

การพัฒนาวิธีทดสอบ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

สุนันท์ กิตติจารวัฒนา ชุติศักดิ์ อาจสูงเนิน งามอาจ บุญบรรลุ ธนธรณ์ ดั่งทอง

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีทดสอบ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ใช้คอลัมน์ Phenomenex, Kinetex C₁₈, 2.6 ไมโครเมตร ขนาด 150 × 3.0 มิลลิเมตร อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณการฉีด 5 ไมโครลิตร ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่คือ 0.1% formic acid ใน water และ 0.1% formic acid ใน acetonitrile (60 : 40, v/v) ในแบบ isocratic elution สามารถหาค่า tiamulin ได้ภายใน 10 นาที ทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นช่วงความเข้มข้น 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ที่ 0.9982 ศึกษา matrix effect พบว่ามีการเกิดสัญญาณของสารที่ทดสอบลดลง ในการพัฒนาวิธีการสกัดโดยแปรชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตรสารละลาย ระยะเวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง พบว่าการใช้ 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ระยะเวลา 20 นาที ทำการสกัด 3 รอบ เป็นวิธีการสกัดที่เหมาะสม ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ได้ต่อไป

คำสำคัญ : tiamulin, matrix effect, isocratic elution, mass spectrometry

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method development for the determination of tiamulin in medicated feed by liquid chromatography mass spectrometry

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsoongnearn,
Ongart Boonbanlu, Thanathorn Duangthong

Abstract

The development of a quantitative determination method for tiamulin in medicated feed employing liquid chromatography-mass spectrometry with Phenomenex, Kinetex C18 column, 2.6 μ m particle size, 150 mm 3.0 mm id, flow rate 0.2 mL/min and 5 μ L injection volume. In isocratic elution, the mobile phase comprised of 0.1% formic acid in DI water and 0.1% formic acid in acetonitrile (60:40, v/v). Tiamulin was eluted within 10 minutes. The linearity between 100 and 300 mg/kg was determined. The value of the correlation coefficient (*r*) was 0.9982. During the analyses, matrix suppression was discovered to have occurred. The variables that affect the performance of sample extraction, including sample type, the ratio of organic solvents, extraction volume, extraction time, and extraction cycles, were evaluated. The results indicated that 30 mL of 0.1% formic acid in 80% acetonitrile (v/v) with three 20-minute extraction cycles was a suitable sample extraction. The developed approach can therefore be used to evaluate the method validation for tiamulin in medicated feed using liquid chromatography-mass spectrometry.

Keywords: tiamulin, medicated feed, liquid chromatography-mass spectrometry

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development.

บทนำ

ยาสัตว์เป็นปัจจัยการผลิตหนึ่งที่มีความสำคัญในการเลี้ยงสัตว์ เป็นต้นทุนในการเลี้ยงสัตว์ของเกษตรกรและเป็นเครื่องมือหนึ่งในการป้องกันรักษาโรคที่มีผลต่อสุขภาพสัตว์ และมนุษย์ จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพยาสัตว์ที่ใช้ในประเทศที่มีวางจำหน่ายในร้านขายยาสัตว์ ตลอดจนถึงการควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่โรงงานผลิตอาหารสัตว์เพื่อป้องกัน ควบคุม และกำจัดโรคสัตว์ได้ผลดีปราศจากปัญหาจากยาสัตว์ตกค้าง และช่วยชะลอปัญหาการเกิดเชื้อดื้อยาในสัตว์

ในอดีตการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์นั้นมีวัตถุประสงค์หลัก 3 ประการ คือ 1) เพื่อการรักษา 2) เพื่อการป้องกันโรคและ 3) เพื่อเร่งการเจริญเติบโต ลักษณะการใช้ยาในแต่ละวัตถุประสงค์ก็มีความแตกต่างกันไป การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการป้องกันการเกิดโรคนั้นจะใช้ยาขณะที่สัตว์อ่อนแอ มีโอกาสติดเชื้อและเกิดโรคได้ง่าย เช่น สัตว์อยู่ในระหว่างการขนย้ายการเลี้ยงสัตว์อย่างแออัดไม่ถูกสุขลักษณะทำให้สัตว์เกิดความเครียดและอ่อนแอตามมา การให้ยาในลักษณะป้องกันนี้จะให้ยาแก่สัตว์ทั้งฝูงโดยการผสมในน้ำหรือในอาหารที่ให้อาหารกิน ส่วนการใช้เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในส่วนใหญ่มักจะผสมในอาหาร (feed additive) แต่ใช้ยาปฏิชีวนะในขนาดต่ำ ๆ และให้ยาแก่สัตว์เป็นระยะเวลานาน ๆ ซึ่งจะช่วยให้สัตว์มีการเจริญเติบโตเร็วขึ้นและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (ใจพร, 2555)

อย่างไรก็ดีปัจจัยหลักในการเกิดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ เกิดขึ้นเมื่อเชื้อแบคทีเรียในสัตว์เกิดการสัมผัสกับยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานาน ๆ ทำให้เชื้อแบคทีเรียในสัตว์เกิดการพัฒนายีนส์ต้านทานยาขึ้น นอกจากนี้เชื้อดื้อยาในสัตว์ยังสามารถเกิดการแพร่กระจายไปในสัตว์ตัวอื่น และ/หรือสู่คนทางห่วงโซ่อาหารได้ การใช้ยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะเพื่อเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์นั้น เชื้อมีโอกาสสัมผัสกับยาเป็นเวลานานจึงเกิดการดื้อยาได้ (ใจพร, 2555)

ด้วยเหตุผลดังกล่าวภายใต้แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาด้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564 ยุทธศาสตร์ที่ 4 การป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยาและควบคุมกำกับดูแลการใช้ยาด้านจุลชีพอย่างเหมาะสมในภาคการเกษตรและสัตว์เลี้ยง กรมปศุสัตว์ได้มุ่งมั่นดำเนินการเพื่อให้บรรลุเป้าหมายในการลดการใช้ยาด้านปฏิชีวนะลงร้อยละ 30 รวมถึงอาหารสัตว์ที่ผสมยาประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการควบคุมการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยา ซึ่งมีการกำหนดหลักเกณฑ์การควบคุมคุณภาพที่สำคัญคือ ทดสอบการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และ ทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีการกระจายตัวของยาอย่างสม่ำเสมอตามใบสั่งยาของสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์ม สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงไม่เกิดการปนเปื้อนข้ามระหว่างชุดการผลิตต่อมา เกินจากที่กฎหมายกำหนด เป็นการลดโอกาสเกิดสารตกค้างรวมถึงการเกิดเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ ซึ่งการตรวจสอบกำหนดให้ใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ homogeneity และ drug carryover

Tiamulin เป็นสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้สำหรับรักษาสุกรและสัตว์ปีก แต่ยังมีใช้ในโค แพะ และแกะ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก เช่น streptococci, staphylococci และแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (obligate anaerobes) และเป็นยาที่ใช้รักษาโรคบิดมูกเลือดในสุกรซึ่งเกิดจากเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae*, โรคปอดบวมจากเชื้อ *Pasteurella multocida* (Dorota et al., 2010)

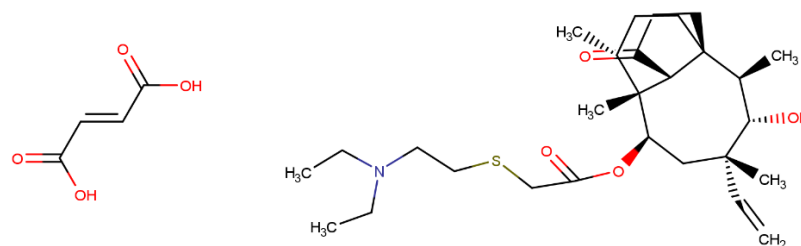


Fig. 1. Structure of tiamulin fumarate.

Dorota et al., (2010) ได้ทำการศึกษาการสกัดตัวอย่าง tiamulin ในรูปแบบสารผสมล่วงหน้า (premix) และอาหารสัตว์ที่ผสมยา (medicated feeding stuff) โดยสกัดตัวอย่างสารผสมล่วงหน้าด้วยน้ำ และสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาด้วย 1% sodium acetate in water และ hexane: ethyl acetate จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง กรอง และเจือจางด้วย 1% tartaric acid solution ก่อนนำไปฉีดผ่านคอลัมน์ C18, 4.6 x 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร ใช้ mobile phase เป็น methanol: acetonitrile: 1% ammonium carbonate ที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร และนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) จากการทดสอบพบว่า รูปร่างของโครมาโตแกรมที่ดีที่สุดจากการทดสอบจะใช้อัตราส่วน mobile phase 50:25:25 pH ของ ammonium carbonate เท่ากับ 9.1 มีค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) เท่ากับ 0.9999 ในช่วงความเข้มข้น 0.02 - 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) เท่ากับ 93% และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1.5%

Ewelina et al., (2018) ได้พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบสำหรับหาปริมาณ tiamulin, trimethoprim, tylosin, sulfadiazine และ sulfamethazine ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยสกัดตัวอย่างด้วยน้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS ใช้ Phenomenex, Kinetex biphenyl column ขนาด 50 x 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร mobile phase เป็นแบบ gradient โดยมีส่วนผสมระหว่าง 0.1% formic acid ใน acetonitrile และ 0.1% formic acid ในน้ำ จากการศึกษพบว่า ค่า linearity ได้ค่า $r^2 > 0.99$ ค่า precision < 14% ค่า within-laboratory reproducibility < 24% ค่า recovery เท่ากับ 73.58-115.21% มีการทดสอบ sensitivity, LOD และ LOQ และได้นำวิธีนี้ให้ห้องปฏิบัติการใช้ในการตรวจสอบอาหารสัตว์ที่ผสมยา 2 ตัวอย่างจากผู้ผลิตอาหารสัตว์จากสเปนในเดือนสิงหาคม 2017 พบว่าสามารถตรวจพบ tiamulin, tylosin และ sulfamethazine ได้

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบ tiamulin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับพัฒนาวิธีทดสอบ tiamulin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่ช่วงระดับความเข้มข้น 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณด้วยวิธีสำคัญและและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีทดสอบ tiamulin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีต่อไปได้

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 เครื่อง LC-MS ion trap ยี่ห้อ Bruker รุ่น HTC
- 4.1.2 เครื่อง Shaker ยี่ห้อ Yamato รุ่น SA 31
- 4.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Thermo รุ่น Sorvall LYNX 4000
- 4.1.4 เครื่อง Ultrasonic bath ยี่ห้อ Branson รุ่น B5510E-DTH
- 4.1.5 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ ยี่ห้อ Thermo รุ่น Lab Tower EDI 30
- 4.1.6 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XP205DR
- 4.1.7 เครื่องชั่งน้ำหนักระบบดิจิทัล ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PB1502
- 4.1.8 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ pHcbi รุ่น MPR-1412R-PE
- 4.1.9 ตู้ดูดควัน (fume hood)
- 4.1.10 Beaker ขนาด 5, 50 และ 250 มิลลิลิตร
- 4.1.11 Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 4.1.12 Dispenser ขนาด 0 – 50 มิลลิลิตร
- 4.1.13 Disposable syringe ชนิดไม่มีหัวเข็ม ขนาด 3 มิลลิลิตร
- 4.1.14 Micropipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร
- 4.1.15 Syringe filter, PTFE, 0.20 ไมโครเมตร
- 4.1.16 Vial สีขาว พร้อมฝา ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 4.1.17 Volumetric flask ขนาด 50, 100, 200 และ 1,000 มิลลิลิตร

4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.2.1 Acetonitrile, LC grade
- 4.2.2 Formic acid, AR grade
- 4.2.3 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M Ω .cm (น้ำ DI)
- 4.2.4 สารมาตรฐาน tiamulin ยี่ห้อ TRC
- 4.2.5 LC-column ยี่ห้อ Phenomenex, Kinetex 2.6 ไมโครเมตร C18 ขนาด 150 × 3.0 มิลลิเมตร

4.3 ตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับเตรียม fortified sample และ sample blank (อาหารสุกร
น้ำหนัก 15-25 กิโลกรัม)

4.4 ขั้นตอนการทดลอง

4.4.1 Condition ของ LC และ mass ที่ใช้ในการทดสอบ

Table 1 LC condition.

Parameters	Value
Mobile phase:	0.1% FA in water: 0.1% FA in acetonitrile (60: 40, v/v)
Flow rate:	0.2 mL/min
Column temperature:	35 °C
Sample temperature:	20 °C
Injection volume:	5 µL

Table 2 ESI parameters.

Parameters	Value
Interface	ESI
Interface Voltage	4.0 kV
Nebulizer	30 psi
Drying Gas	6 L/min
Dry Temp	350 °C

Table 3 MS detection.

Compounds	Precursor ions (m/z)	Product ions (m/z)
Tiamulin	494.3	192.1

4.4.2 Mobile phase

4.4.2.1 0.1% formic acid in DI water: เตรียมโดยปิเปต formic acid 0.5 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำ DI water 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer กรองผ่าน nylon filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไป degas

4.4.2.2 0.1 % formic acid in acetonitrile: เตรียมโดยปิเปต formic acid 0.5 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำ acetonitrile 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer กรองผ่าน PTFE filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไป degas

4.4.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน tiamulin fumarate ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน tiamulin ประมาณ 50 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.4.4 การเตรียม standard calibration curve solution

4.4.4.1 Blank เป็น acetonitrile

4.4.4.2 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จากนั้นปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.4.4.3 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.038 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จากนั้น ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.4.4.4 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จากนั้น ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.4.4.5 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.063 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จากนั้น ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.4.4.6 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.075 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จากนั้นปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.4.5 การเตรียม sample blank

4.4.5.1 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ทำการตรวจสอบแล้วไม่พบ tiamulin

4.4.5.2 บดตัวอย่างด้วยเครื่องบดตัวอย่างครั้งละประมาณ 50 กรัม จนตัวอย่างละเอียด

4.4.6 การเตรียม matrix-fortified sample

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง นำไปสกัดตามข้อ 4.4.7

4.4.7 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

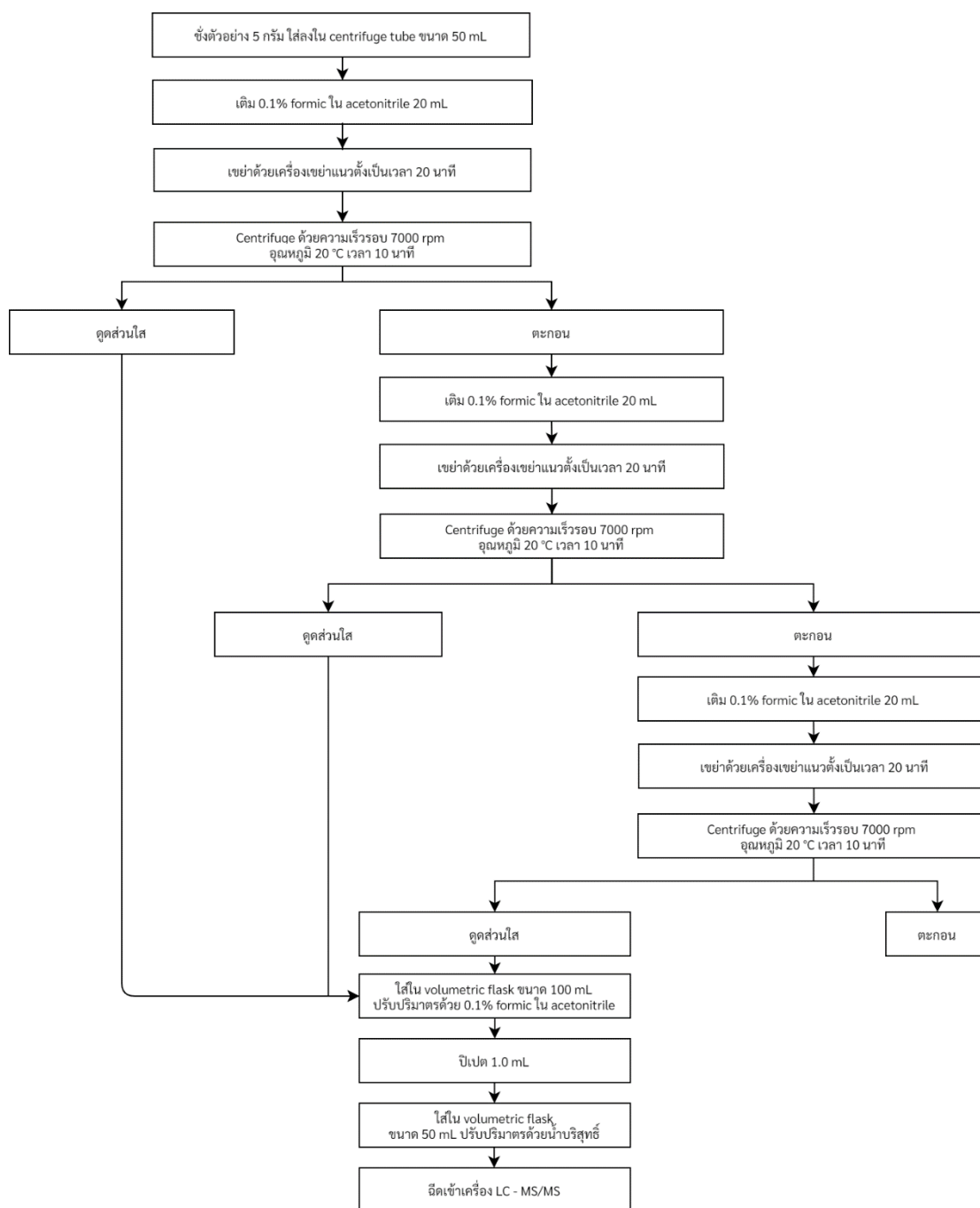


Fig. 2. Sample preparation procedure.

4.4.8 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve ให้มีความเข้มข้นของตัวอย่างอยู่ในช่วง 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวม sample blank (0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ และฉีด 3 injection นำค่าพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005) โดยมีขั้นตอนการเตรียมตาม table 4 และนำไปสกัดตามข้อ 4.4.7

Table 4 Preparation of a matrix-fortified calibration curve.

Level	Medicated feed sample (g)	Addition of 5,000 mg/L amoxicillin Std. (mL)	Solution concentration (mg/L)	Sample concentration (mg/kg)
1	5	-	0	0
2	5	0.1	0.025	100
3	5	0.15	0.038	150
4	5	0.2	0.050	200
5	5	0.25	0.063	250
6	5	0.3	0.075	300

4.4.9 ศึกษา matrix effect ของการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา tiamulin โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve ตามข้อ 4.4.8 และนำไปสกัดตามข้อ 4.4.7 เทียบกับการเตรียม standard calibration curve solution ตามข้อ 4.4.4 จากนั้นคำนวณหา matrix effect โดยใช้สูตร

$$\text{Matrix effect} = \frac{\text{Slope ของ matrix-fortified calibration curve}}{\text{Slope ของ standard calibration curve solution}} \times 100$$

4.4.10 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ในสารละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 0.1% formic acid ใน 20% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 40% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 60% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile และ 0.1% formic acid ใน 100% acetonitrile โดยการเตรียม matrix-fortified calibration ตามข้อ 4.4.8 เตรียม matrix-fortified sample ตามข้อ 4.4.6 และสกัดตัวอย่างตามข้อ 4.4.7

- 4.4.10.1 การเตรียม 0.1% formic acid ใน 20% acetonitrile: เตรียมโดยการ
ตวง acetonitrile 200 มิลลิลิตร ตวง DI water 800 มิลลิลิตร และ
ปิเปต formic acid 1 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด
1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- 4.4.10.2 การเตรียม 0.1% formic acid ใน 40% acetonitrile: เตรียมโดยการ
ตวง acetonitrile 400 มิลลิลิตร ตวง DI water 600 มิลลิลิตร และ
- 4.4.10.3 ปิเปต formic acid 1 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด
1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- 4.4.10.4 การเตรียม 0.1% formic acid ใน 60% acetonitrile: เตรียมโดยการ
ตวง acetonitrile 600 มิลลิลิตร ตวง DI water 400 มิลลิลิตร และ
ปิเปต formic acid 1 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด
1,000 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- 4.4.10.5 การเตรียม 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile: เตรียมโดยการ
ตวง acetonitrile 800 มิลลิลิตร ตวง DI water 200 มิลลิลิตร และ
ปิเปต formic acid 1 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด
1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- 4.4.10.6 การเตรียม 0.1% formic acid ใน 100% acetonitrile: เตรียมโดยการ
ตวง acetonitrile 1,000 มิลลิลิตร และปิเปต formic acid 1 มิลลิลิตร
ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้
magnetic stirrer
- 4.4.11 ศึกษาปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างโดยใช้ 0.1% formic acid ใน
80% acetonitrile ในการสกัดตัวอย่างที่ 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร โดยการเตรียม
matrix-fortified calibration ตามข้อ 4.4.8 เตรียม matrix-fortified sample ตาม
ข้อ 4.4.6 และสกัดตัวอย่างตามข้อ 4.4.7
- 4.4.12 ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างที่ 20 - 90 นาที (20, 30, 40, 50 60, 70,
80 และ 90 นาที) โดยการสกัดรอบเดียว ใช้สารละลาย 0.1% formic acid ใน
80% acetonitrile ในการสกัดปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยการเตรียม matrix-
fortified calibration ตามข้อ 4.4.8 เตรียม matrix-fortified sample ตามข้อ
4.4.6 และสกัดตัวอย่างตามข้อ 4.4.7
- 4.4.13 ศึกษาจำนวนรอบในการสกัดตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาความ
เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มาใช้ในการทดสอบ ใช้สารละลาย 0.1% formic
acid ใน 80% acetonitrile ในการสกัดปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยการเตรียม
matrix-fortified calibration ตามข้อ 4.4.8 เตรียม matrix-fortified sample ตาม
ข้อ 4.4.6 และสกัดตัวอย่างตามข้อ 4.4.7

5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษา linearity โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve โดยการทดสอบตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตาม table 5 และ Fig. 3

Table 5 Linearity of tiamulin matrix-fortified calibration curve.

Parameters	Matrix-fortified calibration curve
Slope	4964507.5756
Intercept	-996.151
r	0.9982
r^2	0.9964

จากผลการศึกษา linearity ตาม table 5 พบว่า การทดสอบตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า r เท่ากับ 0.9982 ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า tiamulin มี linearity ในช่วงดังกล่าว

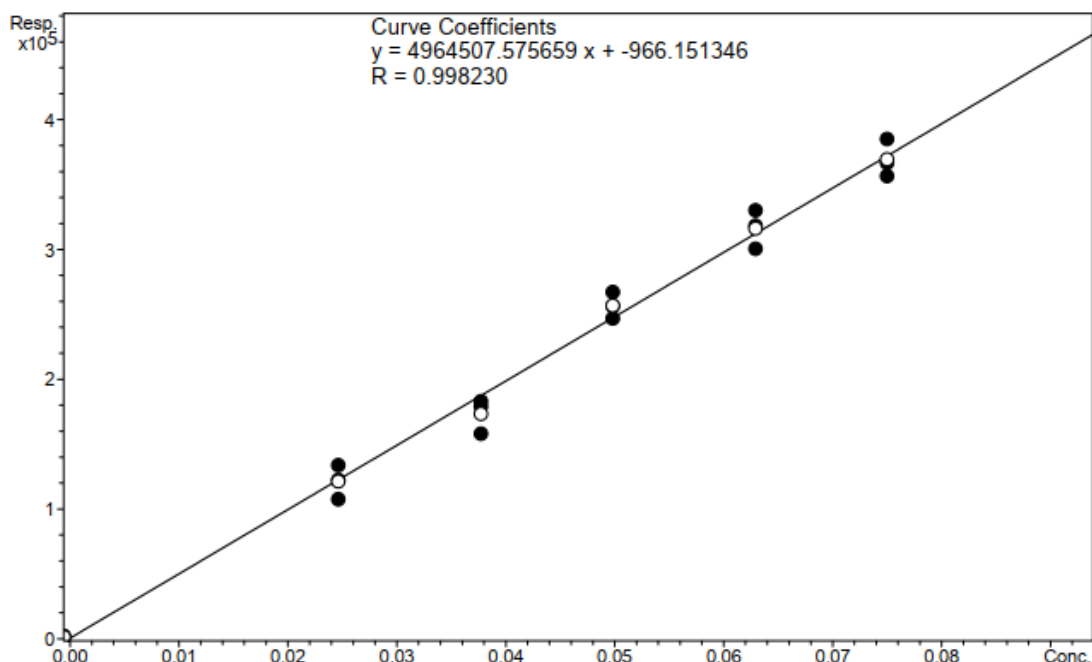


Fig. 3. Matrix-fortified calibration curve of tiamulin.

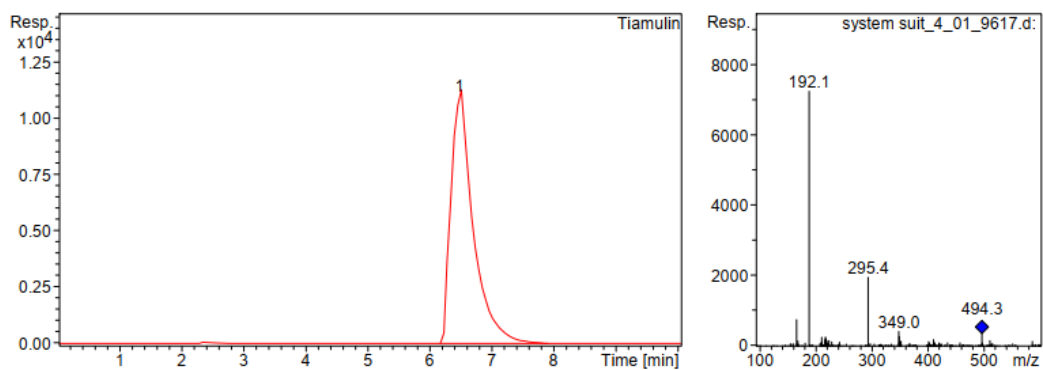


Fig. 4. Chromatogram of tiamulin.

5.2 ผลการศึกษา matrix effect ของการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา tiamulin โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve เทียบกับ standard calibration curve solution ตาม table 6 และ Fig. 5 โดยนำค่า slope มาคำนวณตามข้อ 4.10 ได้ค่าเท่ากับ 79.90 พบว่ามีการเกิดสัญญาณลดของสารที่ทดสอบ (signal suppression) จึงสรุปได้ว่า matrix มีอิทธิพลต่อการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา tiamulin

Table 6 Linearity of tiamulin matrix-fortified and standard solution calibration curve.

Parameters	Matrix-fortified calibration curve	Standard solution calibration curve
Slope	53127684.3699	66486452.5638
Intercept	264903.4446	-39392.9854
r	0.9982	0.9981
r^2	0.9964	0.9962

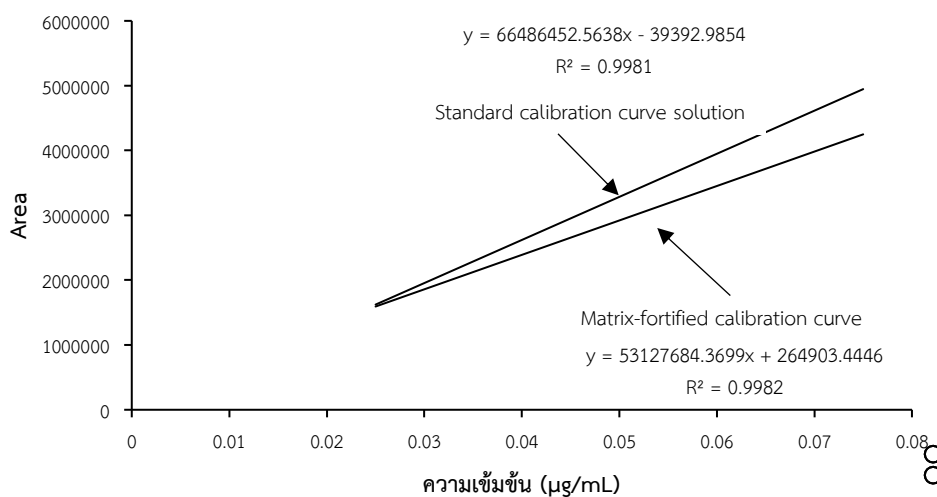


Fig. 5. Matrix effect of tiamulin medicated feed sample.

5.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ในสารละลายที่ใช้สกัดตัวอย่างเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 0.1% formic acid ใน 20% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 40% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 60% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile และ 0.1% formic acid ใน 100% acetonitrile พบว่าการสกัดตัวอย่างโดยใช้ 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile จะให้ %recovery ที่ดีที่สุดและรองลงมาคือ 0.1% formic acid ใน 60% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 100% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 40% acetonitrile และ 0.1% formic acid ใน 20% acetonitrile ตามลำดับ ตาม table 7-8

Table 7 Sample extraction effectiveness employing extraction solvent ranges from 20 to 100% organic solvent composition.

No.	0.05 mg/L fortified concentration				
	0.1% in 20% ACN	0.1% in 40% ACN	0.1% in 60% ACN	0.1% in 80% ACN	0.1% in 100% ACN
1	0.0125	0.0178	0.0245	0.0263	0.0161
2	0.0081	0.0098	0.0245	0.0289	0.0234
3	0.0135	0.0187	0.0210	0.0287	0.0227
Mean	0.0114	0.0154	0.0233	0.0280	0.0207
SD	0.0029	0.0049	0.0020	0.0014	0.0040
%RSD	25.27	31.75	8.66	5.17	19.43

Table 8 Sample extraction performance (% recovery) using extraction solvents ranging from 20% to 100% organic solvent composition.

No.	%Recovery				
	0.1% in 20% ACN	0.1% in 40% ACN	0.1% in 60% ACN	0.1% in 80% ACN	0.1% in 100% ACN
1	25.00	35.60	49.00	52.60	32.20
2	16.20	19.60	49.00	57.80	46.80
3	27.00	37.40	42.00	57.40	45.40
Mean	22.73	30.87	46.67	55.93	41.47
SD	5.75	9.80	4.04	2.89	8.06
%RSD	25.27	31.75	8.66	5.17	19.43

5.4 ผลการศึกษาปริมาณสารละลายที่ใช้ในการสกัดโดยใช้ 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ในการสกัดตัวอย่างที่ 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร พบว่า การสกัดตัวอย่างโดยใช้สารละลาย 30 มิลลิลิตร สามารถสกัดสารออกมาได้ดีกว่าใช้สารละลาย 10 มิลลิลิตร และ 20 มิลลิลิตร ตาม table 9-10

Table 9 Sample extraction performance using different volumes of extraction solvent ranges from 10 to 30 mL.

No.	0.05 mg/L fortified concentration		
	10 mL extraction solvent	20 mL extraction solvent	30 mL extraction solvent
1	0.0281	0.0346	0.0389
2	0.0296	0.0354	0.0383
3	0.0163	0.0365	0.0378
Mean	0.0247	0.0355	0.0384
SD	0.73	0.09	0.06
%RSD	29.45	2.60	1.44

Table 10 Sample extraction performance (% recovery) using different volumes of extraction solvent ranges from 10 to 30 mL.

No.	%Recovery		
	10 mL extraction solvent	20 mL extraction solvent	30 mL extraction solvent
1	56.13	69.27	77.87
2	59.27	70.73	76.60
3	32.67	72.93	75.67
Mean	49.36	70.98	76.71
SD	14.54	1.85	1.10
%RSD	29.45	2.60	1.44

5.5 ผลการศึกษาตัวแปรระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างที่ 20 - 90 นาที (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที) โดยการสกัดรอบเดียว ใช้สารละลาย 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ในการสกัดปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในการสกัดตัวอย่าง ตาม table 11-12

Table 11 Sample extraction efficiency utilizing various extraction intervals ranges from 20 to 90 minutes.

No.	0.05 mg/L fortified concentration							
	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min
1	0.0432	0.0361	0.0531	0.0457	0.0397	0.0474	0.0486	0.0392
2	0.0473	0.0367	0.0501	0.0495	0.0409	0.0419	0.0477	0.0384
3	0.0453	0.0369	0.0507	0.0512	0.0397	0.0444	0.0509	0.0390
Mean	0.0453	0.0366	0.0513	0.0488	0.0401	0.0446	0.0491	0.0389
SD	0.0020	0.0004	0.0016	0.0028	0.0007	0.0028	0.0017	0.0004
%RSD	4.45	1.14	3.05	5.74	1.73	6.26	3.40	1.07

Table 12 Sample extraction efficiency (% recovery) utilizing various extraction intervals ranges from 20 to 90 minutes.

No.	%Recovery							
	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min
1	86.46	72.20	106.17	91.49	79.47	94.86	97.25	78.40
2	94.52	73.47	10.23	98.95	81.87	83.70	95.38	76.87
3	90.68	73.80	101.45	102.47	79.33	88.83	101.86	78.00
Mean	90.55	73.16	72.62	97.64	80.22	89.13	98.16	77.76
SD	4.03	0.84	54.08	5.61	1.43	5.59	3.34	0.80
%RSD	4.45	1.15	74.47	5.74	1.78	6.27	3.40	1.02

5.6 ผลการศึกษาตัวแปรจำนวนรอบในการสกัดตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มาใช้ในการทดสอบ ใช้สารละลาย 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ในการสกัดปริมาตร 30 มิลลิลิตร ตาม table 13

Table 13 Sample extraction efficiency while utilizing various extraction rounds ranges from 1 to 3 cycles (first step).

Sample number	Concentration (mg/kg) (first step)		
	1 cycle	2 cycle	3 cycle
1	83.28	62.87	72.94
2	73.81	81.43	66.57
3	72.01	72.57	74.91
Mean	76.37	72.29	71.47
%Recovery	38.18	36.14	35.73
SD	6.05	9.28	4.36
%RSD	7.92	12.84	6.10

จากการศึกษาจำนวนรอบที่ในการสกัดตาม table 13 พบว่า การสกัดทั้ง 3 รอบให้ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 71.46 – 76.37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสามารถสกัดตัวอย่างออกมาได้ %recovery อยู่ในช่วง 35.73 – 38.18 % จากที่ระบุไว้ในตัวอย่างจริงเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Table 14 The residual analyte concentration following the first step of sample extraction (second step).

Sample number	Concentration (mg/kg) (second step)		
	1 cycle	2 cycle	3 cycle
1	0.177	0.070	0.033
2	0.178	0.067	0.028
3	0.155	0.061	0.038
Mean	0.170	0.066	0.033
SD	0.013	0.005	0.005
%RSD	7.57	7.13	14.66

จากการศึกษาความเข้มข้นของตัวอย่างที่เหลือจากการสกัดในแต่ละรอบตาม table 14 พบว่าการสกัดรอบที่ 1, 2 และ 3 มีตัวอย่างเหลืออยู่เฉลี่ย 0.17, 0.066 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Table 15 Matrix-fortified sample.

No.	Matrix-fortified sample (0.05 mg/kg)	
	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	0.0472	94.35
2	0.0461	92.29
3	0.0540	108.04
Mean	0.0491	98.23
SD	0.0043	8.57
%RSD	8.72	8.72

จาก table 15 พบว่า ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ matrix-fortified sample สามารถสกัดได้ %recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.23 %

6. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา linearity โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve ทดสอบตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า r เท่ากับ 0.9982 ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005) และการศึกษา matrix effect พบว่ามีการเกิดสัญญาณลดของสารที่ทดสอบ (signal suppression) จึงสรุปได้ว่า matrix มีอิทธิพลต่อการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา tiamulin จึงควรใช้วิธี matrix-fortified calibration curve ในการทำงาน

จากผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ในสารละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง เป็น 5 ระดับ ได้แก่ 0.1% formic acid ใน 20% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 40% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 60% acetonitrile, 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile และ 0.1% formic acid ใน 100% acetonitrile พบว่าการใช้สารละลาย 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile สามารถสกัด tiamulin ออกจากตัวอย่างได้ดีที่สุดโดยมีค่า %recovery เฉลี่ยเท่ากับ 55.93%

จากผลการศึกษาปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการสกัดโดยใช้ 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างเป็น 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร พบว่าการสกัดตัวอย่างโดยใช้สารละลาย 30 มิลลิลิตร สามารถสกัด tiamulin ออกจากตัวอย่างได้ดีที่สุดโดยมีค่า %recovery เฉลี่ยเท่ากับ 76.71%

จากผลการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่ 20 - 90 นาที (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที) โดยใช้ 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ปริมาตร 30 มิลลิลิตร พบว่าการสกัดโดยใช้ระยะเวลา 80 นาที สามารถสกัด tiamulin ออกจากตัวอย่างได้ดีที่สุดโดยมีค่า %recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.16% รองลงมาคือที่เวลา 50, 20, 70, 60, 90, 30 และ 40 นาที ตามลำดับ

จากการศึกษาจำนวนรอบในการสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้สารละลาย 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ในการสกัดปริมาตร 30 มิลลิลิตร พบว่าการสกัดทั้ง 3 รอบให้ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 71.46 - 76.37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสามารถสกัดตัวอย่างออกมาได้ %recovery อยู่ในช่วง 35.73 - 38.18 % และทำการตรวจสอบความเข้มข้นของตัวอย่างที่เหลือจากการสกัดในแต่ละรอบ พบว่าการสกัดรอบที่ 1, 2 และ 3 มีตัวอย่างเหลืออยู่เฉลี่ย 0.17, 0.066 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตัวอย่างควบคุมคุณภาพ matrix-fortified sample สามารถสกัดได้ %recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.23 %

จากผลข้างต้นจึงสรุปวิธีการสกัดโดยแปรชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตรสารละลาย ระยะเวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง พบว่าการใช้ 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ระยะเวลา 20 นาที ทำการสกัด 3 รอบ เป็นวิธีการสกัดที่เหมาะสม

ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ได้

7. ข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ระบุผสมยาที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ผลการทดสอบห่างจากที่ระบุไว้ ต่างจากเมื่อทดสอบ matrix-fortified sample จะให้ %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ จึงควรศึกษาความคงตัวของ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาในสภาวะภูมิอากาศภายในประเทศต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2565 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

AOAC 2019. AOAC Guidelines for Standard Method Performance Requirements official Methods for Analysis. 21st Ed. Appendix, AOAC INTERNATIONAL. pp.1 - 17.

Krasucka D., A. Mitura, W. Cybulski, K. Kos and W. Pietron, (2010). Tiamulin hydrogen fumarate – Veterinary uses and HPLC method of determination in premixes and medicated feeding stuffs. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 6(67), p. 682 - 685

Patyra E., C. Nebot, R. Gavilán, A. Cepeda and K. Kwiatek, (2018). Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of tiamulin, trimethoprim, tylosin, sulfadiazine and sulfamethazine in medicated feed. Food additives & contaminants: Part A

ใจพร พุ่มคำ. วารสารอาหารและยา ฉบับเดือนกันยายน-ธันวาคม 2555. [Online], 2021. Available from : <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/article/download/138475/102928> [2021, December]