

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats จำนวน 7 สาร ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS

ภาณุกร บุญสละ นงศ์นุช ประวัติดศรี มณัษยา บางเมือง กุลธิดา คำกล้า
วันเพ็ญ ดุจเฉลิม นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ โดยออกแบบและดำเนินการตามแนวทางของ Commission Implementing Regulation (CIR) (EU) 2021/808 ซึ่งสามารถยืนยันชนิดและหาปริมาณของสารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ Dinitrocarbanilide (DNC), Lasalocid A (LSA), Salinomycin (SAM), Monensin A (MNS), Narasin A (NRS), Diclazuril (DCZ) และ Robenidine (RBD) ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งานที่มีความเป็นเส้นตรงผ่านเกณฑ์การยอมรับ สำหรับ DNC และ RBD อยู่ในช่วง 100 - 600 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ LSA, SAM, MNS, NRS และ DCZ อยู่ในช่วง 30 - 180, 7.5 - 45, 4 - 24, 25 - 150 และ 250 - 1,500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์มีความไวเพียงพอที่จะวัดปริมาณสารแต่ละชนิดตามค่าเกณฑ์การตัดสินใจทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (CC_{α}) ของสาร DNC, LSA, SAM, MNS, NRS, DCZ และ RBD เท่ากับ 217.23, 69.65, 17.72, 9.33, 58.55, 573.73 และ 215.63 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่าความแม่นยำและความเที่ยงของสารทั้ง 7 ชนิด ผ่านตามเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของ CIR (EU) 2021/808 สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและหาปริมาณของสารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ทั้ง 7 ชนิดในเนื้อสัตว์ปีก บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

คำสำคัญ : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Coccidiostats และ Histomonostats
เนื้อสัตว์ปีก LC-MS/MS

งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์
สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Validation of Confirmatory Method for Seven Coccidiostats and Histomonostats Residues in Poultry Muscle by LC-MS/MS

Panukorn Boonsala Nongnut Prawatsri Manutchaya Bangmueang Kulthida Kamkla
Wanpen Dujchaloem Naraya Tangsirirap

Abstract

The confirmatory method for seven coccidiostats and histomonostats residue in poultry muscle by LC-MS/MS was validated according to Commission Implementing Regulation (CIR) (EU) 2021/808 which could identify and quantify seven compounds of coccidiostats and histomonostats including dinitrocarbanilide (DNC), lasalocid A (LSA), salinomycin (SAM), monensin A (MNS), narasin A (NRS), diclazuril (DCZ) and robenidine (RBD). The working range which linearity is in the acceptable criteria are as follow: 100 – 600 microgram per kilogram for DNC and RBD 30 – 180, 7.5 – 45, 4 – 24, 25 – 150 and 250 – 1,500 microgram per kilogram for LSA, SAM, MNS, NRS and DCZ, respectively. The decision limit (CC_{α}) of the method at 95% confidence level for DNC, LSA, SAM, MNS, NRS, DCZ and RBD were 217.23, 69.65, 17.72, 9.33, 58.55, 573.73 and 215.63 microgram per kilogram, respectively. Precision and accuracy of seven compounds were satisfied according to CIR (EU) 2021/808 criteria. In conclusion, the method is suitable for identify and quantity seven coccidiostats and histomonostats residues in poultry muscle, which fulfils the objective of this experiment.

Keywords: Method Validation Coccidiostats and Histomonostats Poultry Muscle
LC-MS/MS

Veterinary Drug and Hormone Residue Analysis Laboratory,
Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of livestock Products,
Department of Livestock Development

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats จำนวน 7 สาร ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS

ภาณุกร บุญสละ นงศ์นุช ประวัติดศรี มณัชยา บางเมือง กุลธิดา คำกล้า
วันเพ็ญ ดุจเฉลิม นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทนำ

สารตกค้าง Coccidiostats และ Histomonostats เป็นกลุ่มยาต้านเชื้อปรสิตที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการสัตวแพทย์และอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกเพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรคปรสิตซึ่งผลกระทบจากสารตกค้าง เนื่องจากการใช้กันอย่างแพร่หลาย การใช้ยาที่ผิดวัตถุประสงค์ หรือการใช้ยาโดยไม่คำนึงถึงระยะหยุดยา อาจก่อให้เกิดการตกค้างของยากลุ่มนี้ในร่างกายของสัตว์ และเมื่อผู้บริโภคได้รับสารตกค้างของยากลุ่มนี้จากการบริโภคเนื้อสัตว์ดังกล่าวอาจเกิดผลข้างเคียงได้ โดยการศึกษาของ Woodward (2013) พบว่าสารในกลุ่ม Coccidiostats จำพวก Ionophore polyether เช่น Monensin และ Lasalocid เป็นยาที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อปรสิตโดยตรง โดยเข้าไปยับยั้งการไหลผ่านของไอออนระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว จากผลลัพธ์ที่กล่าวมาอาจส่งผลเช่นเดียวกันในสัตว์และมนุษย์ คือก่อให้เกิดการยับยั้งการไหลผ่านของไอออนระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ทำให้ระบบประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของกล้ามเนื้อและระบบหลอดเลือดของหัวใจที่มีความเกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนไอออนอาจถูกทำลายได้ ดังนั้นสหภาพยุโรป ญี่ปุ่น รวมทั้งประเทศไทย จึงได้กำหนดค่า Maximum Residue Limits (MRL) หรือ Maximum Levels (ML) ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ เพื่อเป็นการป้องกันอันตรายของสารตกค้างที่อาจเกิดต่อผู้บริโภคได้ สำหรับสหภาพยุโรป ซึ่งเป็นกลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าปศุสัตว์ไทยรายสำคัญ ได้กำหนดมาตรฐานสารตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ ในกล้ามเนื้อไก่ สำหรับสาร Dinitrocarbanilide, Salinomycin, Monensin A, Narasin A และ Robenidine เท่ากับ 4,000, 15, 8, 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Commission Implementing Regulation (CIR) (EU) 2020/994, 2017/1914, 885/2010, 2020/148) และในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก สำหรับสาร Lasalocid A และ Diclazuril เท่ากับ 60 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Commission Regulation (CR) (EU) No. 37/2010)

ดังนั้น งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ เห็นความสำคัญในการตรวจสอบสารตกค้างยาสัตว์ Coccidiostats และ Histomonostats ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก จึงได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีว่ามีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและหา

ปริมาณสารตกค้าง เพื่อนำไปใช้เป็นวิธีในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังและตรวจติดตามการตกค้างของยา
กลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ในแผนการเฝ้าระวังประจำปี

1. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ
Histomonostats ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ว่ามีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิด
และปริมาณสารตกค้าง และผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมการยุโรป CIR (EU) 2021/808

2. ขอบข่าย

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ
Histomonostats ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 7 สาร รายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 1 สารมาตรฐาน และ Internal standard กลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats

ลำดับ	สารมาตรฐาน (Standard)	Internal standard (IS)
1	Dinitrocarbanilide (DNC)	Dinitrocarbanilide-D8 (DNC-D8)
2	Lasalocid A (LSA)	Nigericin (NIG)
3	Salinomycin (SAM)	
4	Monensin A (MNS)	
5	Narasin A (NRS)	
6	Diclazuril (DCZ)	Diclazuril-Methyl (MDCZ)
7	Robenidine (RBD)	Robenidine-D8 (RBD-D8)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ
Histomonostats ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ว่าวิธีมีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิด
และปริมาณสารตกค้าง

3.2 สามารถนำวิธีวิเคราะห์ ไปใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมต่างๆ ของ
สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-MS/MS 8060 ควบคุมการทำงานด้วยโปรแกรม Analyst software

4.1.2 เฟสคงที่ (HPLC column) ชนิด Pursuit C18 ขนาด 3 μ m 150 mm x 2.0 mm

4.2 สารเคมี

4.2.1 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ acetonitrile และ methanol

4.2.2 สารเคมีเกรด AR ได้แก่ sodium sulphate anhydrous, ethyl acetate, methanol, hexane, ethanol, dimethyl sulphoxide และ formic acid

4.3 น้ำจัดไอออน (deionized water หรือ น้ำDI)

4.4 สารมาตรฐาน

4.4.1 สารมาตรฐาน กลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ได้แก่ DNC (ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer; ความบริสุทธิ์ 98.40%), LSA (ยี่ห้อ TRC; ความบริสุทธิ์ 96.88%), SAM (ยี่ห้อ Honeywell; ความบริสุทธิ์ 91.70%), MNS (ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer; ความบริสุทธิ์ 98.40%), NRS (ยี่ห้อ HPC; ความบริสุทธิ์ 86.10%), DCZ (ยี่ห้อ HPC; ความบริสุทธิ์ 99.90%) และ RBD (ยี่ห้อ HPC; ความบริสุทธิ์ 99.60%)

4.4.2 Internal standard ได้แก่ DNC-D8 (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.90%), RBD-D8 (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.80%), MDCZ (ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer; ความบริสุทธิ์ 91.36%) และ NIG (ยี่ห้อ TRC; ความบริสุทธิ์ 97.00%)

4.5 ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสาร (sample blank) คือตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่พบสัญญาณในช่วง retention time (RT) ของสารกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ทั้งนี้ใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก

4.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ออกแบบและดำเนินการตามขั้นตอนของแนวมติคณะกรรมการอาหารยุโรป CIR (EU) 2021/808

4.6.1 วิธีดำเนินการ

4.6.1.1 เตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสารสำหรับตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวน 21 ตัวอย่าง

4.6.1.2 เตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสารสำหรับทำ standard matrix calibration curve จำนวน 1 ตัวอย่างโดยกำหนดระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 และ 4 MRL/ML

4.6.1.3 ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ 3 วัน วันละ 7 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่าง ทำการเติมสารมาตรฐาน 5 ระดับ ดังนี้ 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 MRL/ML

4.6.1.4 ชุดตัวอย่าง internal quality control ประกอบด้วย reagent blank, sample blank และ sample blank fortified with IS

4.6.1.5 คำนวณหาค่า linearity and working range, MDL, MQL, CC_{α} , CC_{β} , trueness (accuracy) and precision (repeatability/within laboratory reproducibility) และ specificity

4.6.2 การคำนวณและประเมินตามเกณฑ์ของแต่ละพารามิเตอร์

4.6.2.1 ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve) และค่าความเข้มข้นช่วงที่ใช้งาน (working range) พิจารณาเลือกช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือ r) มากกว่า 0.995 (สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์, 2555) เพื่อกำหนดเป็นค่าความเข้มข้นช่วงที่ใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ดังการเตรียมกราฟมาตรฐานในตัวอย่างเนื้อไก่ 7 ระดับความเข้มข้น ที่กล่าวข้างต้น

4.6.2.2 ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจชนิดสารได้ (Minimum Detection Limit หรือ MDL) โดยหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่ระดับ MRL ของ 3 ชุดการทดสอบ (ทั้งหมด 21 ซ้ำ) และ คำนวณสถิติโดยใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

$$MDL = t_{99 (n-1)} \times SD \text{ (เมื่อ Degree of freedom = (n-1))}$$

4.6.2.3 ค่าต่ำสุดที่สามารถยืนยันปริมาณสารได้ (Minimum Quantitation Limit หรือ MQL)

$$MQL = 3 \times MDL$$

4.6.2.4 เกณฑ์การตัดสินใจผลทดสอบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ที่ค่าความคลาดเคลื่อนอัลฟา หรือ CC_{α}) โดยเติมสารในตัวอย่างปลอดสารให้ได้ความเข้มข้น เท่ากับ และใกล้เคียง ค่า MRL ด้วยระยะห่างของความเข้มข้นเท่า ๆ กัน ทดสอบตัวอย่าง ยืนยันชนิดสารที่ตรวจได้ และสร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง signal ของตัวอย่างกับค่าความเข้มข้นที่เติม ตามวิธีการที่แนะนำไว้ใน ISO 11843

$CC_{\alpha} = MRL \text{ or } ML + 1.64 \text{ เท่า ของค่า SD ของ ค่าการทวนซ้ำได้ของการวัด (within laboratory reproducibility) ณ ความเข้มข้น MRL or ML ที่ } \alpha\text{-error} = 5 \%$

4.6.2.5 ค่าความสามารถในการตรวจของวิธีทดสอบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ที่ค่าความคลาดเคลื่อนเบต้า หรือ CC_β) หาได้โดยการสร้างกราฟเส้นตรงเช่นเดียวกับ CC_α

$CC_\beta = CC_\alpha + 1.64$ เท่า ของค่า SD ของ ค่าการทวนซ้ำได้ของการวัด (within laboratory reproducibility) ณ ความเข้มข้น CC_α ที่ β -error = 5 %

4.6.2.6 ค่าความแม่นยำ (accuracy) พิจารณาจากร้อยละการกลับคืน (recovery)

ร้อยละการกลับคืน = $\frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)} \times 100}{\text{ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)}}$

4.6.2.7 ค่าความเที่ยง (precision) ของค่าการทวนซ้ำของการวัด (repeatability) พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของแต่ละระดับความเข้มข้นในชุดการทดสอบเดียวกัน (7 ซ้ำ)

4.6.2.8 ค่าความเที่ยง (precision) ของค่าการทวนซ้ำได้ของการวัด (within laboratory reproducibility) พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ (21 ซ้ำ)

4.6.2.9 ความจำเพาะของวิธีทดสอบ (specificity test) เลือกเพิ่มสารมาตรฐานที่มีโครงสร้างและลักษณะสารใกล้เคียงกับสารทั้ง 7 สารที่สนใจวิเคราะห์ คือ Decoquinate (DECO) (เป็นสารกลุ่มประเภท chemical) และ Maduramycin (MAD) (เป็นสารกลุ่มประเภท ionophore) โดยเติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ถ้าวิธีวิเคราะห์ความจำเพาะต่อสารกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ที่ทำการตรวจวิเคราะห์อยู่ ต้องไม่พบสัญญาณรบกวน ของสารมาตรฐานอื่นๆ บริเวณ RT ของสารกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ทั้ง 7 สาร

ตารางที่ 2 เกณฑ์การประเมินค่าความแม่นยำ กำหนดโดยสหภาพยุโรป (CIR (EU) 2021/808)

ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง	ช่วงการยอมรับของค่าเฉลี่ยการกลับคืน (%)
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	50 - 120
$> 1 \mu\text{g/kg}$ to $10 \mu\text{g/kg}$	70 - 120
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	80 - 120

ตารางที่ 3 เกณฑ์การประเมินค่าการทวนซ้ำ กำหนดโดยสหภาพยุโรป (CIR (EU) 2021/808)

ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง	Reproducibility (CV, %)	Repeatability (CV, %)**
> 1,000 µg/kg	16	11
> 120 µg/kg to 1,000 µg/kg	22	15
10 µg/kg to 120 µg/kg	25*	17
< 10 µg/kg	30*	20

หมายเหตุ: (*) เป็นเพียง guideline และควรต่ำที่สุดเท่าที่จะทำได้

(**) Repeatability ควรเป็น 2/3 ของ Reproducibility หรือต่ำกว่า

5. ผลการทดลอง

5.1 Linearity และ working range ของวิธีวิเคราะห์ให้ค่า correlation coefficient ($r \geq 0.995$)

ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Linearity, working range และ correlation coefficient (r) ของสารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ในเนื้อไก่

ชื่อสาร	ช่วงความเข้มข้นที่เป็น Linearity (µg/kg)	Working range (µg/kg)	Correlation coefficient ($r \geq 0.995$)		
			Day 1	Day 2	Day 3
DNC	100 – 800	100 – 600	0.9981	0.9987	0.9990
LSA	30 – 240	30 – 180	0.9970	0.9966	0.9958
SAM	7.5 – 60	7.5 – 45	0.9967	0.9988	0.9953
MNS	4 – 32	4 – 24	0.9966	0.9963	0.9967
NRS	25 – 200	25 – 150	0.9980	0.9982	0.9953
DCZ	250 – 2,000	250 – 1,500	0.9962	0.9954	0.9953
RBD	100 - 800	100 – 600	0.9974	0.9976	0.9986

5.2 ค่า MDL, MQL, CC_{α} และ CC_{β} แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า MDL, MQL, CC_{α} และ CC_{β} ของสารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ในเนื้อไก่

ชื่อสาร	MDL ($\mu\text{g/kg}$)	MQL ($\mu\text{g/kg}$)	CC_{α} ($\mu\text{g/kg}$)	CC_{β} ($\mu\text{g/kg}$)
DNC	13.70	41.11	217.23	229.27
LSA	5.06	15.18	69.65	76.40
SAM	0.85	2.55	17.72	19.63
MNS	0.79	2.37	9.33	10.26
NRS	3.47	10.41	58.55	64.53
DCZ	27.88	83.65	573.73	625.28
RBD	12.51	37.53	215.63	226.56

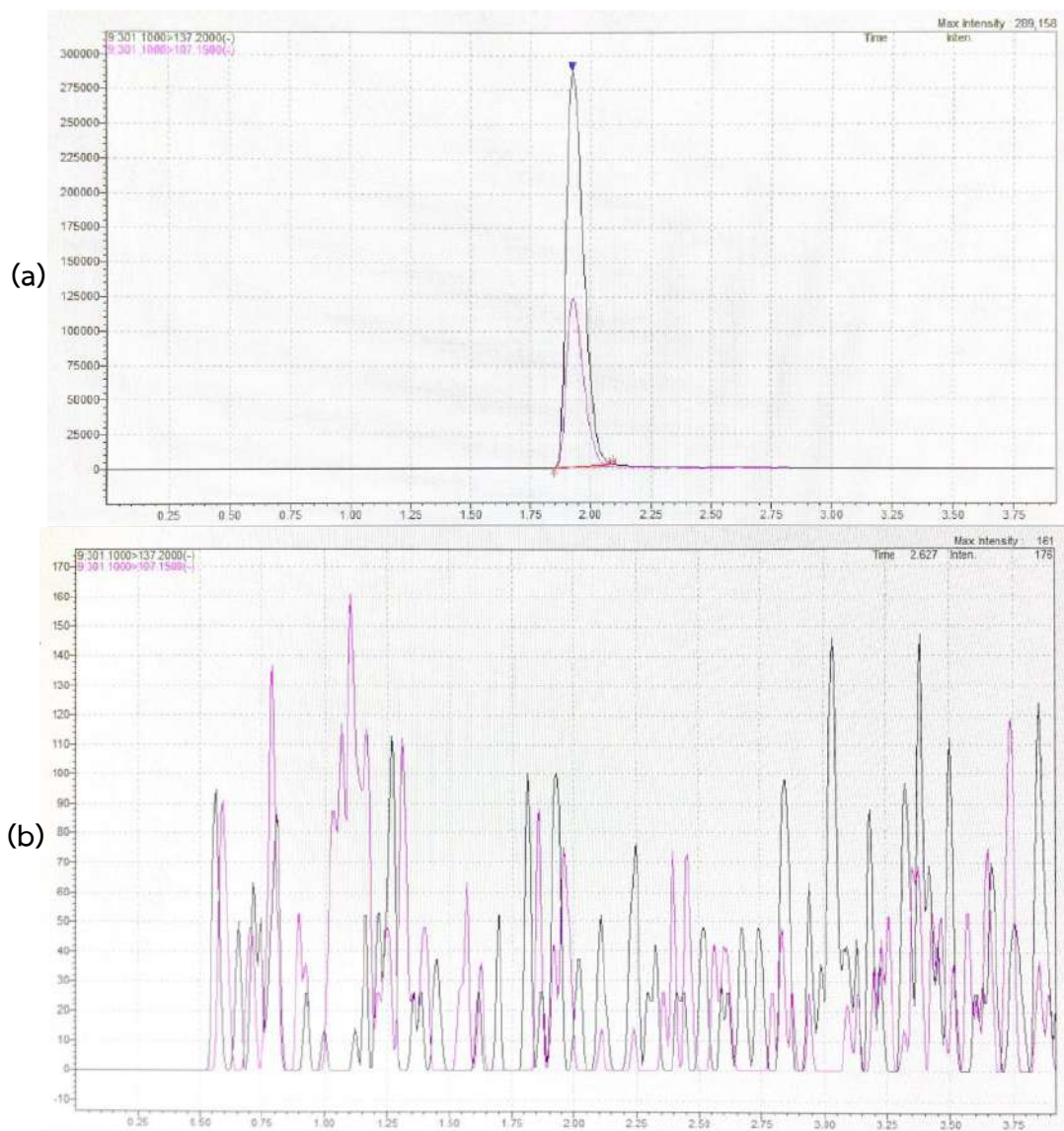
5.3 Accuracy และ precision ให้ค่า %recovery และ %CV ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้ง 7 สาร แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่า Accuracy, repeatability และ within laboratory reproducibility ที่ทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 MRL/ML ในเนื้อไก่

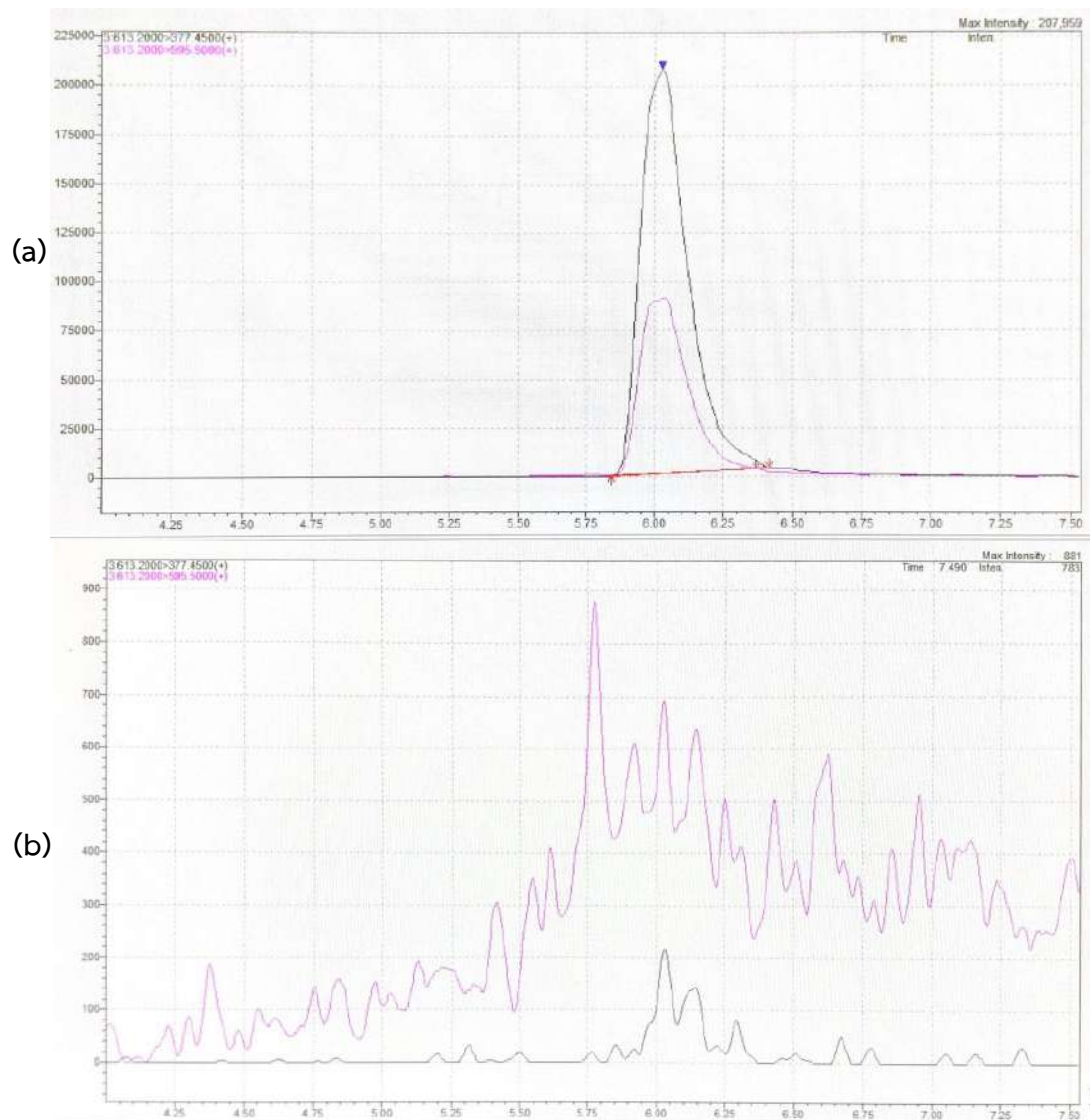
ชื่อสาร	Concentration ($\mu\text{g/kg}$)	Accuracy (%Recovery)	Repeatability (SD_R) (%CV)			Within-laboratory reproducibility (%CV)
			Day 1	Day 2	Day 3	
DNC	0.5 MRL/ML	94.23	4.26	8.57	4.10	5.75
	1 MRL/ML	100.01	2.55	2.07	3.06	4.02
	1.5 MRL/ML	101.79	1.49	2.03	2.14	2.79
	2 MRL/ML	102.79	1.03	0.70	1.04	1.82
LSA	0.5 MRL/ML	103.85	8.24	5.65	4.58	6.43
	1 MRL/ML	102.27	4.31	4.07	2.73	3.68
	1.5 MRL/ML	95.56	1.80	4.32	2.37	3.07
	2 MRL/ML	99.94	3.08	5.36	5.06	4.38

ชื่อสาร	Concentration (µg/kg)	Accuracy (%Recovery)	Repeatability (SD _R) (%CV)			Within-laboratory reproducibility (%CV)
			Day 1	Day 2	Day 3	
SAM	0.5 MRL/ML	99.19	2.00	4.29	3.38	4.52
	1 MRL/ML	101.08	3.03	0.78	3.77	5.10
	1.5 MRL/ML	100.42	3.66	5.83	4.95	5.33
	2 MRL/ML	105.08	4.16	4.58	6.70	5.42
MNS	0.5 MRL/ML	109.27	9.02	4.64	7.08	7.15
	1 MRL/ML	111.33	5.12	4.49	5.21	4.79
	1.5 MRL/ML	101.69	3.59	5.05	4.06	4.28
	2 MRL/ML	102.76	3.10	4.04	3.87	3.53
NRS	0.5 MRL/ML	99.19	6.30	5.42	4.19	5.54
	1 MRL/ML	97.66	1.99	3.23	4.24	3.49
	1.5 MRL/ML	100.18	2.36	6.79	4.62	4.76
	2 MRL/ML	108.24	1.34	4.79	4.92	4.13
DCZ	0.5 MRL/ML	111.31	2.65	2.44	3.20	3.96
	1 MRL/ML	110.58	4.23	4.39	3.55	4.30
	1.5 MRL/ML	107.71	1.27	4.36	2.86	3.13
	2 MRL/ML	104.57	1.94	4.50	6.43	4.43
RBD	0.5 MRL/ML	94.41	3.09	6.06	5.36	5.24
	1 MRL/ML	98.60	1.43	3.97	2.33	2.90
	1.5 MRL/ML	98.59	1.85	3.83	1.90	2.58
	2 MRL/ML	101.28	2.16	0.82	1.28	1.48

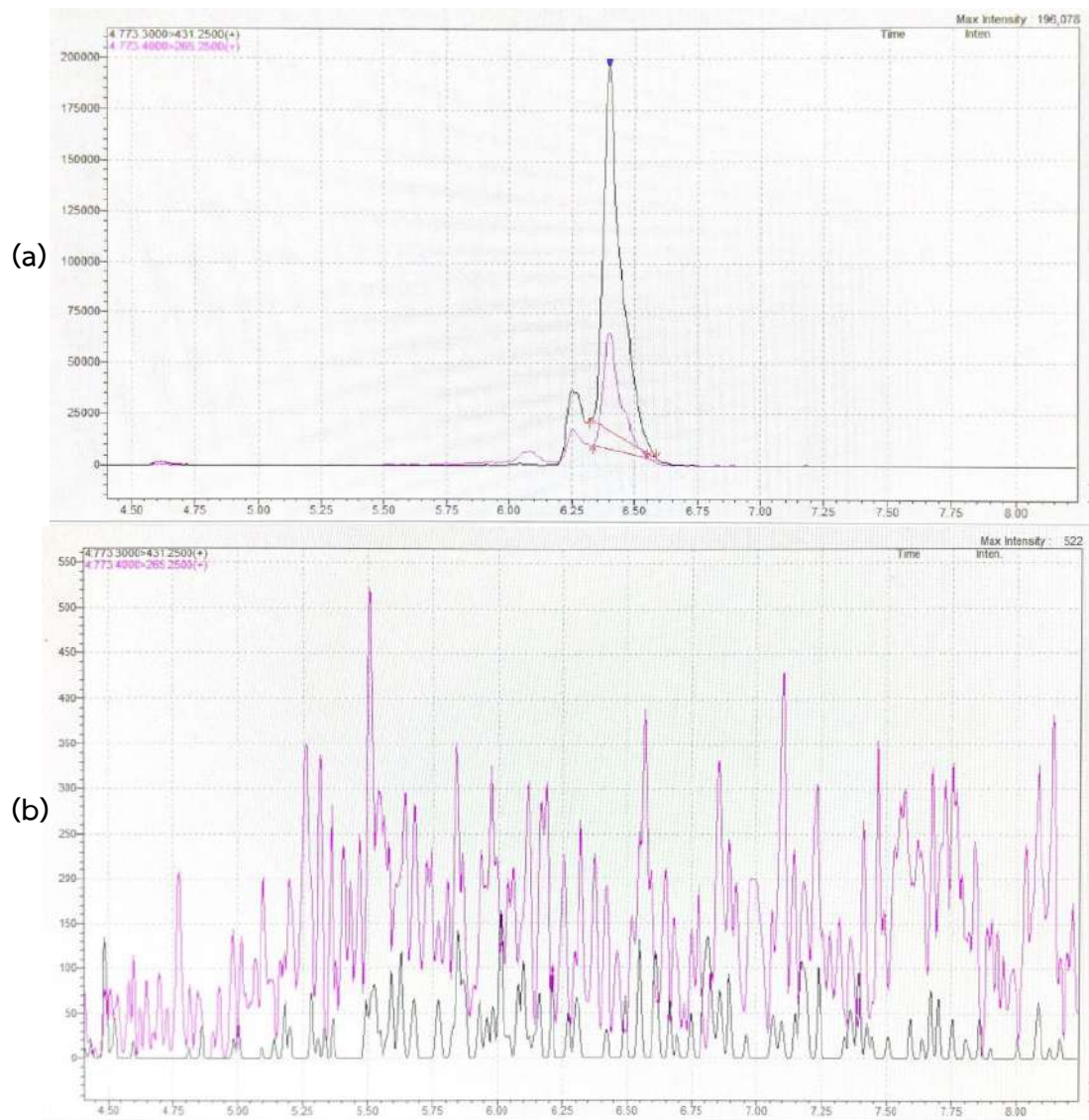
5.4 จากการทดสอบความจำเพาะของวิธีทดสอบ (specificity test) วิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ ปลอดภัย ที่นำมาเติมสารมาตรฐาน DECO และ MAD ไม่พบสัญญาณรบกวนบริเวณ RT ของทุกสาร สรุปได้ว่าวิธีทดสอบนี้มีความจำเพาะต่อสารตกค้างกลุ่มที่สนใจวิเคราะห์ ได้แก่ DNC, LSA, SAM, MNS, NRS, DCZ และ RBD ผลการทดสอบแสดงดังแผนภูมิที่ 1-7



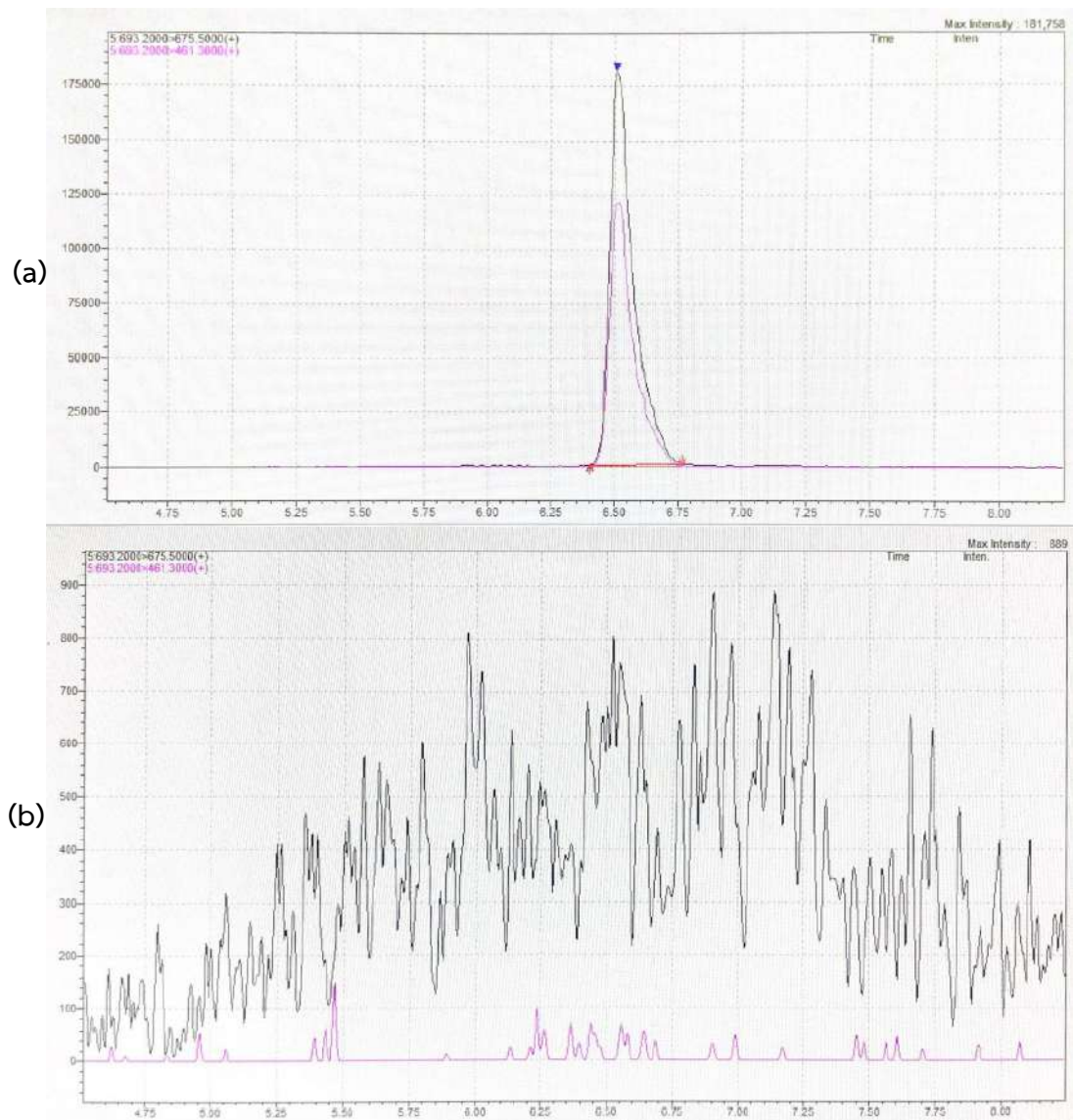
แผนภูมิ 1 (a) Chromatogram ของการฉีดสารมาตรฐาน DNC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ standard matrix calibration curve (100 $\mu\text{g/kg}$), (b) Chromatogram ของการฉีดสารละลายมาตรฐาน ในตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสาร ที่นำมาเติมสารมาตรฐาน DECO (8 $\mu\text{g/kg}$) และ MAD (8 $\mu\text{g/kg}$) ไม่พบสัญญาณรบกวนบริเวณ RT ของสาร DNC (RT = 1.92 min)



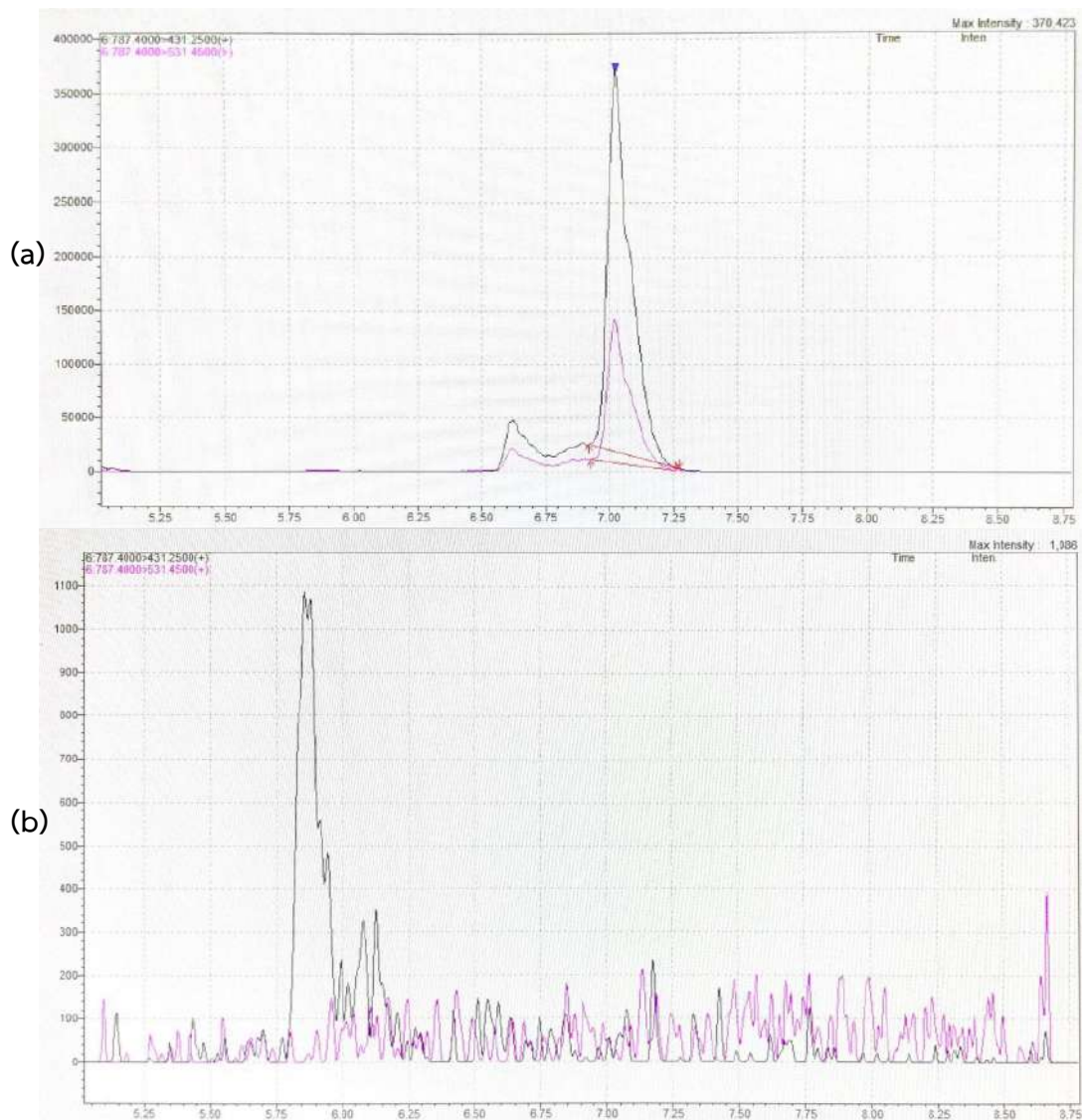
แผนภูมิ 2 (a) Chromatogram ของการฉีดสารมาตรฐาน LSA ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ standard matrix calibration curve (30 $\mu\text{g/kg}$), (b) Chromatogram ของการฉีดสารละลายมาตรฐาน ในตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสาร ที่นำมาเติมสารมาตรฐาน DECO (8 $\mu\text{g/kg}$) และ MAD (8 $\mu\text{g/kg}$) ไม่พบสัญญาณรบกวนบริเวณ RT ของสาร LSA (RT = 5.98 min)



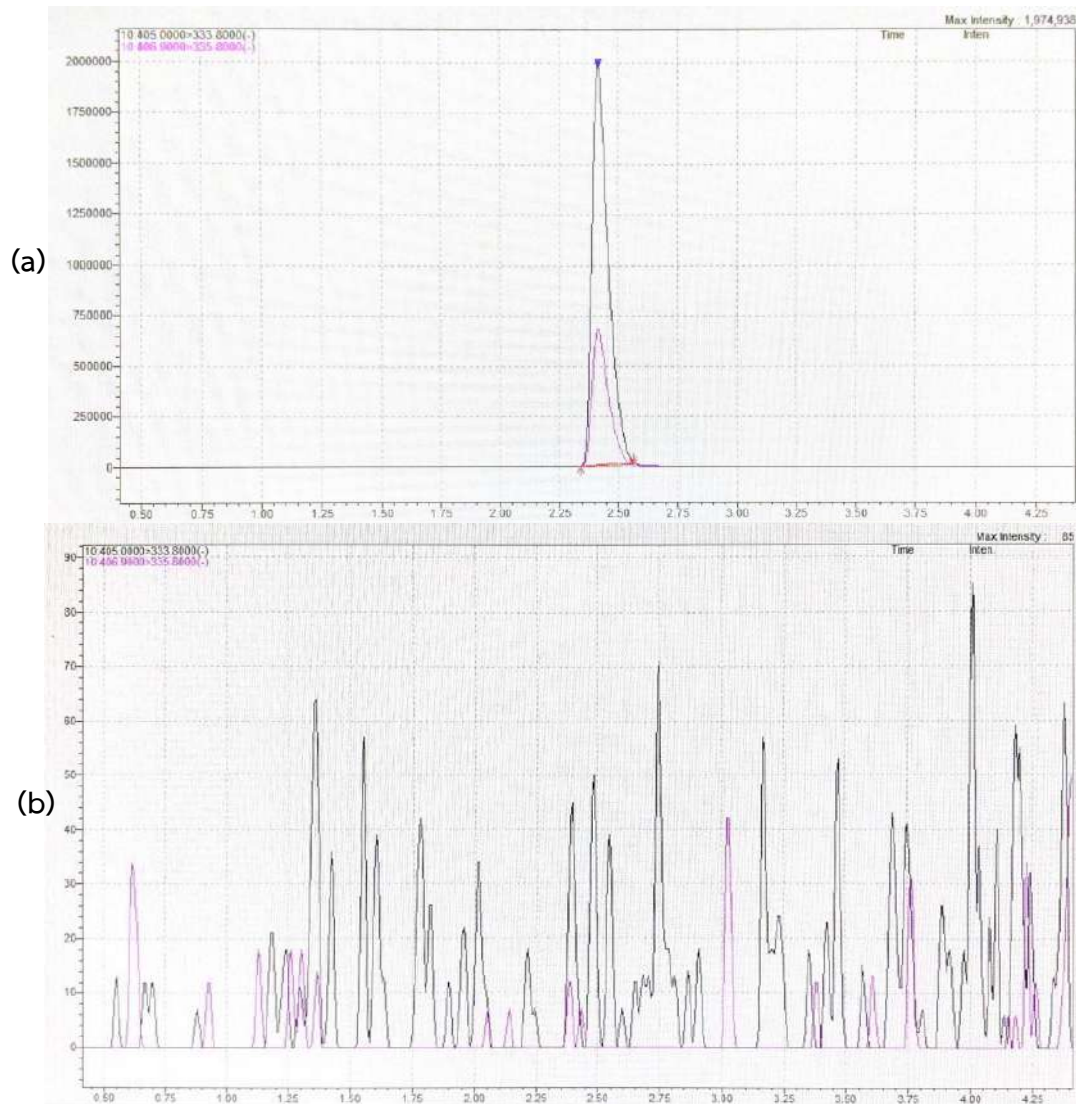
แผนภูมิ 3 (a) Chromatogram ของการฉีดสารมาตรฐาน SAM ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ standard matrix calibration curve (7.5 µg/kg), (b) Chromatogram ของการฉีดสารละลายมาตรฐาน ในตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสาร ที่นำมาเติมสารมาตรฐาน DECO (8 µg/kg) และ MAD (8 µg/kg) ไม่พบสัญญาณรบกวนบริเวณ RT ของสาร SAM (RT = 6.40 min)



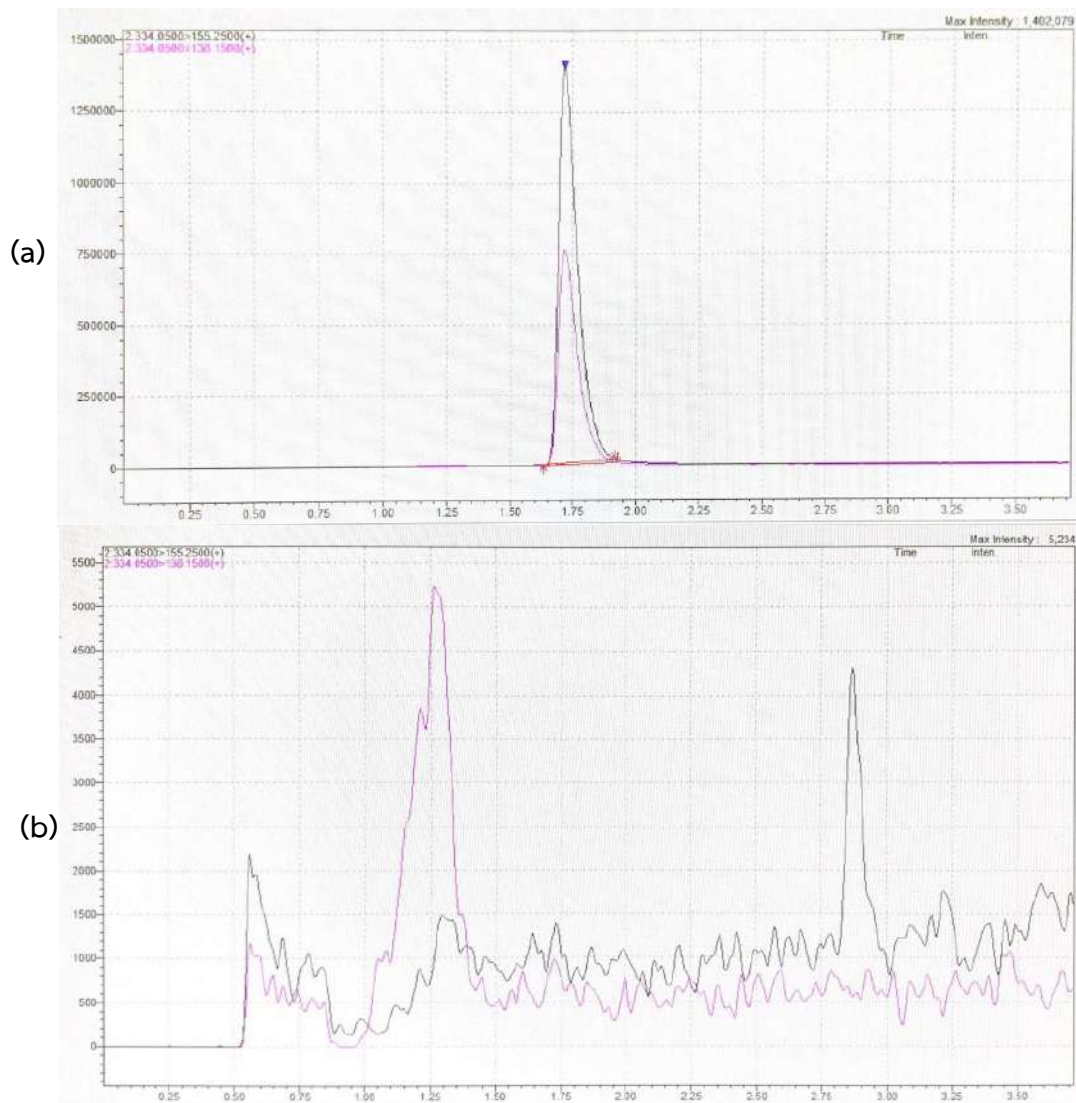
แผนภูมิ 4 (a) Chromatogram ของการฉีดสารมาตรฐาน MNS ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ standard matrix calibration curve ($4 \mu\text{g/kg}$), (b) Chromatogram ของการฉีดสารละลายมาตรฐาน ในตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสาร ที่นำมาเติมสารมาตรฐาน DECO ($8 \mu\text{g/kg}$) และ MAD ($8 \mu\text{g/kg}$) ไม่พบสัญญาณรบกวนบริเวณ RT ของสาร MNS ($\text{RT} = 6.51 \text{ min}$)



แผนภูมิ 5 (a) Chromatogram ของการฉีดสารมาตรฐาน NRS ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ standard matrix calibration curve (25 µg/kg), (b) Chromatogram ของการฉีดสารละลายมาตรฐาน ใน ตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสาร ที่นำมาเติมสารมาตรฐาน DECO (8 µg/kg) และ MAD (8 µg/kg) ไม่พบ สัญญาณรบกวนบริเวณ RT ของสาร NRS (RT = 7.02 min)



แผนภูมิ 6 (a) Chromatogram ของการฉีดสารมาตรฐาน DCZ ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ standard matrix calibration curve (250 $\mu\text{g/kg}$), (b) Chromatogram ของการฉีดสารละลายมาตรฐาน ในตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสาร ที่นำมาเติมสารมาตรฐาน DECO (8 $\mu\text{g/kg}$) และ MAD (8 $\mu\text{g/kg}$) ไม่พบสัญญาณรบกวนบริเวณ RT ของสาร DCZ (RT = 2.41 min)



แผนภูมิ 7 (a) Chromatogram ของการฉีดสารมาตรฐาน RBD ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ standard matrix calibration curve (100 µg/kg), (b) Chromatogram ของการฉีดสารละลายมาตรฐาน ในตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดสาร ที่นำมาเติมสารมาตรฐาน DECO (8 µg/kg) และ MAD (8 µg/kg) ไม่พบสัญญาณรบกวนบริเวณ RT ของสาร RBD (RT = 1.71 min)

6. สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและหาปริมาณของสารตกค้างกลุ่ม Coccidiostats และ Histomonostats ทั้ง 7 ชนิด ในเนื้อสัตว์ปีก โดยพารามิเตอร์ทุกพารามิเตอร์ที่ทำการตรวจสอบผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมการอาหารยุโรป CIR (EU) 2021/808 บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ และสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมต่างๆ ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้

7. ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นี้ ต้องทดสอบ stability, ruggedness และ relative matrix effects เพิ่มเติม เพื่อให้ครอบคลุมทุกพารามิเตอร์ตามที่แนวมติคณะกรรมการยุโรป CIR (EU) 2021/808 กำหนด

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จ ล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผล และวิธีคัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. ปทุมธานี.

Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009. Official Journal of the European Union, No. L15, 1-7.

Commission Implementing Regulation (EU) No. 885/2014 of 13 August 2014. Official Journal of the European Union, L 242/20.

Commission Implementing Regulation (EU) No. 1277/2014 of 1 December 2014. Official Journal of the European Union, L 346/23.

Commission Implementing Regulation (EU) No. 2015/46 of 14 January 2015. Official Journal of the European Union, L 9/5.

Commission Implementing Regulation (EU) No. 2017/1914 of 19 October 2017. Official Journal of the European Union, L 271/1.

Commission Implementing Regulation (EU) No. 2020/148 of 3 February 2020. Official Journal of the European Union, L 33/1.

Commission Implementing Regulation (EU) No. 2020/994 of 9 July 2020.
Official Journal of the European Union, L 221/79.

Commission Implementing Regulation (EU) No. 808/2021 of 22 March 2021.
Official Journal of the European Union, L 180/84.

Kevin Woodward. 2013. Toxicological Effects of Veterinary Medical Products in
Humans. Chapter 9. Volume 2.