

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

ศิริวัฒน์ رایณะสุข วรัญญา แก้วทิพย์ สุนีย์ คณาพิพัฒน์
กลวิทย์ ไชยทองศรี พยุงศักดิ์ ภักมี

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สารซัลฟาเมทาทซีน, สารซัลฟาไดเมทาท็อกซีน และสารไตรเมทโทปริม ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM เตรียมตัวอย่างโดยสกัดตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI Water) และอะซิโตนไตรเออร์ จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิด 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำปราศจากไอออน และอะซิโตนไตรเออร์ ใช้คอลัมน์ชนิด C₁₈ และสถานะของแมสสเปคโตรเมทรีแบบ ESI positive mode ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ อยู่ในช่วง 0.99609 – 0.99833 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เท่ากับ 0.015 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ที่ระดับ 0.05, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในช่วงร้อยละ 66.00 – 114.00, 80.00 – 109.00 และ 87.10 – 109.20 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ที่ระดับ 0.05, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 3.66 – 7.51, 5.10 – 8.01 และ 0.86 – 2.06 ตามลำดับ และทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ที่ระดับ 0.05, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 17.31 – 18.91, 6.74 – 8.81 และ 0.98– 9.55 ตามลำดับ จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ในอาหารสัตว์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารสัตว์

คำสำคัญ : สารซัลฟาเมทาทซีน, สารซัลฟาไดเมทาท็อกซีน, ไตรเมทโทปริม, การตรวจสอบความใช้ได้, อาหารสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for determination of Sulfonamides in animal feed by LC-MS/MS

Siriwat Rainasuk Warunya Kaewthip Sunee Kanapipat
Konlawit Chaithongsri Phayungsak Phahmee

Abstract

In-house method for the determination of 3 compounds of Sulfonamides : Sulfamethazine, Sulfadimethoxine and Trimethoprim in animal feed with LC-MS/MS was validated according to EURACHEM Guide. The samples were extracted with Deionized water (DI Water) and Acetonitrile analyzed by LC-MS/MS. The analysis was carried out using the mobile phase of 0.1 % formic acid in Deionization and acetonitrile on a C₁₈ column and ESI positive mode of mass spectrometry condition. The results of method validation of Sulfonamides were found that the calibration curve at the level 0.05 - 1.00 mg/kg were good linear; correlation coefficient of Sulfonamides were between 0.99609 – 0.99833. Limit of Detection and Limit of Quantitation were 0.015 and 0.05 mg/kg, respectively. The mean % recovery of Sulfonamides at the level 0.05, 0.50 and 1.00 mg/kg were between 66.00 – 114.00, 80.00 – 109.00 and 87.10 – 109.20 respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 0.05, 0.50 and 1.00 mg/kg of Sulfonamides were between 3.66 – 7.51, 5.10 – 8.01 and 0.86 – 2.06 respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility at the level 0.05, 0.50 and 1.00 mg/kg of Sulfonamides were between 17.31 – 18.91, 6.74 – 8.81 and 0.98– 9.55 respectively. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of Sulfonamides at the level 0.05 - 1.00 mg/kg in animal feed.

Keywords : Sulfamethazine, Sulfadimethoxine, Trimethoprim, method validation, animal feed

Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of livestock Development

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

ศิริวัฒน์ رایณะสุข วรัญญา แก้วทิพย์ สุนีย์ คณาพิพัฒน์
กลวิทย์ ไชยทองศรี พยุงศักดิ์ ภัคมี

บทนำ

ยาต้านจุลชีพมีคุณสมบัติในการหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ ถูกใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อจุลชีพ และป้องกันโรคแทรกซ้อนที่เกิดหลังจากการติดเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ได้ด้วย (Tapingkae, 2014)

ซัลโฟนามายด์เป็นกลุ่มของยาต้านจุลชีพ ที่มีฤทธิ์กว้างในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และโปรโตซัวบางชนิด (Galarini et al., 2014) มีการใช้แพร่หลายในฟาร์มปศุสัตว์และการทำประมง เพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์ เช่น รักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะ และรักษาการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อจุลชีพที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่น (Patyra et al., 2019) การพบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ตกค้างในอาหารสำหรับบริโภคเป็นเรื่องที่น่ากังวล เนื่องจากพบว่าซัลโฟนามายด์ก่อให้เกิดมะเร็งของต่อมไทรอยด์ในหนูทดลอง และอาจทำให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและเกิดการอาการแพ้ในคน (Manzanares et al., 2014) การศึกษาผลของยากกลุ่มซัลโฟนามายด์ พบว่ามีอันตรายต่อระบบสร้างเม็ดเลือด อาจเกิดโรคโลหิตจาง เกิดอาการแพ้ที่ผิวหนัง คลื่นไส้ อาเจียน และเบื่ออาหาร เป็นต้น

ในประเทศไทยเกษตรกรนิยมใช้ยากกลุ่มซัลโฟนามายด์เพื่อป้องกันและรักษาโรคโรคในสัตว์ เนื่องจากอยู่ในเขตภูมิภาคอากาศร้อนชื้นทำให้มีโรคชุกชุม การที่สัตว์ได้รับยาต้านจุลชีพในระดับต่ำๆ เป็นเวลานาน ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้เกิดการดื้อยาได้ และอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค หากเกษตรกรขาดความรู้และความเข้าใจในรูปแบบและวิธีการใช้ยาที่ถูกต้อง ทำให้เกิดการตกค้างของยาในสินค้าปศุสัตว์ได้

ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS และเพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล จึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ จำนวน 3 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย สารซัลฟาเมททาซีน (Sulfamethazine), สารซัลฟาไดเมททีออกซิน (Sulfadimethoxine) และสารไตรเมโทพริม (Trimethoprim) ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ อ้างอิงวิธีทดสอบจาก Journal of Chromatographic Science, Vol.49, September 2011 โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014) เพื่อแสดงว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธี และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธี และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สารซัลฟาเมทาซีน (Sulfamethazine), สารซัลฟาไดเมทท็อกซิน (Sulfadimethoxine) และ สารไตรเมโทพริม (Trimethoprim) ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

3.2 ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017

3.3 ใช้ในการเฝ้าระวังการใช้ยาปฏิชีวนะในระบบการผลิตสินค้าปศุสัตว์ เพื่อลดปัญหา เชื้อดื้อยา

4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (Working range) ดังนี้

4.1.1 ทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า correlation coefficient ไม่น้อยกว่า 0.995

4.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ) ดังนี้

4.2.1 ทดสอบ Fortified Sample ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ให้มีความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของสารแต่ละชนิดจาก $LOD = 3S'_0$ และ $LOQ = 10S'_0$

$$S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$$

เมื่อ S_0 = Standard deviation จากการทดสอบซ้ำ

n = จำนวนทดสอบซ้ำในงาน routine

S'_0 = Standard deviation สำหรับคำนวณค่า LOD และ LOQ

4.2.2 ทำการยืนยันค่า LOD โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ

แล้วประเมินว่าค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 และ Ion ratio ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.2.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ Fortified sample ของกลุ่มซัลโฟนามายด์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาประเมินความแม่นยำและความเที่ยงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3 การทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.3.1 ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) ของวิธีทดสอบ โดยทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (with-in laboratory reproducibility) ของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน ทดสอบต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน แต่ละวันจะทำการทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.3 ประเมินความแม่นยำ โดยการคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนได้ (%Recovery) ของแต่ละความเข้มข้นว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016)

4.3.4 ประเมินความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD_r) ของความเข้มข้นสารที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r)

$$\text{สมการ Horwitz (repeatability) } \quad \%PRSD_r = 0.66 \times 2 C^{-0.1505}$$

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.3.5 ประเมินความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD_R) ของความเข้มข้นสารที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (% PRSD_R)

$$\text{สมการ Horwitz (with-in laboratory reproducibility) } \quad \% PRSD_R = 2 C^{-0.1505}$$

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.4 การทดสอบ Selectivity และ Specificity

4.4.1 เตรียมตัวอย่าง Sample blank จำนวน 3 ซ้ำ

4.4.2 เตรียมตัวอย่าง Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ความเข้มข้นที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

4.4.3 เตรียมตัวอย่าง Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ความเข้มข้นที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเติมสารละลายมาตรฐานอะม็อกซิซิลลิน ซึ่งสงสัยว่าจะรบกวนการทดสอบ ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

4.4.4 นำตัวอย่างข้อ (4.4.1-4.4.3) วิเคราะห์ด้วยวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

4.4.5 เปรียบเทียบสัญญาณของ Sample blank (ข้อ 4.4.1) และ Fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใน matrix ของ Sample blank

4.4.6 เปรียบเทียบผลการทดสอบ Fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ กับ Spike sample (ข้อ 4.4.3) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ และเติมสารละลายมาตรฐานอะม็อกซิซิลลิน ว่าพบ Peak ของสารอะม็อกซิซิลลิน ที่ตำแหน่ง Retention time เดียวกันกับสารกลุ่มซัลโฟนามายด์หรือไม่ หรือมี Peak ของสารอะม็อกซิซิลลิน รบกวน Peak ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์หรือไม่

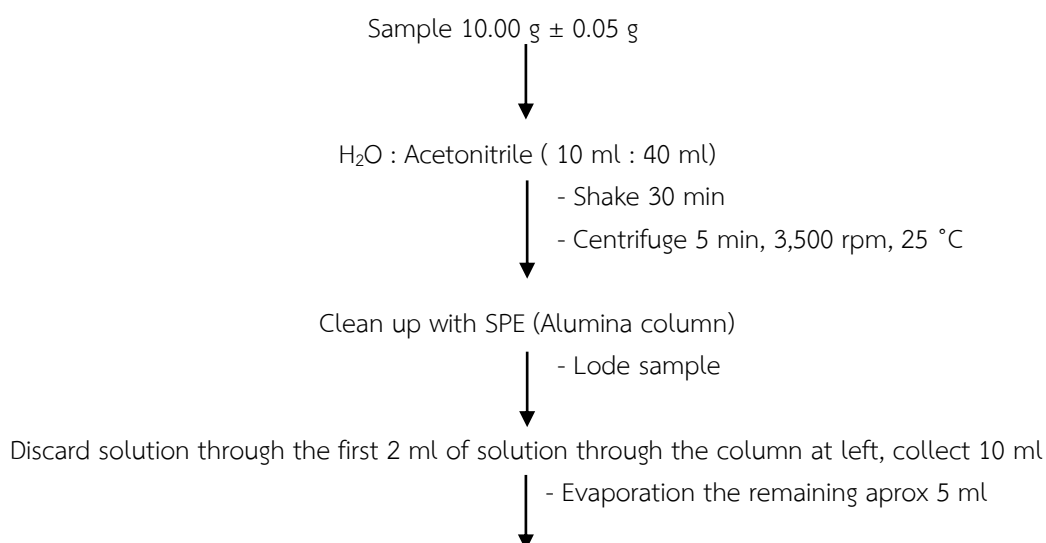
4.5 ทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (Ruggedness; major change)

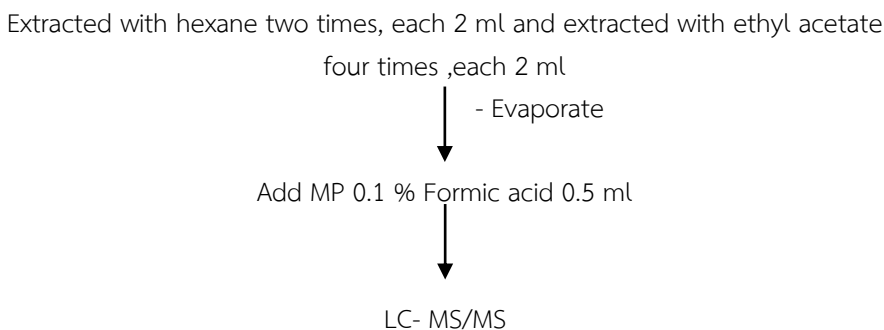
4.5.1 ทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ในอาหารสุกร

4.5.2 ทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ในอาหารไก่

4.5.3 ทดสอบหาความแตกต่างทางสถิติของอาหารทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ F-test และ t-test

แผนผังขั้นตอนการทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

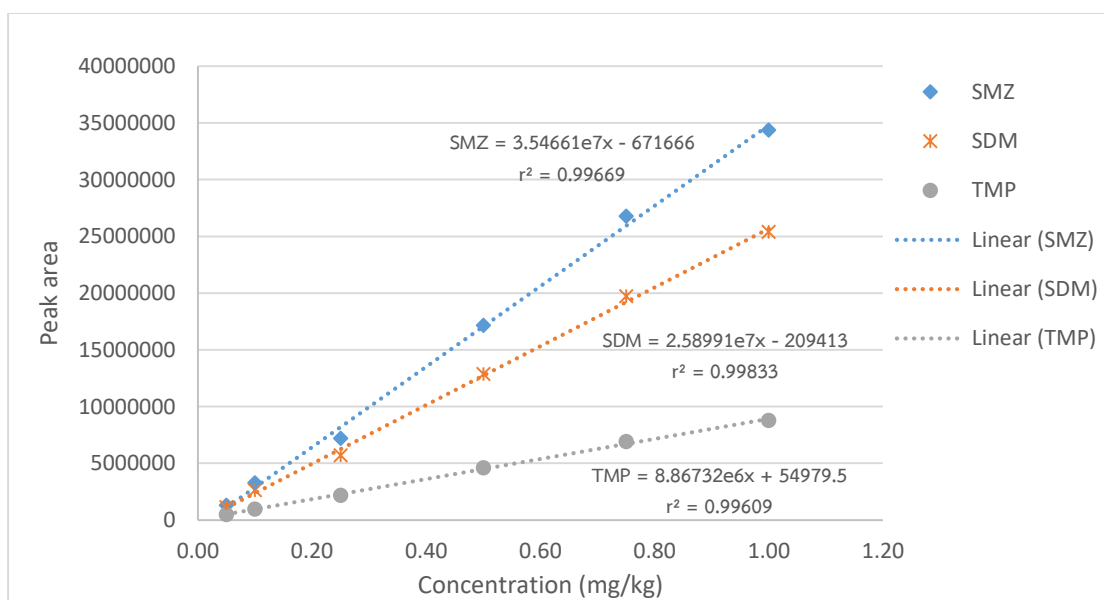




5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (Working range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample และพื้นที่ใต้พีค (Peak area) ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.05 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดีเหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ที่ 0.05 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์

5.2 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ)

5.2.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ โดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก $LOD=3S'_0$ และ $LOQ=10S'_0$ พบว่ามีค่าดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์

ลำดับ	SMZ	SDM	TMP
	Conc.(mg/kg)	Conc.(mg/kg)	Conc.(mg/kg)
1	0.051	0.048	0.052
2	0.046	0.050	0.050
3	0.049	0.041	0.051
4	0.050	0.052	0.042
5	0.047	0.051	0.050
6	0.044	0.043	0.049
7	0.042	0.043	0.050
8	0.046	0.048	0.044
9	0.045	0.050	0.040
10	0.043	0.041	0.052
mean	0.0463	0.0467	0.0480
SD	0.0030	0.0043	0.0043
S'_0	0.0021	0.0030	0.0031
LOD=3 S'_0	0.0063	0.0091	0.0092
LOQ=10 S'_0	0.0211	0.0302	0.0307

5.2.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ที่ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า $S/N < 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 0.015 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน พบว่ามีค่า $S/N \geq 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision ดังนั้นค่า LOD ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ มีค่าเท่ากับ 0.015 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

5.2.3 ผลการยืนยันความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ) ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ที่ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %Recovery ไม่อยู่ในช่วง 60 – 115 และ %RSD ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) จึงทำการปรับค่า LOQ ที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %Recovery อยู่ในช่วง 60 – 115 เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) และตามเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz ตามลำดับ ดังนั้นค่า LOQ ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ มีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ที่ระดับ 0.015 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	SMZ			SDM			TMP		
	S/N	IR	%lon ratio	S/N	IR	%lon ratio	S/N	IR	%lon ratio
15-1	282.5	0.6584	65.84	334.4	0.5668	56.68	91.3	0.6525	65.25
15-2	566.6	0.6602	66.02	477.4	0.5835	58.35	234.3	0.737	73.7
15-3	279	0.6235	62.35	505.2	0.5892	58.92	183.3	0.5691	56.91
15-4	396.2	0.6202	62.02	276.5	0.5702	57.02	232.6	0.6242	62.42
15-5	420.3	0.6572	65.72	403.9	0.6013	60.13	81.9	0.5704	57.04
15-6	299.8	0.6288	62.88	312.4	0.597	59.7	71.9	0.753	75.3
15-7	329.200	0.6552	65.52	353.6	0.6052	60.52	86.500	0.5388	53.88
15-8	337.5	0.6758	67.58	312.3	0.5859	58.59	96.3	0.6723	67.23
15-9	448.6	0.6678	66.78	300.2	0.5921	59.21	214.0	0.6493	64.93
15-10	268.3	0.6701	67.01	401.9	0.6028	60.28	216.7	0.5228	52.28
	เกณฑ์ S/N≥3 เกณฑ์ %lon ratio ± 20% (49.84-74.76)			เกณฑ์ S/N≥3 เกณฑ์ %lon ratio ± 20% (43.08-64.63)			เกณฑ์ S/N≥3 เกณฑ์ %lon ratio ± 20% (51.10-76.64)		

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ที่ระดับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	SMZ		SDM		TMP	
	Conc.(mg/kg)	%Recovery	Conc.(mg/kg)	%Recovery	Conc.(mg/kg)	%Recovery
1	0.052	104.00	0.046	92.00	0.055	110
2	0.054	108.00	0.047	94.00	0.055	110
3	0.048	96.00	0.039	78.00	0.054	108
4	0.048	96.00	0.042	84.00	0.052	104
5	0.051	102.00	0.041	82.00	0.054	108
6	0.051	102.00	0.043	86.00	0.054	108

7	0.052	104.00	0.046	92.00	0.054	108
8	0.053	106.00	0.046	92.00	0.053	106
9	0.054	108.00	0.042	84.00	0.057	114
10	0.053	106.00	0.042	84.00	0.057	114
mean	0.052	103.20	0.043	86.80	0.05	109.00
SD	4.34		5.35		3.16	
%RSD	4.21		6.16		2.90	
เกณฑ์ %Recovery = 60-115%, %RSD = 21%						

5.3 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ

5.3.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 60 – 115, 80-110 และ 80-110 ตามลำดับ ตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีทดสอบ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)		
		SMZ	SDM	TMP
0.05	60 - 115	70.22	75.80	107.30
0.50	80 - 110	101.08	98.54	94.80
1.00	80 - 110	106.97	94.46	102.57

5.3.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r) ดังตารางที่ 5 และจากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability, n=10)		
		SMZ	SDM	TMP
0.05	16.57	5.92	7.51	3.66
0.50	11.72	5.35	8.01	5.10
1.00	10.56	1.45	0.86	2.06

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_R) ดังตารางที่ 6 และจากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _R	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (with-in laboratory reproducibility, n=20)		
		SMZ	SDM	TMP
0.05	25.00	18.91	18.72	17.31
0.50	18.00	7.21	8.81	6.74
1.00	16.00	9.55	0.98	3.00

5.4 ผลการทดสอบ Selectivity และ Specificity

5.4.1 จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ Sample blank พบว่ามีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน Matrix ของ Sample

5.4.2 จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ กับตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ และเติมสารละลายมาตรฐานที่สงสัยที่จะรบกวนคือ สารอะม็อกซิซิลลินที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง Spike sample พบว่าไม่พบ Peak สารอะม็อกซิซิลลินที่ตำแหน่ง Retention time เดียวกับสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ แสดงว่าสารชนิดนี้ไม่มีผลต่อวิธีทดสอบนี้

5.5 ผลการทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (Ruggedness Test)

จากการทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (Ruggedness Test) โดยเปรียบเทียบว่าวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ในตัวอย่างอาหารสุกร สามารถนำไปใช้ทดสอบในอาหารไก่ได้หรือไม่ ซึ่งเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนจากตัวอย่างอาหารสัตว์ที่แตกต่าง (F-test) โดยเปรียบเทียบความแปรปรวนที่คำนวณได้ (F_{cal}) กับค่าแปรปรวนจากตาราง (F_{crit}) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบจากตัวอย่างอาหารสัตว์ที่แตกต่าง (t-test) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้ (t_{cal}) กับค่าเฉลี่ยจากตาราง (t_{crit}) พบว่าความแปรปรวนจากการใช้วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($F_{cal} < F_{crit}$) จากนั้นนำผลของความแปรปรวนที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของวิธีวิเคราะห์จากตัวอย่างอาหารสุกรและอาหารไก่ พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($t_{cal} < t_{crit}$)

ดังนั้น วิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ได้แก่ สารซัลฟาเมททาซีน (Sulfamethazine), สารซัลฟาไดเมทท็อกซิน (Sulfadimethoxine) และไตรเมโทพริม

(Trimethoprim) โดยเทคนิค LC- MS/MS สามารถใช้ในการทดสอบทั้งตัวอย่างอาหารสุกรและอาหารไก่ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงรายละเอียดผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย F-Test และ T-Test

Analyte	Conc. (mg/kg)	SD		%RSD		df ของ F-test	F _{cal}	F _{crit}	df ของ t-test	t _{cal}	t _{crit}
		อาหารสุกร	อาหารไก่	อาหารสุกร	อาหารไก่						
SMZ	0.05	0.003	0.002	5.178	4.236	6,6	1.388	5.820	12	1.472	2.179
	0.5	0.035	0.029	7.469	6.239	6,6	1.440	5.820	12	0.074	2.179
	1.00	0.063	0.106	6.063	11.13	6,6	2.831	5.820	12	1.866	2.179
SDM	0.05	0.003	0.002	6.133	4.791	6,6	1.468	5.820	12	1.881	2.179
	0.5	0.053	0.029	10.46	5.729	6,6	3.418	5.820	12	0.287	2.179
	1.00	0.066	0.095	6.356	9.577	6,6	2.075	5.820	12	1.041	2.179
TMP	0.05	0.004	0.002	7.788	4.778	6,6	2.923	5.820	12	1.372	2.179
	0.5	0.033	0.041	7.000	8.535	6,6	1.544	5.820	12	0.454	2.179
	1.00	0.086	0.046	8.868	4.909	6,6	3.535	5.820	12	1.030	2.179

* df คือ degree of freedom

6. สรุปผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าผลการทดสอบ Linearity Range และ Working range โดยการทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ ในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรง โดยค่า correlation coefficient (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 ค่า limit of detection (LOD) และค่า limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.015 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับมีค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016)

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้น วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ในอาหารสัตว์ ที่ช่วงความเข้มข้น 0.05 - 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและเที่ยงยิ่งขึ้น และควรให้ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มซัลโฟนามายด์ สารอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อขยายขอบข่ายของวิธีทดสอบ

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ สพ.ญ. ดร.พัชรี ทองคำพูน ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสุทธิพร พิริยาณ ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และ สพ.ญ.ดร.ฉันทน์ บุรณะไทย ผู้เชี่ยวชาญด้าน ตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิต จากสัตว์ ส่วนบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ ที่ดำเนินงานจัดหาวัสดุอุปกรณ์ ในการปฏิบัติงาน และ เจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี(สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยดำเนินงาน จนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

9.1 Appendix F: AOAC Guidelines for standard Method Performance requirements. AOAC official method of analysis (2016).

9.2 EURACHEM Guide, The fitness for purpose of analytical methods, 2nd ed.2014.

9.3 Rongyuan Liu, Pingli He, Zhen Li and Ruiguo Li. Simultaneous Determination of 16 Sulfonamides in Animal Feeds by UHPLC-MS-MS. Journal of Chromatographic Science, Vol.49,September 2011 หน้า 640-643 (BQCLP_FQCL_TO(RE)_EXT09_53)

9.4 European Commission Decision 2002/65/EC of 12 August 2002 Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical method and the interpretation of results. Official journal of the European communities. 2002 L221/8.

9.5 Wanaporn Tapingkae. Alternatives to the Use of Antibiotics as Growth Promoters for Livestock Animals. Journal of Agriculture, Vol. 30(2), 2014.

9.6 Roberta Galarini, Francesca Diana, Simone Moretti, Barbara Puppini, Giorgio Saluti and Lidija Persic. Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed. Food Control, Vol. 35, 2014.

9.7 Ewelina Patyra, Monika Przeniosło-Siwczynska and Krzysztof Kwiatek. Determination of Sulfonamides in Feeds by High-Performance Liquid Chromatography after Fluorescamine Precolumn Derivatization. Molecules. Vol. 24, 2019.

9.8 Natalia Arroyo-Manzanares, Laura Gámiz-Gracia and Ana M. García-Campaña. Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. Food Chemistry. Vol. 143, 2014.