



การสกรีนนิงสารกลุ่ม β -agonist, Sulfonamide และ Fluoroquinolone ในอาหารเลี้ยงสัตว์ ด้วยเทคนิค LC-HRMS/MS

ผู้จัดทำ : พงศกร โพธิ์ถาวร

สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์

สารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์เป็นสารกลุ่ม Catecholamine ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้าย Noradrenaline สามารถออกฤทธิ์เป็นได้ทั้งสารสื่อประสาทและฮอร์โมนโดยจะจับกับตัวรับ โดยเฉพาะบนผิวเซลล์ (Beta Receptor) สามารถแบ่งตัวรับบนผิวเซลล์เป็น 2 ชนิด คือ เบต้าวัน (B_1) และเบต้าทู (B_2) ตัวรับเบต้าวันจะพบที่ หัวใจและระบบประสาท ส่วนตัวรับเบต้าทูจะพบที่หลอดเลือด ท่อทางเดินอาหาร เซลล์ไขมัน และเซลล์กล้ามเนื้อ สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ทำให้เกิดการเร่งเนื้อแดงโดยมีผลต่อตัวรับเบต้าทู ที่อยู่บนผิวเซลล์กล้ามเนื้อโครงร่าง และเซลล์ไขมันโดยจะลดการสังเคราะห์ไขมันและเพิ่มการสลายไขมัน และยังทำให้อัตราการสร้างโปรตีนสูงกว่าอัตราการสลายโปรตีน มีผลทำให้เซลล์กล้ามเนื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น ในประเทศไทยสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ที่นิยมใช้มีอยู่ด้วยกัน 3 ตัว คือ Clenbuterol Salbutamol และ Ractopamine โดยผู้เลี้ยงสุกรนิยมใช้ซัลบูตามอลมากที่สุด เพราะหาซื้อได้ง่าย เนื่องจากมีการใช้ซัลบูตามอลเป็นยารักษาโรคหอบหืดในคน โดยออกฤทธิ์ขยายหลอดลม แต่พบฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ คือ กล้ามเนื้อโครงร่างสั่นกระตุก มีอัสัน หัวใจเต้นเร็ว และหากได้รับขนาดสูงจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน นอกจากนี้ ยังมีรายงานความเป็นพิษของผู้ที่บริโภคตับโคสุกที่มีสาร clenbuterol ตกค้างในประเทศสเปน ระหว่างเดือน มีนาคม ถึงกรกฎาคม 1990 โดยผู้ป่วยแสดงอาการหัวใจสั่น เต้นเร็ว กล้ามเนื้อร่างกายสั่น และปวดศีรษะ โดยขนาดยาที่ถือว่าเกิดอันตรายต่อมนุษย์ได้ของสารนี้อยู่เพียง 1 - 2 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม และคนจะมีความไวต่อการเป็นพิษมากกว่าสุกรถึง 20 - 50 เท่า

สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์

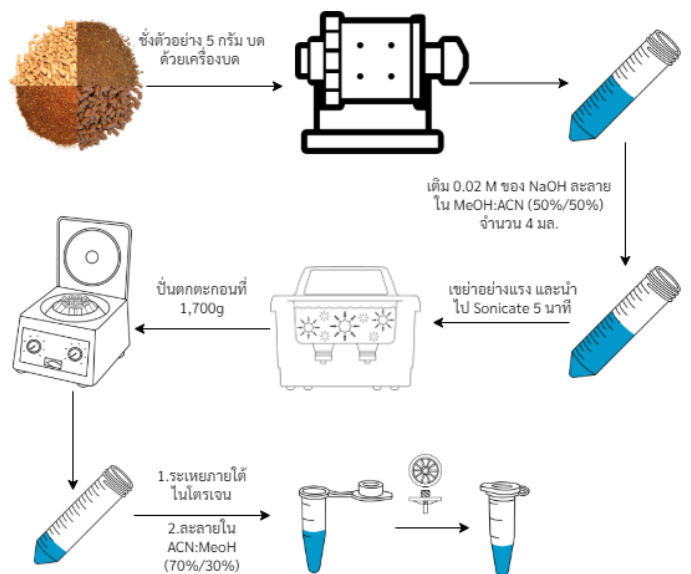
ยากำจัดเชื้อที่สังเคราะห์ขึ้นในกลุ่มนี้ ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในมนุษย์และสัตว์ เพื่อรักษาอาการติดเชื้อจากแบคทีเรีย ซึ่งยาเหล่านี้จะตกค้างในเนื้อสัตว์รวมถึง ของเสียจากปศุสัตว์ได้ ปัจจุบันผลกระทบของยาเหล่านี้ทั้งในอาหารและธรรมชาติ กำลังได้รับการศึกษาอยู่ หนึ่งในปัญหาที่น่าห่วงที่สุดในปัจจุบันคือการที่เกิกลุ่มแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาเหล่านี้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อร่างกายแรง ต่อแบคทีเรียปกติที่พบในธรรมชาติ ซึ่งหากมนุษย์ติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาเหล่านี้ อาจเกิดโรคร้ายแรงขึ้น ปัจจุบันพบผลกระทบของยากลุ่มนี้ตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ ทำให้ผู้บริโภคพบเกิดการแพ้ คลื่นไส้ อาเจียน รวมถึงร้ายแรงที่สุดอาจสะสมการ

เกิดโรคมะเร็งได้ นอกจากนี้ยา trimethoprim ยังถูกใช้ร่วมกับสารกลุ่มนี้เพื่อเพิ่มการออกฤทธิ์อีกด้วย

สารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

ยากลุ่มควิโนโลน เป็นยากำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะสามารถพบได้ในอาหารและเนื้อสัตว์ทุกประเภท เดิมใช้รักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ออกฤทธิ์ยับยั้งการคลายตัวของสารดีเอ็นเอในแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ ด้วยยาเร่งการผลิตเม็ดเลือดขาว ทำให้ภูมิคุ้มกันทำงานอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ปกติมักพบยากลุ่มนี้สามชนิดคือ Norfloxacin Orfloxacin และ Enoxacin การสะสมของการรับสารตกค้างจากตัวยากลุ่มนี้ มีแนวโน้มไปสู่การดื้อยาแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และรวมถึงอาจเกิดโรคมะเร็งได้

การเตรียมตัวอย่าง



Condition ของการวิเคราะห์

uHPLC: Ultimate 3000 RSLC

Mass Spectrometer: Q Exactive HRMS/MS

Column: Hypersil GOLD 50x2.1 mm, 1.9 μ M

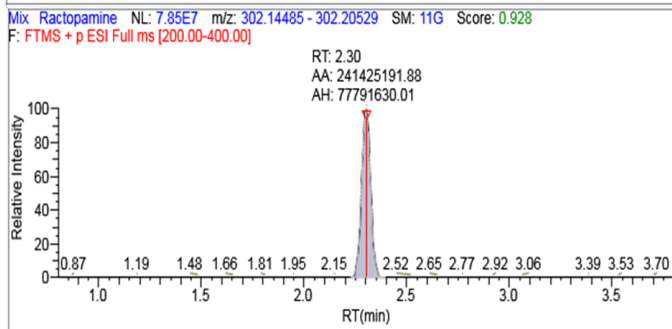
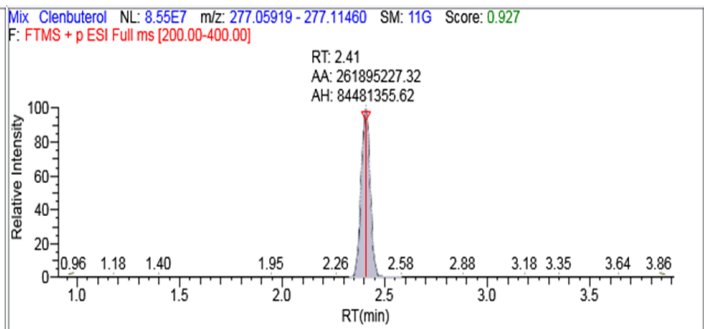
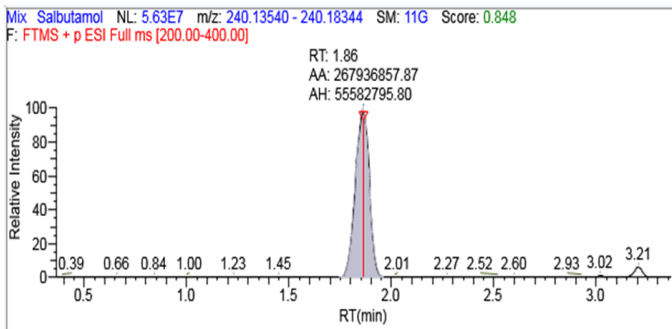
Mobile Phase: 10mM NH₄COOH (A), 10mM NH₄COOH
ในเมทานอล (B)

Flow Rate: 0.4 mL/min

| เวลา | %B |
|------|----|
| 0.0 | 5 |
| 0.2 | 5 |
| 2.0 | 90 |
| 3.0 | 90 |
| 3.5 | 90 |
| 4.0 | 5 |
| 5.0 | 5 |

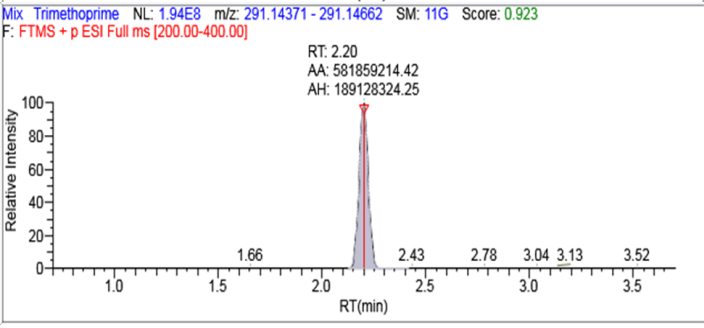
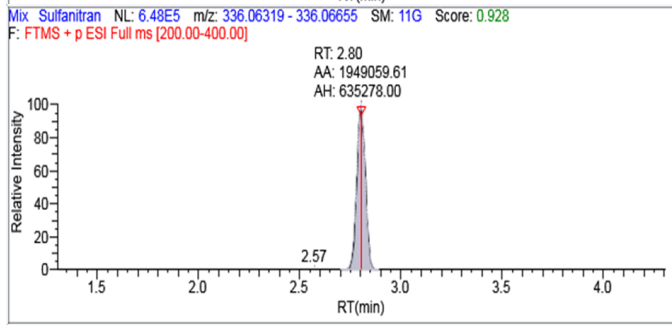
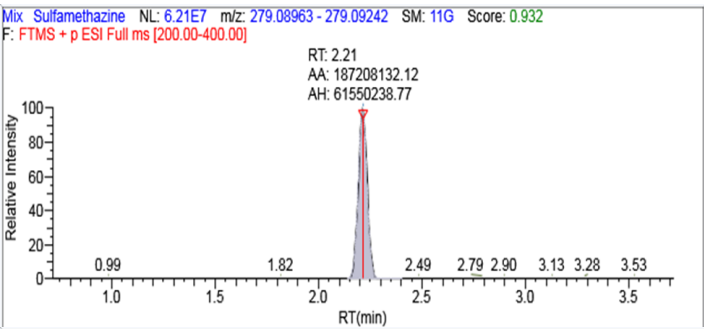
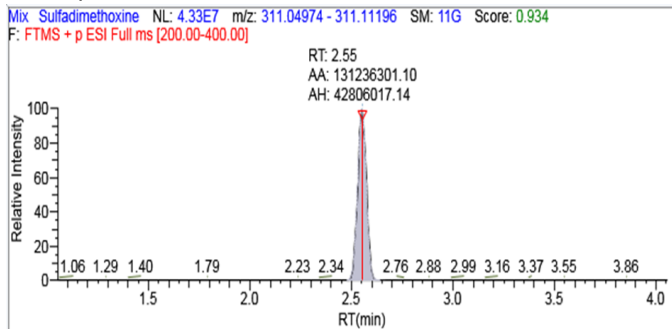
เพื่อนำเสนอและแสดงประสิทธิภาพของการสกรีนนิ่ง สารเบต้าอะ
โกนิสต์จำนวนสามชนิด ได้แก่ Sulbutamol Clenbutarol Racto-
pamine, สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Sulfadi-
methoxine Sulfamethazine Sulfamethoxazol Sulfanitran , สาร
กลุ่มฟลูออโรควิโนโลนสามชนิด ได้แก่ Ciprofloxacin Enrofloxacin
Norfloxacin และยาที่ใช้ร่วมกับ Sulfadimethoxazol เพื่อให้ได้
ผลการรักษาที่ดีอีกหนึ่งชนิด คือ Trimethoprim โดยการใช้เทคนิค
Full Scan HRMS พร้อมทำการยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วย
หลักการ MS/MS ด้วยเครื่อง QExactive-HCD ผลิตภัณฑ์ เทอร์
โม ฟิสเซอร์ ไชแอนติฟิค ประเทศสหรัฐอเมริกา

| | สูตรโมเลกุล | <i>m/z</i> | confirm#1 | confirm#2 | confirm#3 | | |
|------------------------|------------------|--|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| เบต้าอะโกนิสต์ | | | | | | | |
| 1 | Salbutamol | C ₁₃ H ₂₁ NO ₃ | [M+H] ⁺ | 240.15942 | 148.07581 | 166.08636 | 222.14902 |
| 2 | Ractopamine | C ₁₈ H ₂₃ NO ₃ | [M+H] ⁺ | 302.17507 | 284.16458 | 107.04899 | 164.10712 |
| 3 | Clenbuterol | C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O | [M+H] ⁺ | 277.0869 | 259.0759 | 203.01335 | 261.07281 |
| ซัลโฟนาไมด์ | | | | | | | |
| 4 | Sulfadimethoxine | C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S | [M+H] ⁺ | 311.08085 | 156.07642 | 156.01129 | 108.04407 |
| 5 | Sulfamethazine | C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S | [M+H] ⁺ | 279.09102 | 204.04377 | 124.08701 | 156.01146 |
| 6 | Sulfanitran | C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₅ S | [M+H] ⁺ | 336.06487 | 294.05417 | 156.01132 | 134.05993 |
| 7 | Trimethoprim | C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃ | [M+H] ⁺ | 291.14517 | 261.09786 | 230.11602 | 275.11355 |
| ฟลูออโรควิโนโลน | | | | | | | |
| 8 | Ciprofloxacin | C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃ | [M+H] ⁺ | 332.1405 | 288.15038 | 245.10833 | 204.06922 |
| 9 | Enrofloxacin | C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃ | [M+H] ⁺ | 360.1718 | 316.18216 | 245.10864 | 203.14325 |
| 10 | Norfloxacin | C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃ | [M+H] ⁺ | 320.1405 | 276.15023 | 233.10825 | 205.07702 |

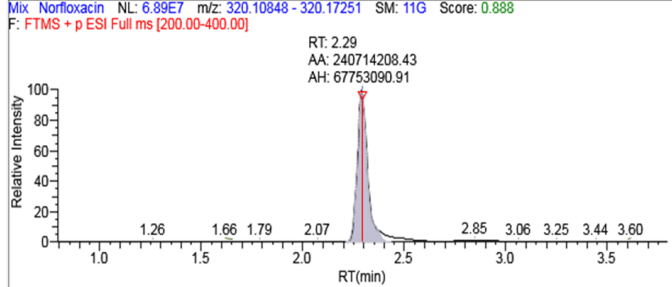
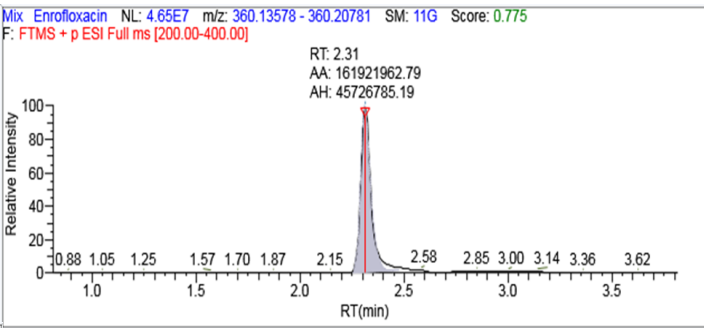
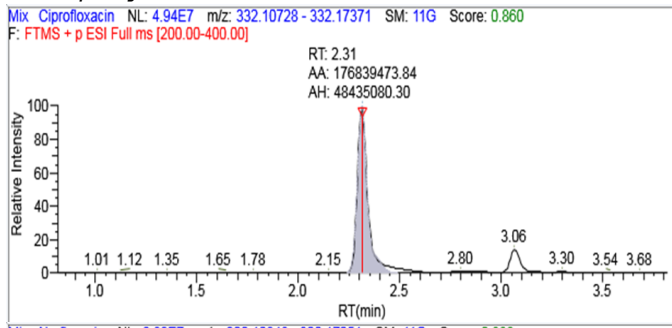


สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Salbutamol, Clenbuterol, Ractopamine

สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Sulfadimethoxine, Sulfamethazine, Sulfanitran, Trimethoprim



สารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Norfloxacin



| Report | MZ | RT | IP | FI | LS | Flag | Compound Name | Match Result Name | Formula | Confirmed | m/z (Expected) | Apex m/z (N) |
|-------------------------------------|----|----|----|----|----|------|----------------------|------------------------------|--------------|------------|----------------|--------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Ciprofloxacin | Ciprofloxacin@RT 2.31 | C17H18FN3O3 | 2 out of 2 | 332.14050 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Clenbuterol | Clenbuterol@RT 2.41 | C12H18Cl2N2O | 2 out of 2 | 277.08689 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Enrofloxacin | Enrofloxacin@RT 2.31 | C19H22FN3O3 | 1 out of 2 | 360.17180 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Norfloxacin | Norfloxacin@RT 2.29 | C16H18FN3O3 | 2 out of 2 | 320.14050 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Ractopamine | Ractopamine@RT 2.30 | C18H23NO3 | 2 out of 2 | 302.17507 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Salbutamol | Salbutamol@RT 1.86 | C13H21NO3 | 2 out of 2 | 240.15942 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Sulfadimethoxine | Sulfadimethoxine@RT 2.55 | C12H14N4O4S | 2 out of 2 | 311.08085 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Sulfamethazine | Sulfamethazine@RT 2.21 | C12H14N4O2S | 2 out of 2 | 279.09102 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | Sulfamethoxazole NH4 | Sulfamethoxazole NH4@RT 2.19 | C10H11N3O3S | N/A | 271.08594 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Sulfantran | Sulfantran@RT 2.80 | C14H13N3O5S | 2 out of 2 | 336.06487 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | ● | ● | ● | ● | ● | ● | Trimethoprim | Trimethoprim@RT 2.20 | C14H18N4O3 | 2 out of 2 | 291.14517 | |

- Peak (m/z) เป็นการตรวจเช็ค m/z ของ Parent Ion
- Retention Time เป็นการตรวจเช็ค Rt ด้วย Method ที่ผ่านการ Validate แล้ว
- Fragment Ion เป็นการคอนเฟิร์มด้วย Fragment Ion
- Isotopic Pattern เป็นการคอนเฟิร์มด้วย Isotopic Pattern
- Library Search เป็นการเชื่อมต่อไปยังฐานข้อมูลเพื่อยืนยันชนิดของพีคที่ตรวจพบ

ดังกล่าวได้ทั้งในรูปแบบของการสกรีนนิ่งและการวัดปริมาณ ในการวิเคราะห์สารทั้ง 10 ชนิด ในเวลา 5 นาที ทำให้ส่งผลต่อ Productivity และ เวลาที่น้อยลงในการตรวจหาสารตกค้างปศุสัตว์

จากรูปดังกล่าวจะเห็นได้ ว่าเมื่อใช้ Criteria การเปรียบเทียบโดยใช้ m/z (parent ion), RT (Retention time), IP (Isotopic pattern), FI(fragmented Ion) พบว่าทั้งสิบชนิด มีสีเขียว บ่งบอกถึงการตรวจพบในการวิเคราะห์ หากต้องการวิเคราะห์ปริมาณก็สามารถนำไปทำการวิเคราะห์แบบ Quantitative ต่อไป

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ExactFinder ช่วยให้การทำการสกรีนนิ่งสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์, ซัลโฟนาไมด์ และฟลูออโรควิโนโลน ทำได้ง่าย และด้วยหลักการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายสำหรับเครื่อง LC-HRMS ทำให้สามารถออกแบบการใช้งาน

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