวล (mass) สามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา ผ่านกิโลกรัมของ มว. ไปยังกิโลกรัมมาตรฐานของโลก (prototype of the kilogram) ซึ่งมีอยู่หนึ่งเดียวในโลกที่ BIPM ณ กรุงปารีส กระบวนการที่สาม คือ วิธีการวัดที่นำมาใช้คือ เทคนิค exact-matching double IDMS ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าเป็น primary ratio method โดยอาศัยหลักการวัด isotope number ratio ทำให้ผลการวัดมีความถูกต้องสูง และได้มีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดอย่างละเอียดรอบคอบ โดยได้มีการนำปัจจัยอื่นๆ ที่นอกเหนือจากสมการการคำนวณหลัก ที่อาจจะส่งผลต่อการวัด มาคิดรวมอยู่ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนสุดท้ายอีกด้วย เมื่อ 3 กระบวนการดังกล่าวได้เกิดขึ้น จึงทำให้ผลการวัดสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูดแห้งมีสมบัติการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา และสามารถเขียนเป็น metrological traceability chain (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ใช้การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา (metrological traceability chain) ของผลการวัดปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูบดแห้ง

โดยจุดสูงสุดของใช้การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาเป็น หน่วย SI (SI coherent derived unit “one” (1)) สัญลักษณ์สี่เหลี่ยมจัตุรัส (แทนหน่วยเอสไอ kg) สี่เหลี่ยมคางหมู (แทนหน่วยเอสไอ mol/mol) และสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (แทนการวัด isotope number ratio) จะติดอยู่กับกล่อง “measurement procedure” แสดงหน่วยการวัดที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะทาบเชื่อมโยงไปยังส่วนบนสุดของโซ่ ตัวเลข 1 และ 2 ที่ระบุไว้ในกล่องสี่เหลี่ยมทั้งสามชนิดแทน primary measurement procedure 1 และ measurement procedure 2 ตามลำดับ มีกิจกรรมเกิดขึ้น 2 กิจกรรมที่ทำให้เกิดเป็นโซ่ คือ ถ่ายค่า (assign) และสอบเทียบ (calibrate) โดย measuring system จะทำหน้าที่ในการถ่ายค่า (assign) และตัว calibrator จะทำหน้าที่ในการสอบเทียบ (calibrate) ซึ่งผลที่ได้คือ ผลการวัด (measurement results) จะประกอบด้วยค่าปริมาณ (quantity value = value + measurement unit) และล่างสุดของใช้กระบวนการ calibration hierarchy จะทำให้มีค่าความไม่แน่นอนของการวัด (relative measurement uncertainty, RMU) เพิ่มขึ้น

วิจารณ์

วิธีการวัดสารเร่งเนื้อแดงในหมูบดแห้งโดยเทคนิค exact-matching double IDMS เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดเพื่อความถูกต้องสูง สามารถนำไปใช้ในการวัดต่างๆ เช่น เพื่อให้ค่าอ้างอิง (certified value) แก้ววัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material, CRM) ให้ค่าอ้างอิงแก่โปรแกรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing scheme, PT) หรือให้ค่าอ้างอิงกรณีที่มีข้อโต้แย้งของผลการวัด

เทคนิค exact-matching double IDMS นอกจากจะต้องทำให้ peak area หรือสัญญาณที่ได้ mole ratio ทั้งใน calibration blend และ sample blend มีความใกล้เคียงกันให้มากที่สุดแล้ว ชนิดของตัวกลาง (matrix)

จะต้องใกล้เคียงกันด้วย เนื่องจากผลกระทบจากตัวกลางนี้เป็นปัญหาหลักในการวิเคราะห์ทางด้านเคมีที่จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากผลของ matrix suppression หรือ matrix enhancement ดังนั้นในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค exact-matching double IDMS จึงต้องเตรียม calibration blend ใน matrix blank ชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกับตัวอย่างจริงให้มากที่สุด เพื่อให้ผลกระทบจากปัจจัยนี้ทั้งในตัวอย่าง และใน calibration blend มีปริมาณเท่ากัน และถือว่าสามารถหักล้างกันได้มากที่สุด

การประเมินความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานที่นำมาใช้มีความจำเป็น เนื่องจากเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ผลการวัดนั้นมีสมบัติการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา (metrological traceability) ทั้งนี้ข้อตกลงของการเปรียบเทียบผลการวัดด้านเคมีในระดับนานาชาติ (ทั้งระดับโลก, CCQM และระดับภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก, APMP) ได้กำหนดว่าผลการวัดของประเทศผู้เข้าร่วมแบบ key comparison/supplementary comparison จะสามารถนำค่ามาคิดรวมเป็นค่าอ้างอิง KCRV/SCRV ได้ก็ต่อเมื่อผลการวัดนั้นมี metrological traceability กล่าวคือ การวัดนั้นจะต้องมีการใช้สารมาตรฐานที่เป็น CRM หรือถ้าไม่สามารถจัดหาสารมาตรฐานที่เป็น CRM ได้ ก็จะต้องมีการประเมินความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานที่นำมาใช้

การวิเคราะห์สารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β -agonists) จัดว่าเป็นการวัดที่มีความท้าทายสูง เนื่องจากสารเหล่านี้จะจับกับไขมัน หรือโปรตีน ซึ่งจะต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ดี ต้องมั่นใจได้ว่าสารเหล่านี้จะหลุดออกมาหมดเวลาทำการสกัด นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสเพื่อให้สารเร่งเนื้อแดงเคลือบเตอรอลหลุดออกมาจากเนื้อเยื่อสัตว์มีความสำคัญมาก การเติมเอนไซม์ลงไปในสภาวะความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมจะช่วยให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสมีความสมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งจากการทดลองได้ลองใช้วิธีการไฮโดรไลซิสทั้งในสภาวะกรด⁽¹²⁾ และสภาวะเบส⁽¹³⁾ โดยการไฮโดรไลซิสในสภาวะกรด (pH 5.2) โดยใช้เอนไซม์ β -Glucuronidase (incubate at 37 °C, 16 hours) พบว่าผลการวัดในตัวอย่าง APMP.QM-S6 ที่ได้จากการทำซ้ำไม่สอดคล้องกัน ได้ค่าที่กระจายกันมาก แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นการไฮโดรไลซิสในสภาวะเบส (pH 8.0) โดยใช้เอนไซม์ protease type XIV of *Streptomyces griseus* (incubate at 55 °C, 16 hours) พบว่าให้ผลการวัดในตัวอย่าง APMP.QM-S6 จากการทำซ้ำที่สอดคล้องกันเป็นอย่างดี ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการไฮโดรไลซิสในสภาวะเบส สำหรับการกำจัดตัวรบกวนโปรตีนสามารถทำได้ง่ายโดยการเติมกรดลงไปทำให้โปรตีนเสียสภาพ (degradation) จากนั้นจะเกิดการแยกชั้นโปรตีนออกมา ซึ่งง่ายต่อการกำจัดทิ้ง ไขมันเป็นตัวรบกวนที่มีขั้วต่ำซึ่งจะพบมากในตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์สามารถกำจัดออกได้โดยการเติม hexane ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว นอกจากนี้การใช้เทคนิค liquid-liquid extraction และ solid phase extraction (SPE) เป็นการกำจัดสารอินทรีย์ตัวอื่นๆ ที่ไม่สนใจ โดยอาศัยสภาพความเป็นขั้วที่ต่างกันและการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นการลดตัวรบกวนใน mass spectrometer ซึ่งส่งผลให้ผลการวัดที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ได้จากเทคนิค exact-matching double IDMS มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ เช่น external calibration curve หรือ standard addition เนื่องจากในสมการการคำนวณหลักมีพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง คือ mass (uncertainty จากการชั่งจะมีขนาดเล็กมาก) ความเข้มข้นของ working standard ซึ่งถูกเตรียมโดยการชั่ง (gravimetric preparation) ทำให้ uncertainty มีขนาดเล็กเช่นกัน ปัจจัยหลักของแหล่งความไม่แน่นอนจึงมาจากการวิเคราะห์ซ้ำ (method precision) ลำดับการฉีดตัวอย่างโดยใช้เทคนิค bracketing⁽¹⁴⁾ (การฉีดคั่นระหว่าง calibration blend และ sample blend) นอกจากจะช่วยในเรื่อง instrumental drift แล้ว ยังช่วยให้ precision ของผลการวัดดียิ่งขึ้นด้วย

จากการเข้าร่วมเปรียบเทียบการวัด APMP.QM-S6 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมี ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพของ มว. ได้แสดงศักยภาพในการวัดทั้งได้ผลการวัดที่สอดคล้องกับผลจากห้องปฏิบัติการของสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติของประเทศอื่นๆ และมีค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่มีขนาดเล็ก นอกจากนั้นผลจากการเข้าร่วม

เปรียบเทียบผลการวัดในระดับนานาชาติ APMP.QM-S6 ยังเป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่ได้ทำการพัฒนา (method validation) อีกด้วย ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมี ได้ผ่านการประเมินระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2005 (ผ่าน peer review, pathway C) เมื่อเดือนเมษายน 2557 ในรายการวัดอื่นๆ รวมถึงรายการนี้ด้วย นับเป็นก้าวสำคัญที่นำไปสู่การประกาศความสามารถของการวัดโดยการ claim CMC (Calibration Measurement Capability) บนเว็บไซต์ของ BIPM ซึ่งเป็นแผนที่จะดำเนินการต่อไปในปี 2558 และปัจจุบันรายการวัดสารเร่งเนื้อแดง clenbuterol ได้เปิดให้บริการอย่างเป็นทางการแก่ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ หรือ ผู้ผลิต CRM ที่ต้องการค่าอ้างอิงรับรอง

สรุป

จากการที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมีได้พัฒนาวิธีการวัดสารเร่งเนื้อแดง clenbuterol ในเนื้อหมู บดแห้ง โดยใช้เทคนิค exact-matching double IDMS และได้ใช้วิธีนี้เข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดระหว่างประเทศ และได้ผลการเปรียบเทียบที่มีความถูกต้องสูง มีความไม่แน่นอนของการวัดขนาดเล็กและผลการวัดมีความสอดคล้องได้ทางมาตรวิทยานั้น ถือว่าเป็นการประกาศความสามารถในการวัดครั้งนี้ให้ประเทศอื่นๆ ได้รับรู้ให้ต่างประเทศยอมรับในมาตรฐานการวัดทางด้านเคมี ว่ามีความเท่าเทียมกับนานาชาติ และสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติสามารถกระจายเผยแพร่ความสามารถในการวัดด้านนี้ ให้แก่ห้องปฏิบัติการในประเทศไทยที่ทำการตรวจวัดสาร clenbuterol เพื่อสามารถวัดได้อย่างถูกต้อง มีความน่าเชื่อถือ และสอดคล้องได้ โดยผ่านการผลิตวัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) หรือ การกำหนดค่าอ้างอิงให้กับโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (PT) ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

สำหรับการเปรียบเทียบการวัดครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก สพ.ญ.สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์ จากสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ในการให้คำปรึกษา รวมทั้งอนุเคราะห์ให้ยืมสารเคมีบางส่วน และขอขอบคุณ มว. ที่ให้การสนับสนุนในเรื่องค่าใช้จ่ายต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างที่ได้ทำการวิเคราะห์ในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Spiller HA, James KJ, Scholzen S, Borys DJ. A descriptive study of adverse events from clenbuterol misuse and abuse for weight loss and bodybuilding. *Subst Abus* 2013; 34(3): 306-12.
2. Kuiper HA, Noordam MY, van Dooren-Flipsen MM, Schilt R, Roos AH. Illegal use of beta-adrenergic agonists: European community. *J Anim Sci* 1998; 76(1): 195-207.
3. Elliott CT, McEvoy JD, McCaughey WJ, Shortt DH, Crooks SR. Effective laboratory monitoring for the abuse of the beta-agonist clenbuterol in cattle. *Analyst* 1993; 118(4): 447-8.
4. Codex Alimentarius Commission. Maximum residue limits for clenbuterol. [online]. 2012; [cited 2014 Apr 17]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/vetdrugs/details.html; jsessionid=0DB0C8B130F8E59454A24F70BD22F850?id=13>
5. Sin DWM, Ho C, Yip YC. APMP supplementary comparison and pilot study clenbuterol in porcine meat (APMP.QM-S6 and APMP.QM-P22). Hong Kong, China: Government Laboratory (GLHK); 2013.
6. Richter W. Primary methods of measurement in chemical analysis. *Accredit Qual Assur* 1997; 2(8): 354-9.

7. De Bièvre P, Peiser HS. Basic equations and uncertainties in isotope-dilution mass spectrometry for traceability to SI of values obtained by this primary method. *Fresenius J Anal Chem* 1997; 359(7-8): 523-5.
8. Mackay LG, Taylor CP, Myers RB, Hearn R, King B. High accuracy analysis by isotope dilution mass spectrometry using an iterative exact matching technique. *Accred Qual Assur* 2003; 8(5): 191-4.
9. Ellison SLR, Williams A, editors. *EURACHEM/CITAC Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3rd ed. United Kingdom: EURACHEM; 2012.
10. JCGM 100:2008 Evaluation of measurement data -- guide to the expression of uncertainty in measurement. JCGM; 2008.
11. Sin DWM, Ho C, Yip YC. Draft a report of APMP.QM-S6 APMP supplementary comparison clenbuterol in porcine meat. Hong Kong, China: Government Laboratory, (GLHK); 2014.
12. Shao B, Jia X, Zhang J, Meng J, Wu Y, Duan H, et al. Multi-residual analysis of 16 β -agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 2009; 114: 1115-21.
13. สัจจิตรา พงศ์วิวัฒน์. เอกสารการประชุม ASEAN Food Reference Laboratory for Veterinary Drug Residues (AFRL for VDR) เรื่อง Analytical method for beta-agonists. วันที่ 13-16 สิงหาคม 2556. ปทุมธานี: สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์; 2556.
14. Muaksang K. Development of reference methods and reference materials for trace level antibiotic residues in food using IDMS [dissertation]. Sydney, Australia: The University of New South Wales; 2009.

Analysis of Clenbuterol in Porcine Meat Utilizing an Exact-Matching Double IDMS: Interlaboratory Comparison Result: APMP.QM-S6 Clenbuterol in Porcine Meat

Kittiya Shearman Pornhatai Kankaew Preeyaporn Pookrod

Sornkrit Marbumrung Panadda Silva

Chemical Metrology and Biometry Department, The National Institute of Metrology, Thailand (NIMT), Klong 5, Klong Luang, Pathumthani, 12120

ABSTRACT Clenbuterol is a type of β -agonist which has been used as an illegal growth promoter in meat production. The presence of clenbuterol in meat for human consumption is a health risk for consumers and is therefore forbidden in many countries. The Organic Analysis Laboratory of the National Institute of Metrology, Thailand (NIMT) participated in the interlaboratory comparison, APMP.QM-S6: Clenbuterol in porcine meat. The measurement method used was the exact-matching double isotope dilution mass spectrometry (IDMS) technique. This measurement procedure involved alkaline hydrolysis, acid precipitation, defatting, liquid-liquid extraction, solid phase extraction (SPE) clean-up and analysis of sample extracts by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) operating in positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. The purity of clenbuterol standard obtained from the in-house purity assessment utilized metrological traceability of measurement results. The mass fraction of clenbuterol in APMP.QM-S6 sample reported by NIMT was 5.0 $\mu\text{g/kg}$ with 5.0% relative expanded uncertainty (at the 95 % confidence interval) which was in agreement with results from other metrology institutes. The Supplementary Comparison Reference Value (SCRV) was 5.216 $\mu\text{g/kg} \pm 0.131 \mu\text{g/kg}$.

Key words: Clenbuterol, exact-matching double IDMS, interlaboratory comparison