ว กรมวิทย พ 2567; 66 (2): 225-242

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน 17α-Estradiol, 17β-Estradiol และ Testosterone โดยเทคนิค UPLC-MS/MS

สุวิมล หมวดหมั๋ะ วรรณพร พะเยาว์ อัจฉรี อินแก้ว วิทวัส วังแก้วหิรัญ กัญญารัตน์ เชื้อกูลชาติ สกุลรัตน์ สมสันติสุข และ ทองสุข ปายะนันทน์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ฮอร์โมน 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone เป็นฮอร์โมนเพศที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของระบบสืบพันธุ์ รวมถึงส่งผลต่อการแสดงลักษณะของเพศหญิงและเพศชาย ปัจจุบันพบว่ามีการนำฮอร์โมนเพศสังเคราะห์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงปลานิลและปลาหมอแบบเพศเดี่ยว โดยใช้ testosterone เหนี่ยวนำให้เกิดปลานิลเพศผู้ และ 17β-estradiol เพื่อให้เกิดปลาหมอเพศเมีย การผสมฮอร์โมนในอาหารอาจก่อให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงมีข้อกำหนดจากสหภาพยุโรป (EU) ประกาศห้ามใช้ฮอร์โมนดังกล่าวในการทำปศุสัตว์และเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนเพศ ได้แก่ 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone ในเนื้อปลา ด้วยเทคนิค UPLC-MS/MS คำนวณผลโดยใช้ procedural mixed standard calibration curve พบว่า LOD และ LOQ เป็น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 2–100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า coefficient of determination (R^2) มากกว่า 0.999 ความแม่นแสดงด้วย %recovery อยู่ในช่วง 89.7–114.0% และความเที่ยงแสดงด้วย %RSD อยู่ในช่วง 3.5–26.5% แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะ แม่นยำ น่าเชื่อถือ เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: 17α-Estradiol, 17β-Estradiol, Testosterone, ฮอร์โมน, UPLC-MS/MS

Corresponding author E-mail: suwimol.m@dmsc.mail.go.th

Received: 6 June 2023 *Revised: 12 February 2024* *Accepted: 27 March 2024*

บทนำ

ฮอร์โมน (hormone) เป็นสารเคมีที่ถูกสร้างจากต่อมไร้ท่อที่ถูกส่งไปตามกระแสเลือดเพื่อไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ฮอร์โมนที่มีหน้าที่ควบคุมการสืบพันธุ์ กระตุ้นการเจริญเติบโตของไข่ในรังไข่ หรือสร้างเชื้ออสุจิในอัณฑะ เรียกว่า ฮอร์โมนเพศ จัดอยู่ในกลุ่มสารสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) มีโครงสร้างเป็นวงพื้นฐานของสเตียรอยด์ ถูกสังเคราะห์โดยมีคอเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารตั้งต้น ได้แก่ estradiol (17α-estradiol และ 17β-estradiol) เป็นฮอร์โมนเพศหญิง ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะเพศหญิงและรักษาสมดุลระบบสืบพันธุ์[1] และ testosterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศชาย[2] ปัจจุบันฮอร์โมนเพศสังเคราะห์มีบทบาทในการพัฒนาระบบเลี้ยงปลาแบบเพศเดี่ยวหรือแปลงเพศใดเพศหนึ่ง (mono sex) อย่างแพร่หลาย เนื่องจากต้องการเพิ่มผลผลิตในการเพาะเลี้ยง นิยมทำโดยการผสมฮอร์โมนเพศในอาหารสำหรับลูกปลา เพื่อเหนี่ยวนำเพศปลาในระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาเพศหรือระยะถุงไข่แดงยุบให้ได้เพศปลาตามที่ต้องการ[3] วิธีการนี้พบมากในการเพาะเลี้ยงปลานิลและปลาหมอ ซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจที่คนไทยนิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายทั้งเพื่อการค้าและบริโภคเพราะเนื้อมีรสชาติดีราคาถูก[4,5] โดยทั่วไปปลานิลเพศผู้มีขนาดใหญ่และเจริญเติบโตไวกว่าเพศเมีย เนื่องจากปลานิลเพศเมียต้องใช้พลังงานส่วนใหญ่ในการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์มากกว่าใช้ในการเจริญเติบโต[6,7] จึงมีการใช้ฮอร์โมน testosterone เหนี่ยวนำเพศปลานิลให้เป็นเพศผู้[3] ส่วนปลาหมอเพศเมียโดยธรรมชาติมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ โดยเพศเมียมีขนาดประมาณ 17-20 เซนติเมตร น้ำหนัก 95-125 กรัม ในขณะที่เพศผู้มีขนาดเพียง 15-18 เซนติเมตร น้ำหนัก 60-95 กรัม[8] มีการใช้ฮอร์โมน 17β-estradiol ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศเมียเหนี่ยวนำเพศปลาหมอให้เป็นเพศเมีย[9]

การนำฮอร์โมนสังเคราะห์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของฮอร์โมนในอาหารและสิ่งแวดล้อม เช่น แหล่งน้ำหรือดินสำหรับการทำเกษตรกรรม มีรายงานพบการสะสมของฮอร์โมนอยู่ในตะกอนจากกระชังเลี้ยงปลา โดยพบฮอร์โมนเพศหญิงชนิด estrone สะสมอยู่ในตะกอน 0-0.17 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสะสมในปลา 0.09-1.24 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม[10] พบการตกค้างของฮอร์โมนชนิด estriol ในน้ำบริเวณลำคลองจังหวัดระยองและชลบุรี 0.001-0.063 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในน้ำทะเลบริเวณมาบตาพุด 0.001-0.004 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในหอยแมลงภู่ (Pernaviridis) 0.001-0.153 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม[11] และมีรายงานพบการตกค้าง testosterone ในผลิตภัณฑ์ปลาจากตลาดค้าปลีกเมืองกรุงไคโร ประเทศอิยิปต์ ได้แก่ เบอร์เกอร์ปลา ลูกชิ้นปลา และปลาแท่ง 0.1-1.32, 0.01-0.20 และ 0.13-1.28 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ[12] โดยทั่วไปมนุษย์และสัตว์สามารถขับฮอร์โมนส่วนเกินออกจากร่างกายทางปัสสาวะและอุจจาระได้[13] แต่หากมนุษย์ได้สัมผัสหรือบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนฮอร์โมนจากสิ่งแวดล้อมสะสมอาจมีผลกระทบต่อสุขภาพโดยเฉพาะระบบสืบพันธุ์ เช่น เกิดภาวะแท้งบุตรในสตรีวัยเจริญพันธุ์ เนื่องจากสารเหล่านี้ส่งผลต่อการลดระดับการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ในร่างกาย และในเพศชายอาจพบภาวะการถดถอยของจำนวนหรือคุณภาพของอสุจิลดลง[14] สารสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิด 17β-estradiol หากเข้าสู่ร่างกายจะเกิดกระบวนการ metabolism เป็น estrone และ estriol มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งเต้านม[15] การตกค้างของฮอร์โมน testosterone มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในต่อมน้ำนม ปากมดลูก มดลูก และต่อมลูกหมาก ทำให้เด็กหญิงและชายเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็ว[12] โดย Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ได้กำหนดค่า acceptable daily intake (ADI) ของสารสเตียรอยด์ฮอร์โมน 17β-estradiol ที่ 0-0.05 μg/kg bw/day และ testosterone ที่ 0-2 μg/kg bw/day เพื่อเป็นการเฝ้าระวังผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์[16] ในขณะที่สหภาพยุโรป (European Union; EU) ได้ประกาศห้ามใช้ฮอร์โมนทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ 17β-estradiol, melengestrol acetate, progesterone, testosterone, trenbolone acetate และ zeranol ในการทำปศุสัตว์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อปกป้องกลุ่มคนเปราะบางต่อการได้รับสารสเตียรอยด์ฮอร์โมน เช่น เด็กที่ยังไม่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์[17]

เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนในเนื้อสัตว์มีหลากหลาย ส่วนใหญ่นิยมตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS/MS หรือ LC-MS/MS นอกจากนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนได้ด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพใช้ตรวจคัดกรองได้อย่างรวดเร็ว ราคาถูก และตรวจวิเคราะห์หลายตัวอย่างได้พร้อมกัน[18,19] เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) สามารถใช้ในการวิเคราะห์ในรูปแบบ semi-quantitative ที่มีขีดจำกัดการตรวจพบในระดับต่ำและมีความจำเพาะสูง แต่มีข้อจำกัด คือ 1 ชุดตรวจ สามารถระบุได้เพียง 1 ชนิดสารเท่านั้น ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองสารเคมี และก่อให้เกิด waste จำนวนมาก[20,21] ซึ่งหากตรวจพบต้องมีการยืนยันผลอีกครั้งด้วยเทคนิคขั้นสูง เทคนิค GC-MS/MS หรือ LC-MS/MS เป็นการตรวจวัดด้วยมวลต่อประจุ มีความจำเพาะความไวสูง สามารถตรวจยืนยันชนิด และวัดปริมาณสารที่ตรวจพบได้ถูกต้องแม่นยำ สามารถแยกสารที่สนใจออกจากสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงหรือสัญญาณรบกวนได้ ทำให้ตรวจวัดได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำเหมาะสำหรับการตรวจสารที่ไม่อนุญาตให้ใช้หรือไม่มีค่ากำหนด แต่ข้อจำกัดของเทคนิค GC-MS/MS คือ สารที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นสารที่ระเหยได้ (volatile compounds) ซึ่งสารกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนมีความสามารถในการระเหยต่ำ ดังนั้นการวิเคราะห์ต้องผ่านการเตรียมสารให้อยู่ในรูปที่ระเหยได้ง่าย โดยการทำอนุพันธ์ด้วยปฏิกิริยาเคมีหรือกระบวนการ derivatization ก่อนตรวจวัด ซึ่งสิ้นเปลืองทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย[22,23] เทคนิค LC-MS/MS ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการสกัดแล้วสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยตรง มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ฮอร์โมนหลายชนิดได้พร้อมกันในครั้งเดียว[24] สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้นำเทคนิคนี้มาใช้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมน 3 ชนิด ได้แก่ 17α-estradiol, 17ß-estradiol และ testosterone ในเนื้อปลาเพื่อรองรับประกาศของ EU โดยใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง คือ UPLC-MS/MS ทำการปรับสภาวะเครื่องมือ และ mobile phase ให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณฮอร์โมน 17α-estradiol และ 17ß-estradiol ออกจากกันได้ เนื่องจากประกาศของ EU ระบุห้ามใช้สารชนิด 17ß-estradiol อย่างชัดเจน รวมถึงพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ได้ในความเข้มข้นต่ำ ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ตาม EURACHEM Guide 2014[25] เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความถูกต้องเหมาะสม วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จึงสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อประโยชน์ในการเฝ้าระวังความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค สำรวจปริมาณการปนเปื้อนของสารกลุ่มฮอร์โมนในอาหารและสิ่งแวดล้อม ได้ข้อมูลระดับการปนเปื้อนของฮอร์โมนและนำไปควบคุมการใช้สารกลุ่มฮอร์โมนอย่างถูกต้องให้กับภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม รวมถึงใช้ข้อมูลปริมาณการตกค้างฮอร์โมนเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่ตรวจพบในอาหารและสิ่งแวดล้อมเพื่อรองรับกฎหมายในประเทศไทย

วัสดุและวีธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: acetonitrile (HPLC, Merck, Germany), hexane (HPLC, Burdick & Jackson, Korea), methanol (HPLC, Merck, Germany), formic acid (AR grade, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98, Fisher) และ DI water (Type I มีค่า resistivity > 18 mΩ.cm)

สารมาตรฐาน: 17α-estradiol, 17ß-estradiol, testosterone (ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer GmbH, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 95, Germany) และ internal standard zeranol-D5 (ผลิตภัณฑ์ของ Witega Laboratorien Berlin, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99, Germany)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียม stock standard แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐาน 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย methanol 10 มิลลิลิตร มีอายุการใช้งาน 1 ปี เตรียม mixed intermediate standard

โดยเจือจาง stock standard 3 ชนิด ผสมด้วยกันให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol มีอายุการใช้งาน 3 เดือน เตรียม mixed working standard ความเข้มข้น 1 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

เตรียม stock internal standard ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสาร 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เตรียม intermediate internal standard โดยเจือจาง stock internal standard ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol และเตรียม working internal standard ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol มีอายุการใช้งานตามใบรับรอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

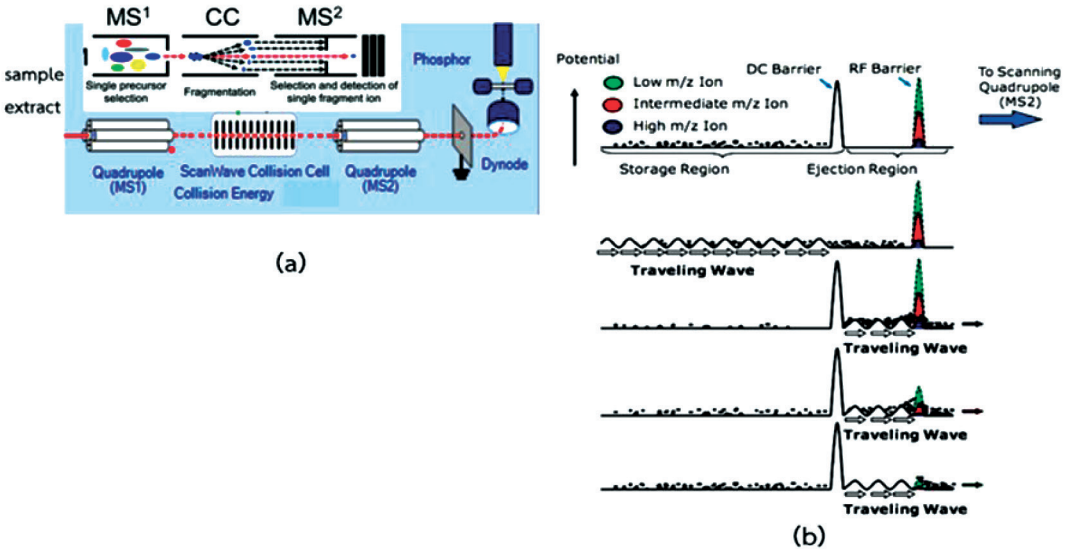
เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.001 กรัม (Sartorius, รุ่น LC 620S และ 0.01 มิลลิกรัม Sartorius, รุ่น MC 210S), เครื่องบดปั่น (Tefal, DPA130, France), refrigerated centrifuge (Hermle, Z366K, Hermle Labortechnik, Germany), shaker (Yamato, SA300, JICA, Japan), vortex mixer (Vortex Genie2, G 560 E, Scientific Industries, USA.), nitrogen evaporator (Organomation, N-EVAP 34 position, USA.), nitrogen gas (ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99.9), micro pipette ขนาด 2-20, 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Research plus, Germany), screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, glass test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.20 ไมโครเมตร ชนิด PVDF (Vertical, Vertical Chromatography, Thailand), cellulose nitrate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร 0.2 ไมโครเมตร (Vertical, Vertical Chromatography, Thailand), HPLC vial สีชา ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ solid phase extraction cartridges (SPE) Oasis HLB 6 cc (200 มิลลิกรัม) (Oasis, HLB, Waters, Ireland)

เครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) รุ่น ACQUITY UPLC I-Class (Waters™, USA), Zorbax SB C-18 (150 mm × 3 mm, 5 μm, Agilent Technologies, USA) โดยมีสภาวะอุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส injection volume 5 ไมโครลิตร deionized water เป็น mobile phase A และ methanol เป็น mobile phase B การแยกสารกลุ่มฮอร์โมนเป็นแบบ gradient ดังแสดงในตารางที่ 1

เครื่อง Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) ชนิด Triple Quadrupole Analyzers รุ่น Xevo TQ-XS, (Waters™, USA) ใช้เทคนิค electrospray ionization (ESI) multiple reaction monitoring (MRM) mode ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยมีสภาวะ Polarity: negative & positive, Capillary voltage: 3.0 KV, Cone gas Flow: 150 L/hr, Desolvation temperature: 500 องศาเซลเซียส, Desolvation gas flow: 800 L/hr, Source temperature: 150 L/hr โดยมีพารามิเตอร์ mass spectrometer ดังแสดงในตารางที่ 2

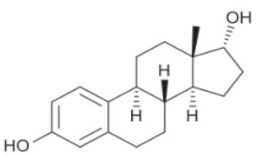
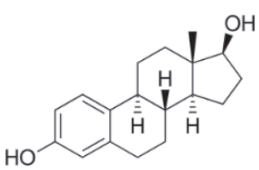
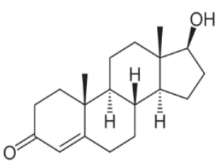
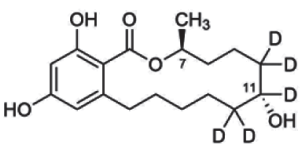
ตารางที่ 1 Gradient UPLC conditions สำหรับสารกลุ่มฮอร์โมน

Time (min)	Mobile phase A	Mobile phase B	Flow rate (ml/min)
0.0	50	50	0.30
8.0	35	65	0.30
11.0	25	75	0.30
12.0	0	100	0.30
14.0	10	90	0.30
16.0	10	90	0.30
18.0	50	50	0.30



ภาพที่ 1 แสดงการทำงานของ MRM mode (a) และการทำงานของ ScanWave collision cell (b) (ภาพจากเอกสารการบรรยายของบริษัท WatersTM, https: //doi.org/10.1039/C9AN02145K)

ตารางที่ 2 The specific MS/MS parameters for hormones

No.	Compound Structure	Parention (m/z)	Productions (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	ESI polarity	Transition type
1	17α-estradiol 	271.2	145.0	-2	-28	Negative	Quantification
		271.2	239.1	-2	-42		Qualification
2	17ß-estradiol 	271.2	145.0	-2	-42	Negative	Quantification
		271.2	183.0	-2	-40		Qualification
3	testosterone 	289.4	97.1	38	22	Positive	Quantification
		289.4	109.1	38	20		Qualification
4	zeranol-d_5 	326.2	264.2	-48	-24	Negative	

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ใช้เนื้อปลานิลเป็นตัวแทน (representative matrix) ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้ตัวอย่างปลานิล ประมาณ 1 กิโลกรัม จากตลาดสด แล่เฉพาะเนื้อส่วนที่กินได้ ตัดส่วนที่เป็นไขมันและหนังออก หั่นตัวอย่างเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดด้วยเครื่องบดปั่นจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ทดสอบตามวิธีตัวอย่างที่ตรวจไม่พบการตกค้างของสารกลุ่มฮอร์โมน นำมาใช้เป็น matrix blank ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

การเตรียมตัวอย่าง ชั่งตัวอย่าง 2±0.005 กรัม ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม internal standard ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ DI water 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม methanol 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้น methanol ทั้งหมดใส่ในหลอด centrifuge tubes สกัดซ้ำด้วย methanol 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสกัดได้ทั้ง 2 ครั้ง ผสมรวมกันเติม hexane อิ่มตัวด้วย methanol 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้น hexane ทิ้ง และดูดชั้น methanol 7.5 มิลลิลิตร ใส่ใน test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร ระเหยด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ให้เหลือประมาณ 500 ไมโครลิตร เติม DI water 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที และทำการ clean-up สารที่สกัดได้ ด้วย SPE Oasis HLB 6 cc (200 มิลลิกรัม) ที่ถูก pre-washing ด้วย methanol 5 มิลลิลิตร และ DI water 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นใส่สารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดลงใน cartridge ล้าง cartridge ด้วย acetonitrile:DI water อัตราส่วน 20:80 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ eluted ด้วย acetonitrile 10 มิลลิลิตร โดยทุกขั้นตอนต้องควบคุมให้มีอัตราการไหลสม่ำเสมอ และ cartridge ไม่แห้ง เก็บ eluent ใน glass test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ให้แห้ง จากนั้นละลายสารที่สกัดได้ด้วย 0.1% formic acid:methanol อัตราส่วน 65:35 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน PVDF filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ตัวอย่าง

ใช้เนื้อปลานิลเป็นตัวแทนในการทดสอบความถูกต้องของวิธี

การวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

วิเคราะห์ method blank โดยสกัดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาซึ่งใช้สารเคมีทั้งหมดแต่ไม่มีการเติมตัวอย่าง วิเคราะห์ matrix blank โดยสกัดตัวอย่างเนื้อปลาที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารกลุ่มฮอร์โมนและเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สกัดตามวิธีวิเคราะห์ข้างต้น จากนั้นฉีดสารสกัด method blank และ matrix blank เข้าเครื่อง UPLC-MS/MS เพื่อพิจารณาว่ามี m/z หรือ peak รบกวนที่มีค่า retention time ตรงกับตำแหน่งสารมาตรฐานกลุ่มฮอร์โมนหรือไม่

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและ matrix effect

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone ความเข้มข้น 7 ระดับ ได้แก่ 0, 2, 5, 10, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติม internal standard ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละสายผสม 0.1% formic acid:methanol อัตราส่วน 65:35 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง concentration ratio (แกน x) กับ peak area ratio (แกน y) ของสารมาตรฐานต่อ internal standard คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient determination; R^2) เกณฑ์ยอมรับ ≥ 0.951[26] คำนวณหา residuals plot เมื่อ calibration curve เป็นเส้นตรง และทดสอบ matrix effect ในขั้นตอนต่อไป

ทดสอบ matrix effect โดยเตรียม standard on matrix[27] ให้มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับสารละลายมาตรฐานที่ทำกราฟมาตรฐานและเติม internal standard ในทุกหลอด สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ standard on solution (แกน x) กับ standard on matrix (แกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval; CI) ของความชัน (slope) โดยค่า CI ต้องคลุม 1 ซึ่งแสดงว่าไม่มี matrix effect ดังสมการที่ 1 หรือทำการทดสอบ matrix effect (%ME) ถ้า %ME น้อยกว่า ±20% แสดงว่าเมทริกซ์ไม่มีผลกระทบสามารถใช้ standard on solution ถ้า %ME มากกว่า ±20% แสดงว่าเมทริกซ์มีผลกระทบ ดังสมการที่ 2 ดังนั้นต้องเลือกใช้ standard calibration curve ที่เหมาะสมมาคำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง

$$CI_{slope} = b \pm t_{(0.05,\ n-2)} S_b$$

เมื่อ b = slope

$t_{(0.05,\ n-2)}$ = t-distribution (two-tail) ที่ระดับความเชื่อมัน 95%, degree of freedom = n-2

S_b = standare deviation ของ slope

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

$$\%\ ME = \left(\frac{\text{slope of matrix}}{\text{slope of solvent}} - 1\right) \times 100 \qquad \text{สมการที่ 2}$$

กรณี %ME เป็นบวกมากกว่า 20% แสดงว่าเกิดการเสริมสัญญาณไอออน (ion enhancement) และหาก %ME เป็นลบน้อยกว่า -20% แสดงว่าเกิดการกดสัญญาณไอออน (ion suppression)[28]

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบ matrix blank และ matrix spiked ในเนื้อปลาที่เติมสารมาตรฐาน 17α-estradiol, 17ß-estradiol, testosterone และ zeranol-d5 ความเข้มข้น 50 ng/g จำนวน 3 ซ้ำ นำเข้าเครื่อง UPLC-MS/MS ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยพิจารณา matrix blank ต้องไม่พบสัญญาณพีคที่ตรงกับสารที่สนใจและ matrix spiked ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด สามารถแยกพีคออกจากกันได้

การสร้างกราฟมาตรฐาน (procedural mixed standard calibration curve)[27]

ชั่ง matrix blank จำนวน 7 หลอด เติมสารมาตรฐาน 17α-estradiol, 17ß-estradiol และ testosterone ที่ 7 ระดับความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกหลอด สกัดและทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง concentration ratio (แกน x) กับ peak area ratio (แกน y) ของสารมาตรฐานต่อ internal standard ยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วยการคำนวณหาค่า R^2 เกณฑ์ยอมรับ ≥ 0.951[26]

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank และเติม internal standard ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกหลอด วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio (แกน x) กับ peak area ratio (แกน y) ของสารมาตรฐานต่อ internal standard

ยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วยการคำนวณหาค่า R^2 เกณฑ์ยอมรับ ≥ 0.951[26] และสร้าง residual plot

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่ำ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ 10 ซ้ำ ผลที่ได้ต้องให้สัญญาณค่า signal/noise > 3

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ 10 ซ้ำ และคำนวณปริมาณเปรียบเทียบกับ calibration curve จากนั้นคำนวณ %recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 70-120[26,29] %RSD ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม < 30%[26,29] และค่า HORRAT (Horwitz ratio) ≤ 2[30] คำนวณ HORRAT จากสมการ

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSDr}}{\text{Predieted RSDr}}$$

การทดสอบความแม่นและความเที่ยง (accuracy and precision)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณปริมาณเปรียบเทียบกับ calibration curve คำนวณค่าเฉลี่ย %recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 70-120[26,29] %RSD ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม < 30%[26,29] และค่า HORRAT (Horwitz ratio) ≤ 2[30]

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด[31] คำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนจากทุกแหล่ง ได้แก่ น้ำหนัก ปริมาตร กราฟมาตรฐาน ความเที่ยง และความแม่น คำนวณค่าความไม่แน่นอนรวมทั้งหมด จากนั้นหาค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k = 2) เพื่อการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ

ผล

ผลการวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

พบว่า method blank และ matrix blank ของเนื้อปลา ไม่พบสัญญาณรบกวนที่มี m/z และ retention time (RT) ตรงกับสารมาตรฐานทุกชนิด ดังแสดงในภาพที่ 2 แสดงว่าสารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างและ matrix blank ของเนื้อปลาที่ผ่านการทดสอบตามวิธีแล้ว ไม่ปนเปื้อนของสารกลุ่มฮอร์โมน

ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

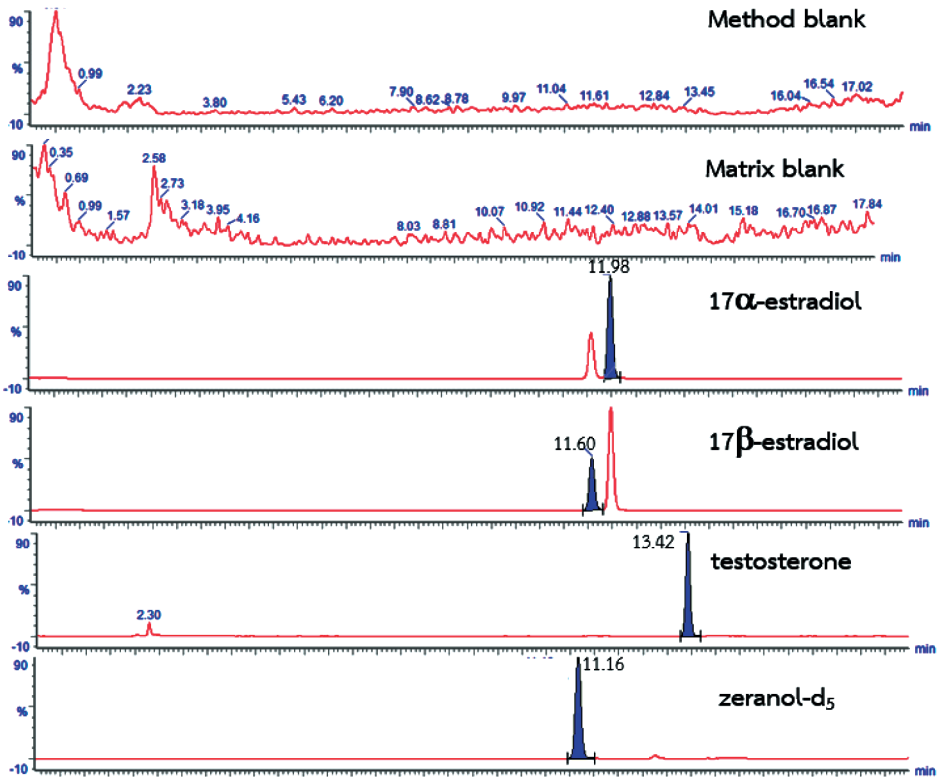
matrix blank ไม่พบสัญญาณพีคที่ตรงกับสารที่สนใจและ matrix spiked ที่เติมสารมาตรฐาน

17α-estradiol, 17ß-estradiol, testosterone และ zeranol-d5 ในเนื้อปลา พบว่าสามารถแยกพีคของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ออกจากกันได้ โดยมีค่า retention time 11.98, 11.60, 13.42 และ 11.16 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 แสดงว่าวิธีการทดสอบนี้มีความจำเพาะเจาะจง

ผลการทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์

ผลการทดสอบ matrix effect พบว่าความเป็นเส้นตรงของสาร 17α-estradiol, 17ß-estradiol และ testosterone ใน standard on solution กับ standard on matrix มีค่าความชันต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 3 และมีค่าช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval; CI) ของความชัน 17α-estradiol, 17ß-estradiol และ testosterone เท่ากับ 0.34-0.37,

0.11–0.12 และ 0.16–0.18 ตามลำดับ ซึ่งค่าความชันที่ได้ไม่คลุม 1 แสดงว่าเมทริกซ์เนื้อปลามีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีผลต่อการวิเคราะห์แบบกดสัญญาณ (suppression) โดย %ME ของสารทั้ง 3 สาร มีค่าน้อยกว่า -20% ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นการสร้างกราฟมาตรฐาน สำหรับการทดสอบนี้เลือกทำแบบ procedural mixed standard calibration curve



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของ method blank, matrix blank และ matrix spiked สารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

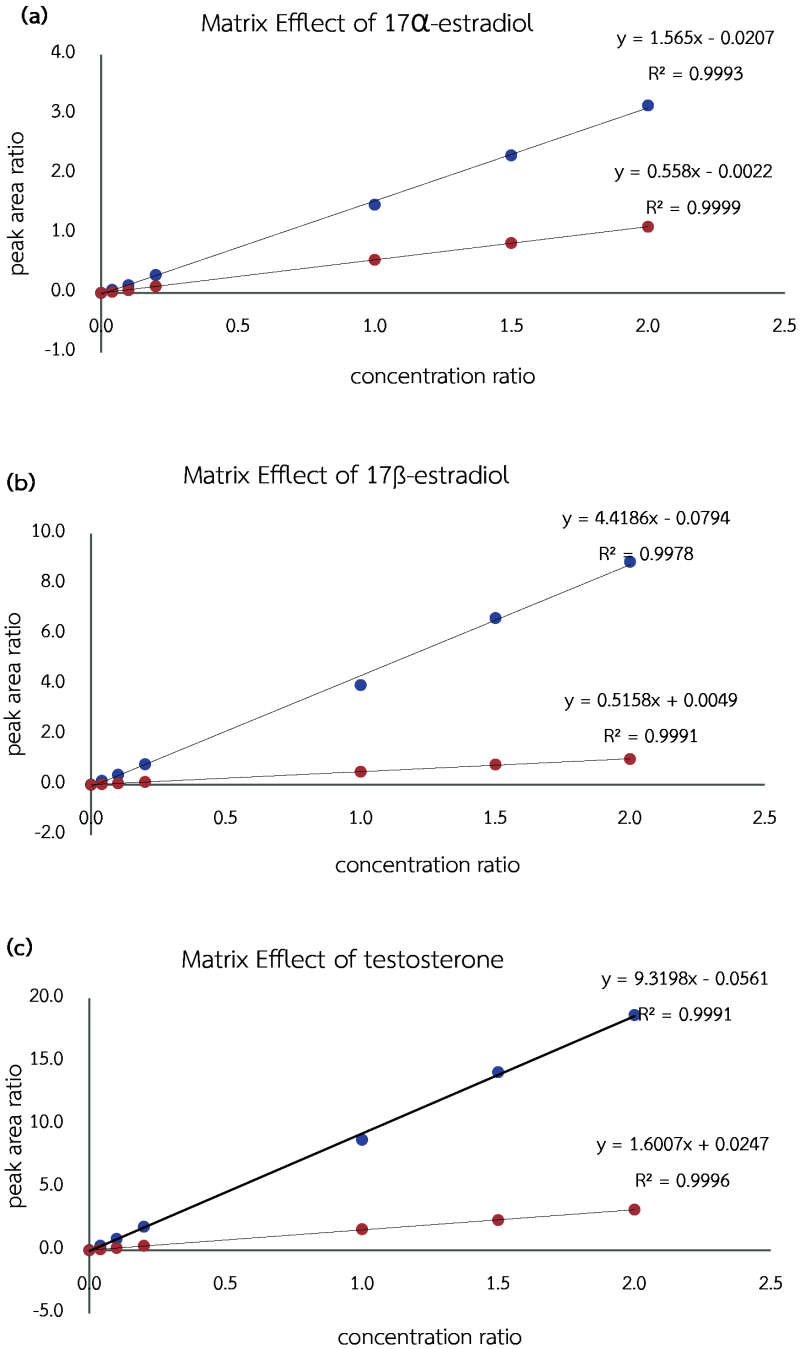
กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone ที่ช่วงความเข้มข้น 2–100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรง โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999, 0.9991 และ 0.9996 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ยอมรับที่ 0.951[26]

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone ในช่วงความเข้มข้น 2–100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีความเป็นเส้นตรง โดยค่า R^2 เข้าใกล้ 1 เท่ากับ 0.9971, 0.9942 และ 0.9738 ตามลำดับ และ residual plot เส้นกราฟมีความเป็นเส้นตรง โดยมีการกระจายของ y-residual plot รอบค่าศูนย์ ดังแสดงในภาพที่ 4

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

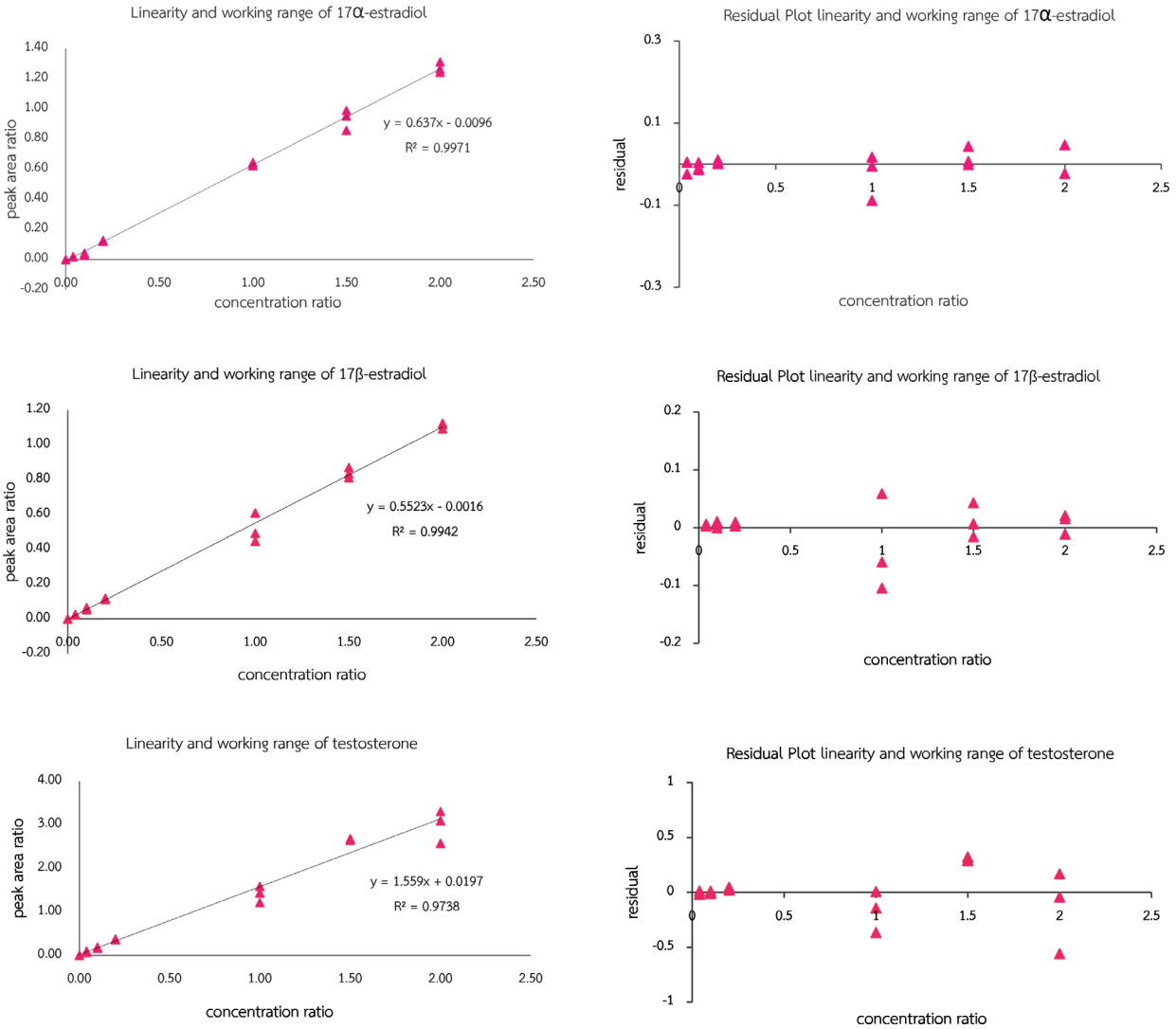
ผล LOD ของสารกลุ่มฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิด พบว่าเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้สัญญาณ signal to noise ในช่วง 14.5–70.8 ซึ่งมากกว่าเกณฑ์กำหนด คือ 3 ส่วนค่า LOQ เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐาน วิเคราะห์ 10 ซ้ำ พบว่ามีความแม่นที่ประเมินจากค่าเฉลี่ย %recovery ในช่วง 91.9–113.7% และความเที่ยงจาก %RSD และ HORRAT ในช่วง 5.5–26.5% และ 0.2–1.0 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของสาร (a) 17α-estradiol, (b) 17β-estradiol และ (c) testosterone ใน standard on solution กับ standard on matrix

ตารางที่ 3 ค่า %ME ของสารทั้ง 3 ชนิด ใน standard on solution กับ standard on matrix

Compound	%ME	Evaluation
17α-estradiol	-64.3	suppression
17β-estradiol	-88.3	suppression
testosterone	-82.8	suppression



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างของ concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน 17α-estradiol, 17β-estradiol, testosterone และการตกค้าง (residual plot)

ตารางที่ 4 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของการวิเคราะห์ฮอร์โมนเพศ

	17α-estradiol	17β-estradiol	testosterone	เกณฑ์ยอมรับ
Limit of Detection (LOD) 1 µg/kg				
Range of S/N	15.6–32.1	46.1–70.8	14.5–23.0	S/N > 3
Average S/N	23.4	59.0	18.5	S/N > 3
Limit of Quantification (LOQ) 2 µg/kg				
Average conc. (µg/kg)	2.3	2.1	1.8	-
Recovery (%)	113.7	104.7	91.9	70–120
Relative standard deviation (%RSD)	5.5	9.7	26.5	< 30
%RSDexpected	26.9	26.9	26.9	-
HORRAT	0.2	0.4	1.0	≤ 2

การทดสอบค่าความแม่นและความเที่ยง

การทดสอบค่าความแม่นและความเที่ยงของวิธีที่ระดับความเข้มข้น 2, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ให้ค่าความแม่น (accuracy) แสดงโดย mean recovery ของสาร 17α-estradiol, 17ß-estradiol และ testosterone อยู่ในช่วง 107.6-113.6, 89.7-114.0 และ 91.9-107.0% ตามลำดับ ซึ่ง %recovery ทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วงการยอมรับ 70-120% และมีความเที่ยง (precision) แสดงโดย %RSD และ HORRAT ซึ่งอยู่ในช่วง 3.5-26.5% และ 0.2-1.0 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบค่าความแม่นและความเที่ยง (accuracy and precision)

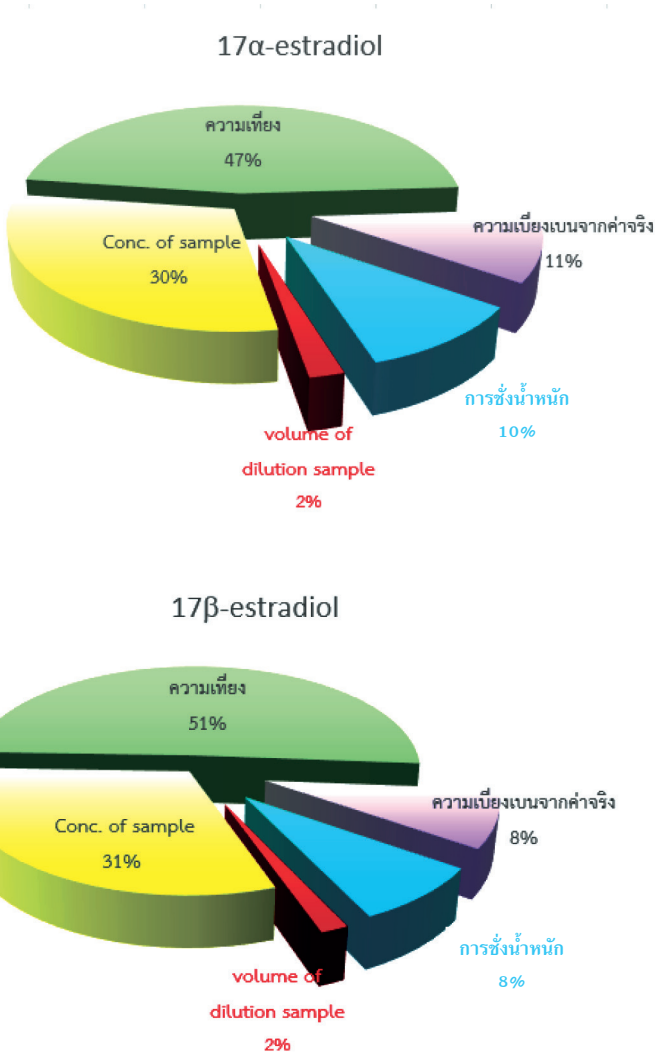
Compound	Spiked level (µg/kg)	%Recovery (n = 10) (Min - Max)	Mean±SD	%RSD	$\%RSD_{expected}$	HORRAT
17α-estradiol	2	102.4-119.7	113.6±6.2	5.5	26.9	0.2
	50	87.6-118.7	107.6±9.0	8.3	16.6	0.5
	100	98.8-118.6	110.7±5.8	5.2	14.9	0.3
17ß-estradiol	2	85.7-118.6	104.7±10.1	9.7	26.9	0.4
	50	77.7-105.4	89.7±10.2	11.4	16.6	0.7
	100	106.4-119.0	114.0±3.9	3.5	14.9	0.2
testosterone	2	60.2-118.7	91.9±24.3	26.5	26.9	1.0
	50	71.5-119.1	107.0±14.4	13.6	16.6	0.8
	100	83.7-116.6	101.4±14.1	13.9	14.9	0.9

ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

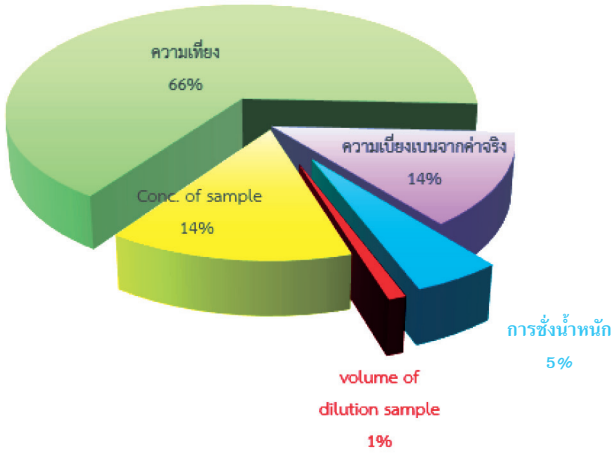
สาร 17α-estradiol, 17ß-estradiol และ testosterone ในเนื้อปลาตามแนวของ ISO GUM Approach พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนัก volume of dilution sample ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve (concentration of sample) ความเที่ยงและความเบี่ยงเบนจากค่าจริง เมื่อคำนวณ relative standard uncertainty น้อยกว่า 20% และค่าความไม่แน่นอนขยายของสาร 17α-estradiol, 17ß-estradiol และ testosterone เท่ากับ ±8.5, 10.2 และ 23.5 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, k = 2 ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสาร 17α-estradiol จากมากไปหาน้อย ได้แก่ ความเที่ยง (47%) ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน (30%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (11%) การชั่งน้ำหนัก (10%) และ volume of dilution sample (2%) 17ß-estradiol ได้แก่ ความเที่ยง (51%) ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน (31%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (8%) การชั่งน้ำหนัก (8%) และ volume of dilution sample (2%) สำหรับ testosterone ได้แก่ ความเที่ยง (66%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (14%) ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน (14%) การน้ำหนัก (5%) และ volume of dilution sample (1%) ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยเกณฑ์ความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอนต้องมีค่าน้อยกว่า predicted Horwitz's RSDR × $2^{(30)}$ เมื่อพิจารณาพบว่าค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% มีค่าน้อยกว่าเกณฑ์ยอมรับ (16.6 × 2 = 33.2)

ตารางที่ 6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สาร 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone

Source of uncertainty	Unit	17α-estradiol			17β-estradiol			testosterone		
		X	u(x)	Percent	x	u(x)	Percent	X	u(x)	Percent
การชั่งน้ำหนัก	g	2	0.03	10.0	2	0.03	8.0	2	0.03	5.0
Volume of dilution sample	mL	2	0.01	2.0	2	0.01	2.0	2	0.01	1.0
Concentration of sample	µg/kg	53.31	2.21	30.0	48.26	2.60	30.0	59.39	2.44	14.0
ความเที่ยง	%	100	6.46	47.0	100	8.85	47.0	100	18.89	66.0
ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง	%	100	1.48	11.0	100	1.48	8.0	100	3.84	14.0
- Combined relative standard uncertainty of sample conc.	µg/kg	53.31	4.2	100	48.26	5.1	100	59.39	11.7	100
- Expanded Uncertainty at C.I. 95% (k = 2)			8.5			10.2			23.5	



ภาพที่ 5 สัดส่วนองค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สาร 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone ในเนื้อปลา



ภาพที่ 5 สัดส่วนองค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สาร 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone ในเนื้อปลา (ต่อ)

วิจารณ์

สารกลุ่มฮอร์โมนเพศหรือสเตียรอยด์ฮอร์โมนมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก ประกอบด้วย คาร์บอน 18–21 อะตอม ไฮโดรเจนและออกซิเจน 2 อะตอม มีคุณสมบัติเป็นสารไม่มีขั้ว (hydrophobic) ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเฉพาะไขมันและแอลกอฮอล์ จากการศึกษางานวิจัยตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารกลุ่มฮอร์โมนเพศ ได้แก่ methanol[24,32,33] และ ethyl acetate[34] โดยเฉพาะ methanol มีคุณสมบัติช่วยตกตะกอนโปรตีนส่งผลให้ %recovery เพิ่มขึ้น เนื่องจากสามารถกำจัดสิ่งรบกวนจากตัวอย่างได้ วิธีที่พัฒนานี้วิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนได้ 3 ชนิด ได้แก่ 17α-estradiol, 17β-estradiol และ testosterone ในการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีนอกจากมีการทดสอบ specificity, accuracy, precision, linearity และ working range ยังทดสอบ matrix effect พบว่าเนื้อปลามีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการวิเคราะห์ในลักษณะของการกดสัญญาณ ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณที่ตรวจวัดได้ต่ำกว่าค่าจริง จึงต้องคำนวณผลด้วย procedural mixed standard calibration curve โดยการเติมสารมาตรฐานใน matrix ชนิดเนื้อเยื่อเหมือนกันแทนการทำ calibration curve on solution และใช้ internal standard ในการควบคุมและลดความผิดพลาดในกระบวนการทดสอบ การสร้างกราฟมาตรฐานจะเป็นการเปรียบเทียบเป็นสัดส่วน (ratio) โดย plot ระหว่าง concentration ratio กับ response ratio ของ standard กับ internal standard ซึ่งการคำนวณเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนช่วยชดเชยค่าการกลับคืนได้ทำให้ precision และ accuracy ที่ดี[24] ในการเลือกสารที่ใช้เป็น internal standard ส่วนใหญ่เป็นสาร isotope ของสารนั้นเพราะมีคุณสมบัติคล้ายกัน ไม่รบกวนการทดสอบ แต่สาร isotope มีราคาสูงและสารบางชนิดมีขั้นตอนการสั่งซื้อยากทำให้ไม่สามารถหา internal standard ได้ตามที่ระบุ ในการทดสอบนี้เลือกใช้ zeranol-d5 เป็น internal standard เพียงชนิดเดียวในการคำนวณปริมาณที่ตรวจพบกับสารกลุ่มฮอร์โมนทุกสาร ส่งผลทำให้ค่าความไม่แน่นอนของ method precision มีค่าสูงมากกว่า 60% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความไม่แน่นอนที่มาจากแหล่งอื่น เมื่อพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอนจาก predicted Horwitz's RSDR × 2[30] พบว่าค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% มีค่าน้อยกว่าเกณฑ์ยอมรับ วิธีการนี้จึงมีความเหมาะสม

ตามประกาศของ EU มีการระบุห้ามใช้ฮอร์โมน 6 ชนิด ได้แก่ 17β-estradiol, melengestrol acetate, progesterone, testosterone, trenbolone acetate และ zeranol โดยระบุชนิดสาร 17β-estradiol อย่างชัดเจน ดังนั้นในการวิเคราะห์ควรเป็นวิธีที่ตรวจวิเคราะห์

การตกค้างในปริมาณต่ำและสามารถแยก 17ß-estradiol และ 17α-estradiol อย่างชัดเจน เนื่องจากสาร 17ß-estradiol และ 17α-estradiol ทั้ง 2 ชนิด เป็น isomer กัน มีสูตรโมเลกุล และค่า m/z เท่ากัน ทั้ง parent ion และ product ion ทำให้สารทั้งสองแยกจากกันได้ยาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงตรวจวัดชนิดและปริมาณสารกลุ่มฮอร์โมนด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS Xevo TQ-XS ส่วน LC เป็นชนิด ultra performance liquid chromatography มีคุณสมบัติทนความดันได้มากถึง 15,000 psi สามารถใช้ injection volume และ mobile phase ปริมาณน้อย และเปลี่ยน mobile phase เป็น DI water:methanol นอกจากนี้ detector เป็น MS/MS รุ่น Xevo TQ-XS ส่วน collision cell ถูกออกแบบการทำงานเป็น ScanWave Daughter mode โดยมี DC barrier และ RF barrier เป็นตัวกัก parent ion และ daughter ion ก่อน แล้วปล่อยสู่ MS2 พร้อมกัน ดังแสดงในภาพที่ 1 ทำให้ sensitivity เพิ่มขึ้นจึงทำให้สัญญาณที่ได้มี intensity สูง แยกสาร 17α-estradiol และ 17ß-estradiol ได้อย่างชัดเจน รวมถึงสามารถตรวจวัดได้ระดับต่ำที่ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ได้ดำเนินการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความมั่นใจผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยกำหนดไว้ไม่เกิน 10 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ spiked sample การศึกษานี้สามารถขยายผลโดยนำวิธีไปใช้เพื่อสำรวจการตกค้างของฮอร์โมนเพศในเนื้อปลาที่วางจำหน่ายในท้องตลาด เป็นการเฝ้าระวังความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อปลาในประเทศไทย

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสารกลุ่มฮอร์โมนเพศทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ 17α-estradiol, 17ß-estradiol และ testosterone ในเนื้อปลา โดยเทคนิค UPLC-MS/MS มีค่า LOD และ LOQ เป็น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 2–100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดี มีค่าความถูกต้อง แม่นยำ มีความไว และความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์ และให้บริการในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายและสำรวจติดตามปริมาณการตกค้างของสารกลุ่มฮอร์โมนเพศ สร้างความมั่นใจในความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค ป้องกันการกีดกันทางการค้า และการผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมสำหรับเกษตรกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบดำเนินงานจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ผ่านทางอาจารย์หัวหน้าชุดโครงการของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ขอขอบคุณนางเลขา ปราสาททอง ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้การสนับสนุนโครงการศึกษานี้ และนางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ สำหรับการเป็นที่ปรึกษาด้านวิชาการ จนการศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Ferretti G, Ferranti C, Crovella T, Fiori M, Civitareale C, Marchiafava C, et al. Simultaneous analysis of 17α-estradiol and 17ß-estradiol in bovine serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B 2008; 871(1): 135-40.
2. มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์. ฮอร์โมน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 2 ส.ค. 2564]; [20 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.shorturl.asia/6cYUK.
3. เจนนุช ว่องธวัชชัย, พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์, นิอร วินารักษ์วงศ์. ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะสั้น. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 2 ส.ค. 2564]; [83 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/56651.
4. สุชาติ จุลอดุง, กฤษณุพันธ์ โกเมนไปรรินทร์. ศึกษาการใช้ฮอร์โมน 17ß-estradiol ในการแปลงเพศปลาหมอให้เป็นเพศเมีย. เอกสารวิชาการฉบับที่

7/2550. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2550.
5. วีรพล เรืองศรี. ผลของฮอร์โมนเอสโตรเจน 2 ชนิด ต่อการผลิตลูกปลาหมอแปลงเพศ. ว การประมงอิเล็กทรอนิกส์ 2563; 3(3): 37-55.
6. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีประมง กรมประมง. การเพาะเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด; 2553.
7. ธงชัย เย็นเปิง, ธราพันธ์ วัฒนะมหาตม์, วรวิทย์ พรหมปากดี, สมศรี งามวงศ์ชน. การศึกษาระดับของฮอร์โมน (17 alpha methyltestosterone) ที่ตกค้างในการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศ ระบบน้ำหมุนเวียน. กรุงเทพฯ: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง; 2554.
8. จอมสุดา ดวงวงษา. การแปลงเพศปลาหมอไทยด้วยเอสโตรเจนชนิดธรรมชาติ (Premarin) ให้ได้เพศเมียล้วน. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้; 2555.
9. พรศักดิ์ มัทวงศ์, ศิริภาวี เจริญวัฒนศักดิ์, บัณฑิต ยวงสร้อย, สุธี วงศ์มณีประทีป. ผลของ 17ß-estradiol ต่อการเปลี่ยนแปลงเพศปลาหมอไทยในระยะไข่โดยวิธีการแช่. ว แก่นเกษตร 2556; 41(พิเศษ 1): 110-5.
10. เสาวนีย์ ตีมูล, จรูญ สารินทร์, กนกทิพย์ จักษุ, Guang-Guo Ying, ชาญยุทธ กฤตสุนันท์กุล, สริน ศรีปรางค์. สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในน้ำ ตะกอน และปลา ในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก. ว วิชาการสาธารณสุข 2562; 28(1): 69-80.
11. Ocharoen Y, Boonphakdee C, Boonphakdee T, Shinn AP, Moonmangmee S. High levels of the endocrine disruptors bisphenol-A and 17ß-estradiol detected in populations of green mussel, Perna viridis, culture in the Gulf of Thailand. Aquac 2018; 497: 348-56.
12. Samy Abu-Taleb SM, Osman TA, Faisal RA. Detection of Testosterone hormone and 17α-Methyltestosterone residues in some fish products at retailed markets. Egypt J Chem Environ Health 2016; 2(2): 292-7.
13. Ying GG, Kookana SR, Ru YJ. Occurrence and fate of hormone steroids in environment. Environ Int 2002; 28(6): 545-51.
14. Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. J Steroid Biochem Mol Biol. 2011(1-2); 127: 27-34.
15. ปริศนา เพียรจริง. การใช้สเตียรอยด์ฮอร์โมนในการเกษตร การตกค้างในอาหาร และสิ่งแวดล้อม. ว สหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา 2564; 6(1): 90-110.
16. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO). Maximum residues limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in food CX/MRL 2-2021. Rome, Italy: Codex Alimentarius International Food Standard; 2021.
17. The European Parliament and The Council of The European Union. Directive 2003/74/EC of european parliament and of the council of 22 september 2003: amending council directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stock farming of certain substance having a homonal or thyostatic action and beta agonist. Official Journal of the European Union 2003; L262: 17-21.
18. Li ZM, Kannan K. Determination of 19 steroid hormones in human serum and urine using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Toxics 2022; 10: 1-15.
19. Adlercreutz H, Kiuru P, Rasku S, Wahala K, Fotsis T. An isotope dilution gas chromatographic–mass spectrometric method for the simultaneous assay of estrogens and phytoestrogens in urine. J Steroid Biochem Mol Biol 2004; 92: 399-411.
20. Bhawani S, Sulaiman O, Hashim R, Mohamad Ibrahim MN. Thin-layer chromatographic analysis of steroids: a review. Trop J Pharm Res 2010; 9(3): 301-13.
21. Musharraf SG, Gulzar U. Effective separation and simultaneous analysis of anabolic androgenic steroids (AAS) in their phar-

maceutical formulations by a validated TLC-densitometry method. Chem Cent J 2012; 6: 54. (7 pages).

22. Elder PA, Lewis JG. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma testosterone. J Steroid Biochem 1985; 22(5): 635-8.
23. Hanquez C, Urios P, Desfosses B, Samake H, Lince E, Rajkowski KM, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for steroid hormones with polyclonal and monoclonal antibodies: an assay for urinary aldosterone. Clin Chim Acta 1987; 164(1): 71-82.
24. เฉลิมพร ควรหา, ทองสุข ปายะนันทน์, ลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ. การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มฮอร์โมนในเนื้อสัตว์ โดย LC-MS/MS. ว กรมวิทย พ 2561; 60(2): 54-68.
25. Magnusson B, Ömemark U, editors. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. United Kingdom: Eurachem; 2014.
26. สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผลและวิธีคัดกรอง. ปทุมธานี: สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์; 2555.
27. Pihlström T, Fernández-Alba AR, Amate CF, Poulsen ME, Hardebusch B, Anastassiades M, et al. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE 11312/2021. Sante 2021; 11312: v2. (55 pages).
28. Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. J Chromatogr A 2011; 1218(42): 7634-9.
29. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO). Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals; CAC/GL 71-2009. Adopted 2009, Revision 2012, 2014. Rome, Italy: Codex Alimentarius International Food Standard; 2014.
30. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
31. Ellison SLR, Williams A, editors. Eurachem/CITAC guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom: Eurachem; 2012.
32. Shao B, Zhao R, Meng J, Xue Y, Wu G, Hu J, et al. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta 2005; 548: 41-50.
33. Blasco C, Van Poucke C, Van Peteghem C. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2007; 1154(1-2): 230-9.
34. Matraszek-Zuchowska I, Kłopot A, Witek S, Pekala-Safinska A, Posyniak A. Development of analytical procedure for the determination of 17ß-testosterone, 11-ketotestosterone and 17ß-estradiol in the sea trout *(Salmo trutta L.)* gonads. Separations 2022; 9(10): 293. (15 pages).

Method Development and Validation for 17α-Estradiol, 17ß-Estradiol and Testosterone Hormones Determination by UPLC-MS/MS

Suwimol Muadmah, Wannaporn Payao, Atcharee Inkaew, Witthawat Wangkaewhiran, Kanyarat Chuakunchat, Sakulrat Somsuntisuk, and Thongsuk Payanan

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

ABSTRACT 17α-estradiol, 17ß-estradiol, and testosterone are sex hormones mainly regulating the development of reproductive system and the expression of male and female characteristics. Presently, the synthetic hormones have been used for aquaculture, especially the monosex farming of tilapia and climbing perch. Testosterone has been employed to induce tilapia to become male fish, while 17ß-estradiol has been used with climbing perch to obtain the female fish. However, the use of hormones in feed can contribute to the residues in meat and environment, which may have adverse effects on consumer health. The EU has regulation to ban the use of these hormones in livestock farming and aquaculture. Therefore, this study aimed to develop and validate the method for analyzing sex hormones, including 17α-estradiol, 17ß-estradiol, and testosterone in fish meat using UPLC-MS/MS, and the analysis results were derived from procedural mixed standard calibration curve. The results showed that the method had LOD and LOQ at 1 and 2 µg/kg, respectively, and the working range were between 2-100 µg/kg with coefficient of determination (R^2) more than 0.999. The accuracy showed by %recoveries were between 89.7-114.0%, and the precision illustrated by %RSD were during 3.5-26.5%. So, this analysis method was specific, accurate, reliable, and proper for using in the laboratory.

Keywords: 17α-Estradiol, 17ß-Estradiol, Testosterone, Hormones, UPLC-MS/MS