

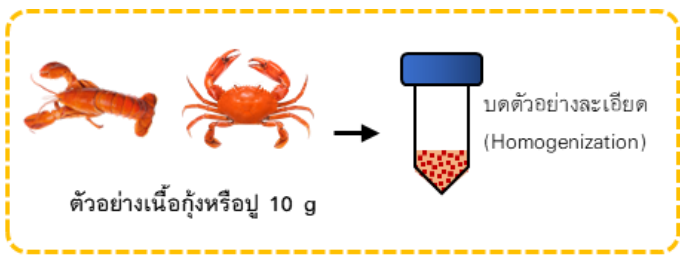


การตรวจวัดสารต้านจุลชีพ Chloramphenicol ในเนื้อกุ้งและปู ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ผู้จัดทำ: ฤทธิชัย เจริญทรัพย์ยานันต์ , จิตนภา วรรณติกุล, ทศพล อนุกุลวิทยา

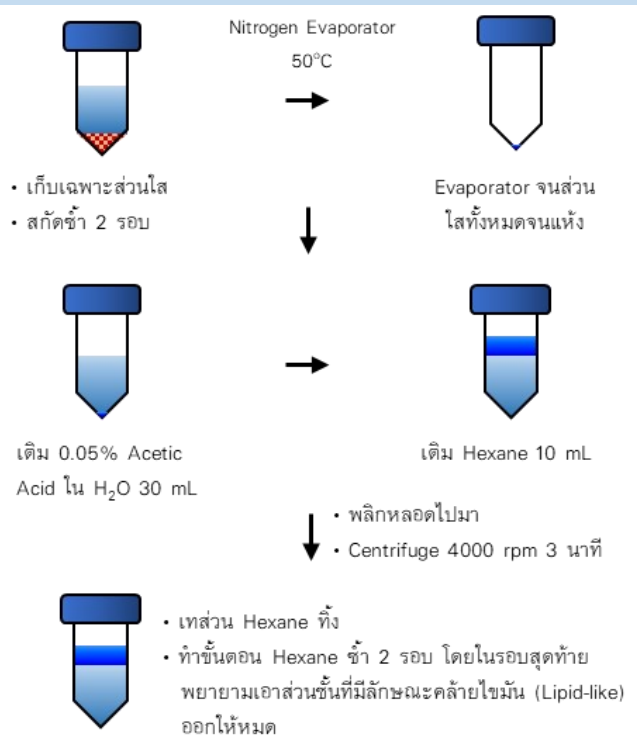
Chloramphenicol (CAP) เป็นสารต้านจุลชีพที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา และสามารถสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีได้ ซึ่งเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ CAP เป็นสารที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) และหน่วยงานประเมินการใช้จ่ายของยุโรป (EMA) ห้ามนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์ที่ผลิตเพื่อเป็นอาหารของมนุษย์เนื่องจากเป็นยาที่จะสะสมไว้สำหรับมนุษย์ หากมีสาร CAP ตกค้างเข้าไปในร่างกายอาจทำให้เกิดการดื้อยาในมนุษย์ได้ อีกทั้งหากนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจทำให้ยาตกค้างในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำและดิน เป็นเหตุให้เชื้อโรคในสิ่งแวดล้อมดื้อยามากขึ้น จนไม่สามารถควบคุมโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Chloramphenicol อาจเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ อีก เช่น ก่อให้เกิดโรคมะเร็งในเม็ดเลือด ทำให้ขาดภูมิคุ้มกันโรค เกิดเลือดประปราย และโรคโลหิตจาง เป็นต้น วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CAP ที่ตกค้างในตัวอย่างเนื้อสัตว์น้ำ สามารถทำได้โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งในบทความนี้จะแสดงถึงวิธีการสกัดและการใช้เทคนิคดังกล่าวมาวิเคราะห์แม้จะมีปริมาณสารตกค้างในระดับความเข้มข้นต่ำ

การเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

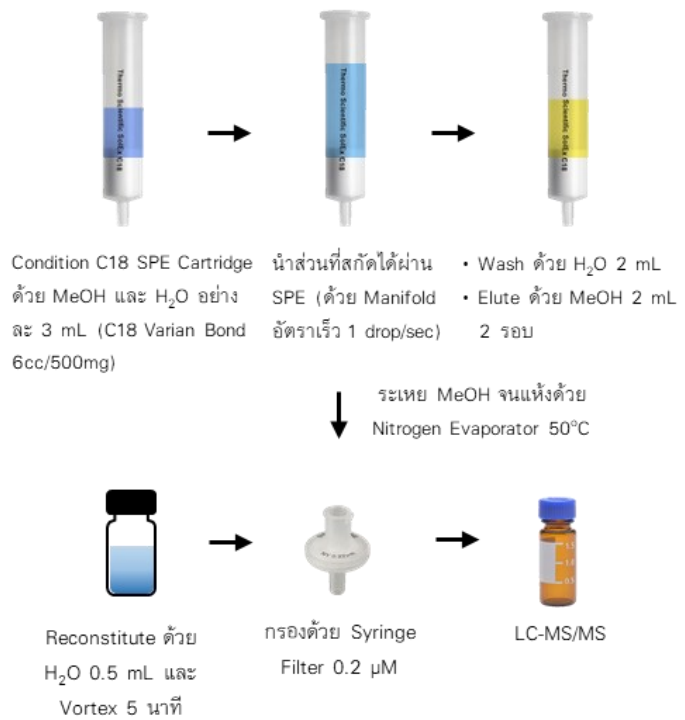


- เติมสารละลายดังนี้
- CAP ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.6, 1, 2, 3 ppb
 - m-CAP (IS) ให้มีความเข้มข้น 0.3 ppb
 - สารละลายสกัด (EtOAc : NH₄OH, 98:2) 20 mL

- Vortex 1 นาที และผสมโดยเครื่อง
- Pulsed Multitube Vortexer 10 นาที
- Centrifuge 4000 rpm 7 นาที



Solid Phase Extraction (SPE)



เครื่องมือวิเคราะห์ LC-MS/MS

- Thermo Scientific™ Ultimate 3000™ UHPLC
- Xterra™ C18 (3.5 µm, 2.1 x 150 mm) LC Column
- Thermo Scientific™ TSQ Fortis™ Mass Spectrometer
- LC Conditions และ SRM Transitions (ดังตารางด้านล่าง)

Column Temp. 30°C

Injection Vol. 75 µL

Flow Rate 200 µL/min

Mobile Phases
A: 0.1% Formic Acid in Water
B: 0.1% Formic Acid in ACN

Gradient	Time(min)	%A	%B
	0.0	65	35
	6.0	65	35
	6.5	10	90
	13.5	10	90
	14.0	65	35
	20.0	65	35

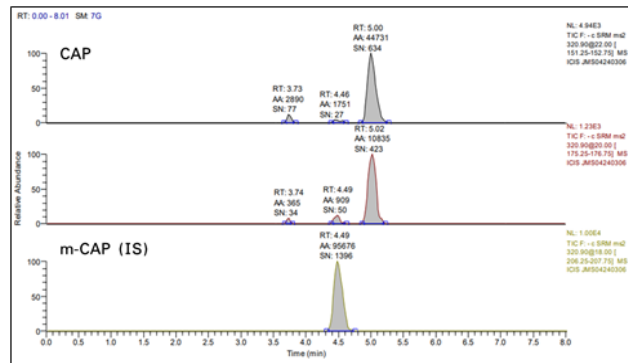
Compound	Precursor	Targeted Ion	Confirming
CAP	321	152	176
m-CAP	321	207	-

ผลการตรวจวิเคราะห์

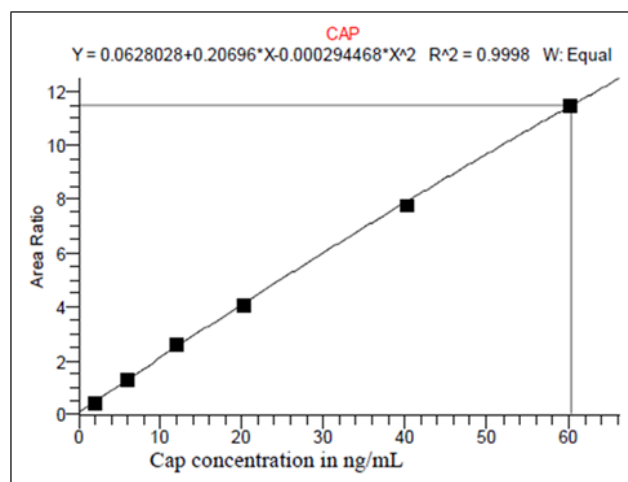
จากรูปที่ 1 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างเนื้อกุ้งที่มีความเข้มข้น 0.1 ppb และมี m-CAP (IS) ที่ความเข้มข้น 0.3 ppb ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CAP และ m-CAP ถูกตรวจพบโดยมีคุณภาพของสัญญาณที่ดี โดยพบว่ามีค่า Signal-to-noise (S/N) ที่ 600 และ 1400 ตามลำดับ และจากผลนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความสามารถในการวัดปริมาณ CAP ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (LOQ) ที่ 0.1 ppb ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์สารตกค้างที่กำหนดโดยกรมประมง (Residue Monitoring Plan, RMP) จากรูปที่ 2 แสดงผลการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยมีความเข้มข้นของ CAP ตั้งแต่ 0 ถึง 3 ppb (เทียบเท่า 0 ถึง 60 ng/mL) ซึ่งได้กราฟที่มีค่า Linearity ที่ดี โดยให้ค่า R² ที่ 0.9998 วิธีการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง แม่นยำและน่าเชื่อถือ โดยให้ค่า % Recovery อยู่ในช่วง 89 ถึง 101% (ในตัวอย่างเนื้อกุ้ง) และ 100 ถึง 106% (ในตัวอย่างเนื้อปู) โดยมีค่า %RSD อยู่ที่ 14 ถึง 28% (ตารางที่ 1)

ตัวอย่างเนื้อสัตว์	Spike (ppb)		
	0.1	0.2	0.3
เนื้อกุ้ง	89 (25)	99 (16)	101 (14)
เนื้อปู	106 (23)	100 (28)	101 (17)

ตารางที่ 1 ค่า % AVG Recovery ของ CAP และ %RSD (ในวงเล็บ) ในตัวอย่างเนื้อกุ้งและปู



รูปที่ 1 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างเนื้อกุ้ง CAP และ m-CAP (IS) ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 ppb



รูปที่ 2 เส้นกราฟมาตรฐานของ CAP ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 3 ppb

เอกสารอ้างอิง

[1] USDA 4306: Determination of Chloramphenicol Residues in Shrimp and Crab Tissues by Electrospray Triple Quadrupole LC-MS/MS, <https://www.fda.gov/media/76833/download>

ติดตามแอปพลิเคชันอื่น ๆ ได้ที่ <https://www.scispec.co.th>



บริษัท ชายน์ สเปค จำกัด
10 กาญจนภิเษก ซอย 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02-454-8533



/scispec



@scispec

ThermoFisher
SCIENTIFIC