

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

สุนันท์ กิตติจารวัฒนา ชุศักดิ์ อางสูงเนิน งามงาม บุญบรรลุ ลภัส ขาวจัตุรัส

บทคัดย่อ

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry โดยใช้คอลัมน์ Kinetex C₁₈, 100 x 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.7 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Phenomenex ใช้สารละลายตัวนำพา คือ 50 mM ammonium acetate: acetonitrile (20: 80, v/v) แบบ isocratic elution อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 2 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาในฉีดแต่ละครั้ง 8 นาที ใช้สารมาตรฐาน monensin เป็น internal standard ทดสอบหาปริมาณตัวยาสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ในช่วงความเข้มข้น 20 - 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และการทดสอบตัวอย่างปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) ในช่วงความเข้มข้น 1.0 - 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; *r*) เท่ากับ 0.9990 และ 0.9980 การทดสอบความแม่นยำซึ่งประเมินจากร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 84.87 - 102.33 % และ 90.22 - 100.57 % มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOQ) เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบการกระจายตัวของยาในอาหารไก่พบว่ามีความซ้ำซ้อน (repeatability) อยู่ในช่วง 4.61 - 6.54 %RSD และ intermediate precision เท่ากับ 5.42 %RSD ดังนั้นวิธีนี้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา สามารถตรวจสอบการกระจายตัวของยาเป็นเนื้อเดียวกันและการปนเปื้อนข้ามระหว่างชุดการผลิตได้

คำสำคัญ : salinomycin, monensin, การกระจายตัวของยาเป็นเนื้อเดียวกัน, การปนเปื้อนข้าม,
liquid chromatography-mass spectrometry

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for the determination of salinomycin in medicated feed by liquid chromatography-mass spectrometry

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsoongnearn, Ongart Boonbanlu, Lapad Khaojaturas

Abstract

Salinomycin method validation was performed using liquid chromatography - mass spectrometry, Phenomenex, Kinetex LC column C18, 100 × 2.1 mm, 1.7 µm particle size, with an isocratic elution. Mobile phase composes of 50 mM ammonium acetate: acetonitrile (20: 80, v/v), flow rate 0.2 mL/min, injection volume 2 µL, run time 8 min. Monensin was used as internal standard. The linearity was determined between 20-100 mg/kg for homogeneity and 1.0-5.0 mg/kg for drug carryover. The correlation coefficient (*r*) of 0.9990 and 0.9980 was calculated. The accuracy (% recovery) ranged between 84.87 – 102.33 % and 90.22 – 100.57 % limit of detection (LOD) was 5.0 mg/kg and 0.25 mg/kg. limit of quantitation (LOQ) was 20 mg/kg and 1.0 mg/kg. The repeatability was 4.61 – 6.54 %RSD, intermediate precision was 5.42 %RSD. The validation of this method approved that it is suitable for determining homogeneity and drug carryover of salinomycin in medicated feed.

Keywords: salinomycin, monensin, homogeneity, drug carryover, 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 ตลอดจนถึงการควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่โรงงานผลิตอาหารสัตว์เพื่อการป้องกัน ควบคุมและกำจัดโรคสัตว์ได้ผลดีปราศจากปัญหาจากยาสัตว์ตกค้าง และช่วยชะลอปัญหาการเกิดเชื้อดื้อยาในสัตว์

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

ด้วยเหตุผลดังกล่าวภายใต้แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564 ยุทธศาสตร์ที่ 4 การป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยาและควบคุมกำกับดูแลการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมในภาคการเกษตรและสัตว์เลี้ยง กรมปศุสัตว์ได้มุ่งมั่นดำเนินการเพื่อให้บรรลุเป้าหมายในการลดการใช้ยาต้านปฏิชีวนะลงร้อยละ 30 รวมถึงอาหารสัตว์ที่ผสมยาประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการควบคุมการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยา ซึ่งมีการกำหนดหลักเกณฑ์การควบคุมคุณภาพที่สำคัญคือ ทดสอบการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และ ทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีการกระจายตัวของยาอย่างสม่ำเสมอตามใบสั่งยาของสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์ม สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงไม่เกิดการปนเปื้อนข้ามระหว่างชุดการผลิตต่อมาเกิน ตามที่กฎหมายกำหนด เป็นการลดโอกาสเกิดสารตกค้างรวมถึงการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ซึ่งการตรวจสอบกำหนดให้ใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ homogeneity และ carryover

Salinomycin จัดอยู่ในกลุ่ม polyether ionophore โดยทั่วไปมีอยู่ในรูปของ salinomycin sodium เป็นผงผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ละลายใน acetone, chloroform, benzene, ethyl ether และ methanol แต่ไม่ละลายในน้ำ ใช้สำหรับเติมลงในอาหารสัตว์เพื่อรักษา ควบคุมและยับยั้งโรคบิดในสัตว์ปีก (coccidiosis) โดยเฉพาะโรคบิดในไก่ที่เกิดจากเชื้อ *Eimeria* spp. ที่ทำให้ไก่ป่วยมีลำไส้อักเสบ มุลปนเลือด และตายอย่างเฉียบพลัน ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างมากในอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ กลไกสำคัญในการออกฤทธิ์ของ salinomycin คือความจำเพาะต่อ alkaline ion โดยเฉพาะ potassium ion ซึ่งจะส่งให้เกิด potassium ion efflux จาก mitochondria และ cytoplasm ซึ่งจะไปขัดขวางการใช้ oxygen ของเชื้อ *Eimeria* spp.

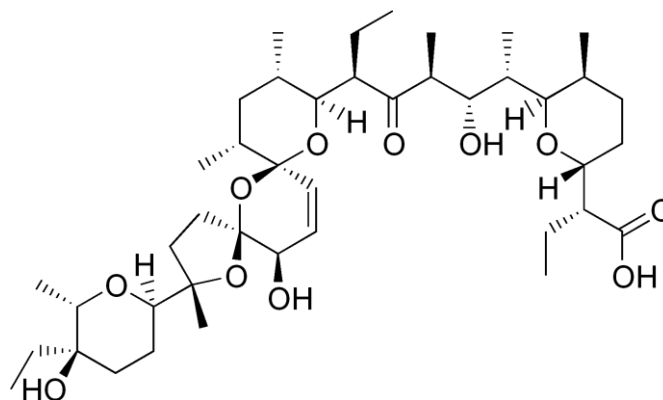


Fig. 1. Structure of salinomycin.

Food and agricultural materials inspection center (FAMIC) ได้ทำการทดสอบ salinomycin ด้วยเครื่อง LC-MS ช่วงความเข้มข้น 0.1 - 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขั้นตอนการสกัด ตัวอย่างใช้ตัวอย่าง 10 กรัม เติม acetonitrile 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำไปกรองให้ได้สารละลาย 25 มิลลิลิตร และนำไป evaporate ให้แห้งภายใต้แก๊ส nitrogen ใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติม hexane: ethyl acetate (9: 1, v/v) นำไปสกัดผ่าน Sep-Pak Plus Silica cartridge และนำไปวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ octadecylsilane silica gel ขนาด 50 × 2 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร mobile phase ใช้ 5 mM ammonium acetate : acetonitrile (1: 4, v/v) อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ทำการวัด salinomycin precursor ion ที่ 769 m/z

Dusi and Gamba (1999) ได้ทำการตรวจหายากลุ่ม polyether antibiotics 4 ชนิด คือ lasalocid, monensin, salinomycin และ narasin ในอาหารสัตว์ปีกโดยใช้ methanol ในการสกัด และทำอนุพันธ์กับ 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ใน acidic medium ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ ODS ขนาด 150 × 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร mobile phase คือ methanol: 1.5 % aqueous acetic acid (90: 10, v/v) ตรวจวัดด้วย UV detection 305/392 นาโนเมตร %recovery อยู่ในช่วง 85 - 100 %, %RSDs อยู่ในช่วง 4 - 10 % ทดสอบที่ช่วงความเข้มข้น 50 - 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Sokolic and Pokorny (1991) ทำการวิเคราะห์ salinomycin โดยใช้ high-performance liquid chromatography แบบ post-column และใช้ vanillin เป็นตัวทำอนุพันธ์ เนื่องจาก salinomycin ไม่มี chromophore เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางจุลชีววิทยาและการวัดสีพบว่า วิธี LC มีความแม่นยำและสามารถตรวจวัดได้ในระดับต่ำถึงความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography - mass spectrometry สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover)

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาช่วงระดับความเข้มข้น 20 - 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และความเข้มข้นในช่วง 1 - 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography - mass spectrometry

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 เครื่องบดตัวอย่างโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของจานหมุนสวนทางกับโบลด์ตัวอย่าง ยี่ห้อ FRITSCH รุ่น PULVERISETTE 6
- 4.1.5 เครื่อง Ultrasonic bath ยี่ห้อ Branson รุ่น B5510E-DTH
- 4.1.6 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ ยี่ห้อ Thermo รุ่น Lab Tower EDI 30
- 4.1.7 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XP205DR
- 4.1.8 เครื่องชั่งน้ำหนักระบบดิจิทัล ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PB1502
- 4.1.9 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ pHcbi รุ่น MPR-1412R-PE
- 4.1.10 ตู้ดูดควัน (fume hood)
- 4.1.11 Beaker ขนาด 5, 50 และ 250 มิลลิลิตร
- 4.1.12 Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 4.1.13 Dispenser ขนาด 0 - 50 มิลลิลิตร
- 4.1.14 Disposable syringe ชนิดไม่มีหัวเข็ม ขนาด 3 มิลลิลิตร
- 4.1.15 Micropipette ขนาด 20 - 200 และ 100 - 1000 ไมโครลิตร
- 4.1.16 Syringe filter, PTFE, 0.45 ไมโครเมตร
- 4.1.17 Vial สีขาว พร้อมฝา ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 4.1.18 Volumetric flask ขนาด 50, 100, 200 และ 1,000 มิลลิลิตร

- 4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์
 - 4.2.1 Acetonitrile, LC grade
 - 4.2.2 Methanol, AR grade
 - 4.2.3 Ammonium acetate, AR grade
 - 4.2.4 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ.cm (น้ำ DI)
 - 4.2.5 สารมาตรฐาน salinomycin ยี่ห้อ Honeywell Fluka
 - 4.2.6 สารมาตรฐาน monensin ยี่ห้อ USP
 - 4.2.7 LC-column ยี่ห้อ Phenomenex, Kinetex 1.7 ไมโครเมตร C18 ขนาด 100 × 2.1 มิลลิเมตร
- 4.3 ตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับเตรียม fortified sample และ sample blank (อาหารไก่เนื้อ อายุ 22-35 วัน)
- 4.4 ขั้นตอนการทดลอง
 - 4.4.1 Condition ของ LC และ m/z ที่ใช้ในการทดสอบ

Table 1 LC condition (adapt FAMIC).

Parameters	Value
Mobile phase:	50 mM ammonium acetate: acetonitrile (20: 80, v/v)
Flow rate:	0.2 mL/min
Column temperature:	40 °C
Sample temperature:	20 °C
Injection volume:	2 µL

Table 2 ESI parameters.

Parameters	Value
Interface	ESI
Interface Voltage	4.0 kV
Nebulizer	30 psi
Drying Gas	6 L/min
Dry Temp	300 °C

Table 3 MS detection.

No.	Compounds	Precursor ions (m/z)	Product ions (m/z)
1	Salinomycin	773.4	755
		773.4	531
2	Monensin	693.4	675

- 4.4.2 การเตรียมสารละลาย methanol: DI water (9: 1, v/v): ตวง methanol, AR grade 900 มิลลิลิตร และตวง DI water 100 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- 4.4.3 Mobile phase
- 4.4.3.1 Mobile phase A: 50 mM ammonium acetate เตรียมโดยการชั่ง ammonium acetate 3.8 กรัม ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์ 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองและ degas ก่อนนำไปใช้งาน
- 4.4.3.2 Mobile phase B: acetonitrile
- 4.4.4 การเตรียมตัวอย่าง sample blank
- 4.4.4.1 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ทำการตรวจสอบแล้วไม่พบ salinomycin
- 4.4.4.2 บดตัวอย่างด้วยเครื่องตัวอย่างครึ่งละประมาณ 50 กรัม จนตัวอย่างละเอียด
- 4.4.5 การเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- 4.4.5.1 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ตรวจไม่พบ salinomycin 100 กรัม บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของจานหมุนสวนทางกับโถบดตัวอย่าง ยี่ห้อ FRITSCH รุ่น PULVERISETTE 6
- 4.4.5.2 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วในข้อ 4.4.5.1 ปริมาณ 180 มิลลิกรัม เเทลงใน mortar
- 4.4.5.3 ชั่งสารมาตรฐาน salinomycin 20 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ค่อยๆ เเทลงไปในข้อ 4.4.5.2 บดผสมใน mortar เป็นเวลา 5 นาที
- 4.4.5.4 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วในข้อ 4.4.5.1 ปริมาณ 1,800 มิลลิกรัม ค่อยๆ เเทลงไปในข้อ 4.4.5.2 บดผสมใน mortar เป็นเวลา 5 นาที
- 4.4.5.5 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วในข้อ 4.4.5.1 ปริมาณ 18,000 มิลลิกรัม
- 4.4.5.6 แบ่งใส่ในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ประมาณ 5 กรัม และนำตัวอย่างที่ผสมแล้วจากข้อ 4.4.5.2 ค่อยๆ เทใส่ในถุงพลาสติกให้หมด รัดถุงพลาสติกให้สนิทโดยให้มีอากาศอยู่ด้านใน ค่อยๆ ผสมตัวอย่างในถุงพลาสติกและหมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที
- 4.4.5.7 การ rinse ตัวอย่างจาก mortar โดยนำตัวอย่างที่บดในข้อ 4.4.5.5 ใส่ลงใน mortar บดผสมเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทใส่ในถุงพลาสติกรวมกับข้อ 4.4.5.6 จากนั้นค่อยๆ ผสมตัวอย่างในถุงพลาสติกและหมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีก 2 รอบโดยใช้ตัวอย่างที่เหลือทั้งหมด

- 4.4.6 การเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- 4.4.6.1 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ตรวจไม่พบ salinomycin 200 กรัม บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของจานหมุนสวนทางกับโอบบดตัวอย่าง ยี่ห้อ FRITSCH รุ่น PULVERISETTE 6
- 4.4.6.2 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วในข้อ 4.4.6.1 ปริมาณ 5 กรัม เกลงใน mortar
- 4.4.6.3 ชั่งตัวอย่าง trituration ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณ 2.5 กรัม ค่อยๆ เกลงไปในข้อ 4.4.6.2 บดผสมใน mortar เป็นเวลา 5 นาที
- 4.4.6.4 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วในข้อ 4.4.6.1 ปริมาณ 10 กรัม เกลงไปในข้อ 4.4.8.2 บดผสมใน mortar เป็นเวลา 5 นาที
- 4.4.6.5 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วในข้อ 4.4.6.1 ปริมาณ 82.5 กรัม
- 4.4.6.6 แบ่งใส่ในถุงพลาสติกประมาณ 20 กรัม และนำตัวอย่างที่ผสมแล้วจากข้อ 4.4.6.2 มาค่อยๆ เทใส่ในถุงพลาสติกให้หมด รัดถุงพลาสติกให้สนิทโดยให้มีอากาศอยู่ด้านใน ค่อยๆ ผสมตัวอย่างในถุงพลาสติกและหมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที
- 4.4.6.7 การ rinse ตัวอย่างจาก mortar โดยนำตัวอย่างที่บดในข้อ 4.4.6.5 ใส่ลงใน mortar บดผสมเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทใส่ในถุงพลาสติกรวมกับข้อ 4.4.6.6 จากนั้นค่อยๆ ผสมตัวอย่างในถุงพลาสติกและหมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีก 2 รอบโดยใช้ตัวอย่างที่เหลือทั้งหมด

4.4.7 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

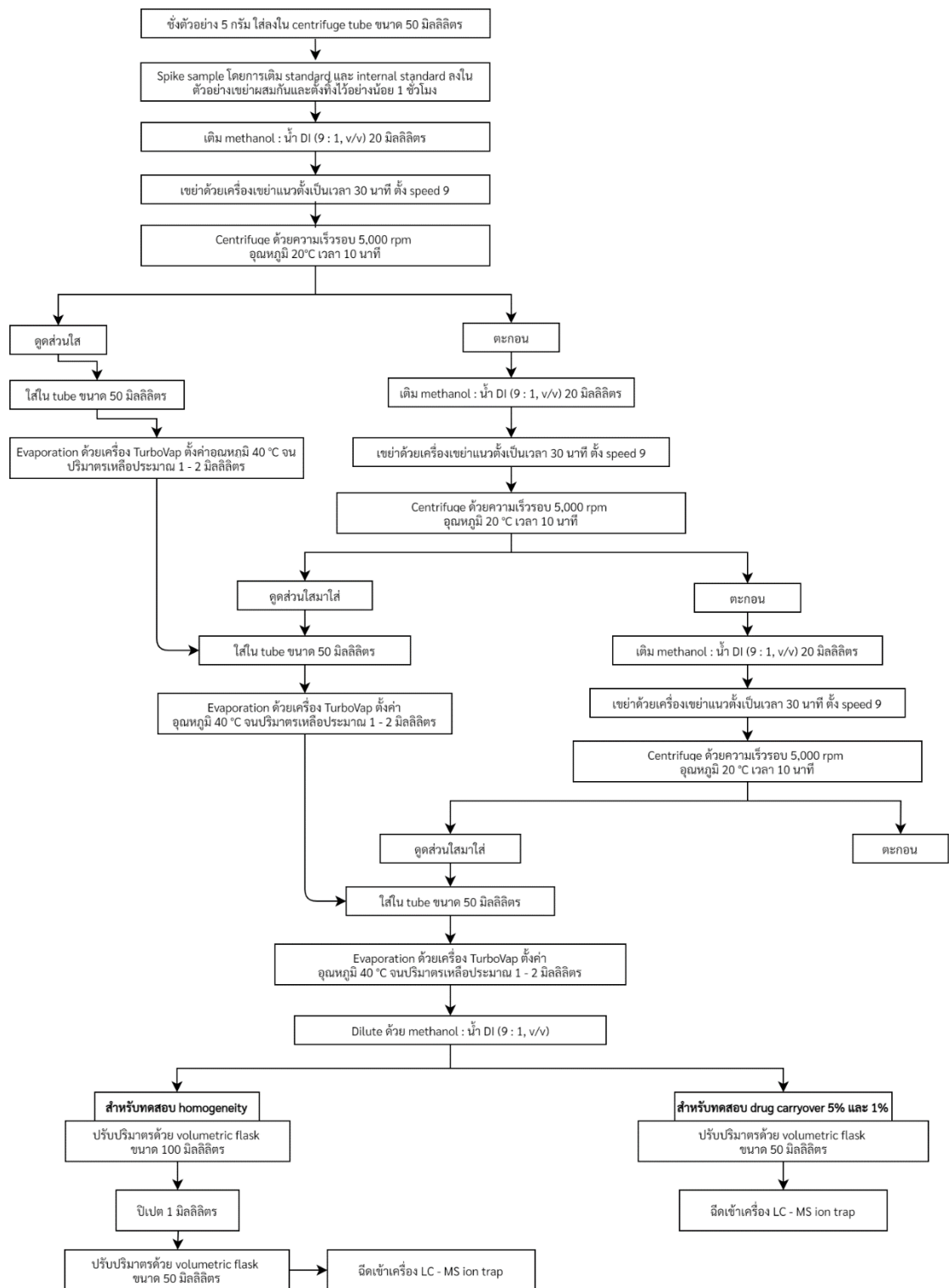


Fig. 2. Sample preparation.

4.4.8 ขั้นตอนการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี (method validation)

4.4.8.1 ศึกษาช่วงของการทดสอบ (working range) โดยเตรียม matrix-fortified calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 - 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวม sample blank (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับทดสอบปริมาณด้วยวิธีสำคัญ homogeneity และให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5 - 6.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวม sample blank (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับทดสอบ drug carryover เตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ๆ ละ 3 injection นำค่า ion ratio ของพื้นที่ใต้พีค ระหว่าง analyte/internal standard และความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) ตาม table 4 เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005)

Table 4 The preparation of matrix-fortified calibration curve standards for testing the working range in the study of homogeneity and drug carryover.

Level	Homogeneity				Drug carryover			
	Sample blank (g)	1,000 mg/L salinomycin addition (μL)	Concentration (mg/kg)	200 mg/L monensin addition (μL)	Sample blank (g)	1,000 mg/L salinomycin addition (μL)	Concentration (mg/kg)	200 mg/L monensin addition (μL)
1	5	-	-	500	5	-	-	50
2	5	50	10	500	5	100	0.5	50
3	5	100	20	500	5	200	1.0	50
4	5	200	40	500	5	400	2.0	50
5	5	300	60	500	5	600	3.0	50
6	5	400	80	500	5	800	4.0	50
7	5	500	100	500	5	1000	5.0	50
8	5	600	120	500	5	1200	6.0	50

4.4.8.2 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 - 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวม sample blank (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับทดสอบปริมาณด้วยวิธีสำคัญ homogeneity และให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 - 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวม sample blank (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับทดสอบ drug carryover เตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ และฉีด 3 injection และทำการทดสอบ 3 วัน นำค่า ion ratio ของพื้นที่ใต้พีค ระหว่าง analyte/internal standard และความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) ตาม table 5 เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005)

Table 5 The preparation of matrix-fortified calibration curve standards for testing the linearity in the study of homogeneity and drug carryover.

Level	Homogeneity				Drug carryover			
	Sample blank (g)	1,000 mg/L salinomycin addition (μL)	Concentration (mg/kg)	200 mg/L monensin addition (μL)	Sample blank (g)	1,000 mg/L salinomycin addition (μL)	Concentration (mg/kg)	200 mg/L monensin addition (μL)
1	5	-	-	500	5	-	-	50
2	5	100	20	500	5	200	1.0	50
3	5	200	40	500	5	400	2.0	50
4	5	300	60	500	5	600	3.0	50
5	5	400	80	500	5	800	4.0	50
6	5	500	100	500	5	1000	5.0	50

4.4.8.3 ศึกษา matrix effect ของการทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และ drug carryover โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve ตามข้อ 4.4.8.2 และเตรียม standard solution calibration curve ให้มีความเข้มข้นเดียวกันกับข้อ 4.4.8.2 จากนั้น คำนวณหา matrix effect โดยใช้สูตร

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

4.4.8.4 ศึกษา accuracy โดยการเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และความเข้มข้น 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover โดยเตรียมความเข้มข้นละ 10 ขั้ว ฉีดซ้ำละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เหน็จการยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 80 - 110 (AOAC, 2019)

4.4.8.5 การเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ที่ความเข้มข้น 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Fig. 3.)



Fig. 3. The preparation of matrix-fortified sample for testing of homogeneity.

4.4.8.6 เตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration สำหรับทดสอบ drug carryover ที่ความเข้มข้น 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Fig. 4.)



Fig. 4. The preparation of matrix-fortified sample for testing of drug carryover.

- 4.4.8.7 ศึกษา precision โดยการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ $\%RSD \leq 8.6$ (AOAC, 2019)
- 4.4.8.8 ศึกษา limit of detection (LOD) โดยเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำตาม Fig. 5. เกณฑ์การทดสอบ signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 (FDA, 2005)

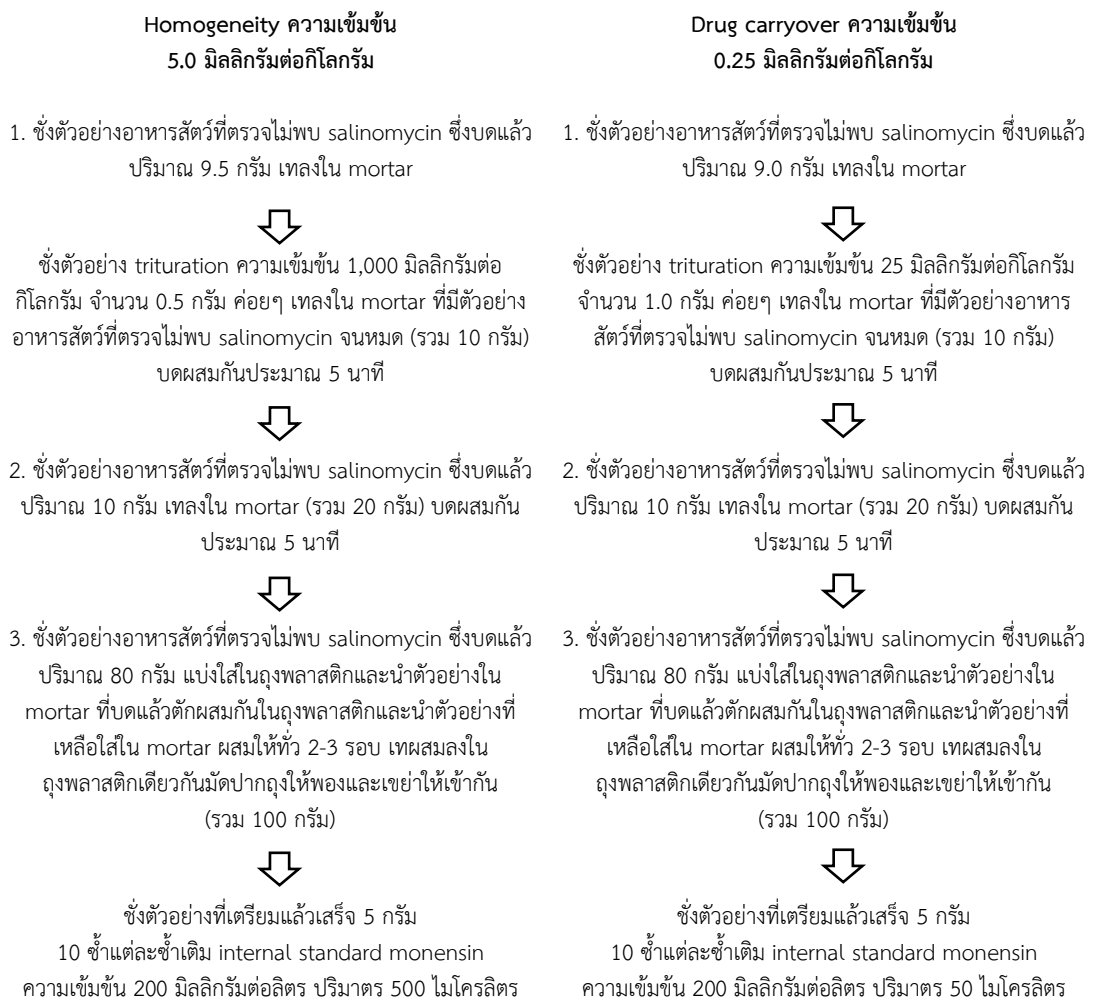


Fig. 5. The preparation of LOD testing samples for homogeneity and drug carryover study.

4.4.8.9 ศึกษา limit of quantitation (LOQ) โดยเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ homogeneity และ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ตาม Fig. 6. เกณฑ์ การทดสอบ signal to noise ratio (S/N) ≥ 10 (FDA, 2005)

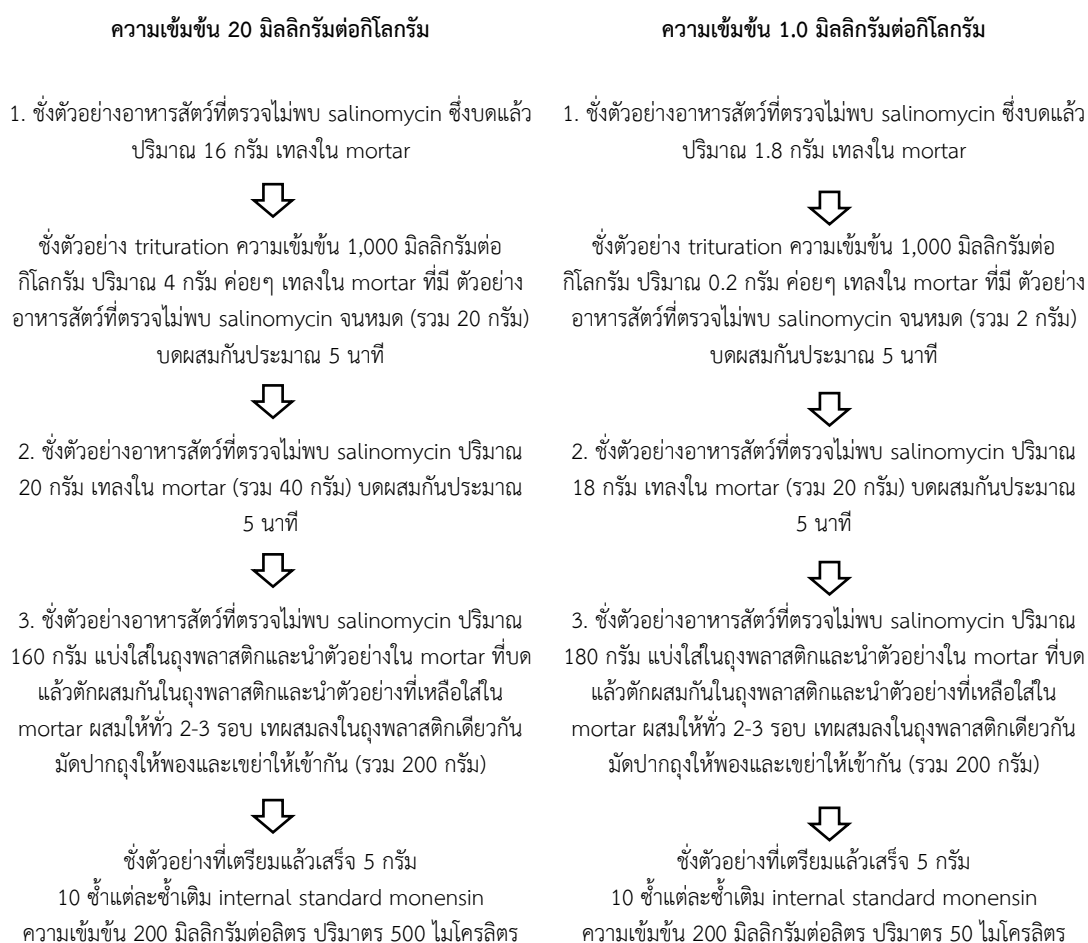


Fig. 6. The preparation of LOQ testing samples for homogeneity and drug carryover study.

- 4.4.8.10 ศึกษาการสกัดตัวอย่างโดย ขั้นตอนที่ 1 ใช้ 3 ตัวอย่างซึ่งสกัดตาม ข้อ 4.4.9 ทำการสกัด 1, 2 และ 3 รอบ ตามลำดับ ก่อนปรับปริมาตร และนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC- MS ion trap ขั้นตอนที่ 2 นำกากส่วนที่เหลือจากการสกัดในขั้นตอนที่ 1 ของทั้ง 3 ตัวอย่างมาทำการสกัดอีกครั้ง รอบด้วย 20 มิลลิลิตร ของ 90% methanol โดยการเขย่าแนวตั้งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองส่วนใสไปฉีดโดยไม่ ต้องทำการเจือจางเพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของสารที่ยังเหลืออยู่ ภายหลังการสกัด
- 4.4.8.11 การศึกษาความจำเพาะ/ความสามารถในการแยกสาร (specificity/selectivity) โดยการเตรียมสารที่คาดว่าจะก่อสัญญาณรบกวนได้แก่ narasin และ lasalocid เติมลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ ตรวจไม่พบ salinomycin ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ
- 4.4.8.12 การศึกษา robustness
- 4.4.8.12.1 การศึกษาแปรระดับระยะเวลาในการสกัดตัวอย่างเป็น 20, 30 และ 40 นาที ทำการทดสอบตัวอย่างความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ
- 4.4.8.12.2 การศึกษาแปรระดับความเข้มข้นของ buffer ที่ใช้ใน mobile phase เป็น 7 ระดับ (รวมน้ำ DI) ได้แก่ 5 mM ammonium acetate, 10 mM ammonium acetate, 20 mM ammonium acetate, 30 mM ammonium acetate, 40 mM ammonium acetate, 50 mM ammonium acetate และน้ำ DI โดยทดสอบตัวอย่าง ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ
- 4.4.8.12.3 การศึกษาแปรระดับ pH ของ buffer 50 mM ammonium acetate เป็น 3 ระดับ ได้แก่ pH 3.0, 5.0 และ 7.0 โดยทดสอบตัวอย่างความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

5. ผลการทดลอง

- 5.1 ผลการศึกษา working range โดยเตรียม matrix-fortified calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 - 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณด้วยาสาคัญ homogeneity และความเข้มข้น 0 - 6.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover ตาม table 6 และ Fig. 7 – 8

Table 6 Working range of salinomycin.

Parameters	Homogeneity	Drug carryover
Slope	0.205185	0.367434
Intercept	-0.011786	-0.006104
r	0.9997	0.9993
r^2	0.9994	0.9986

จากผลการศึกษา working range ตาม table 6 พบว่า การทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และ drug carryover มีค่า r เท่ากับ 0.9997 และ 0.9993 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า salinomycin มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงดังกล่าว

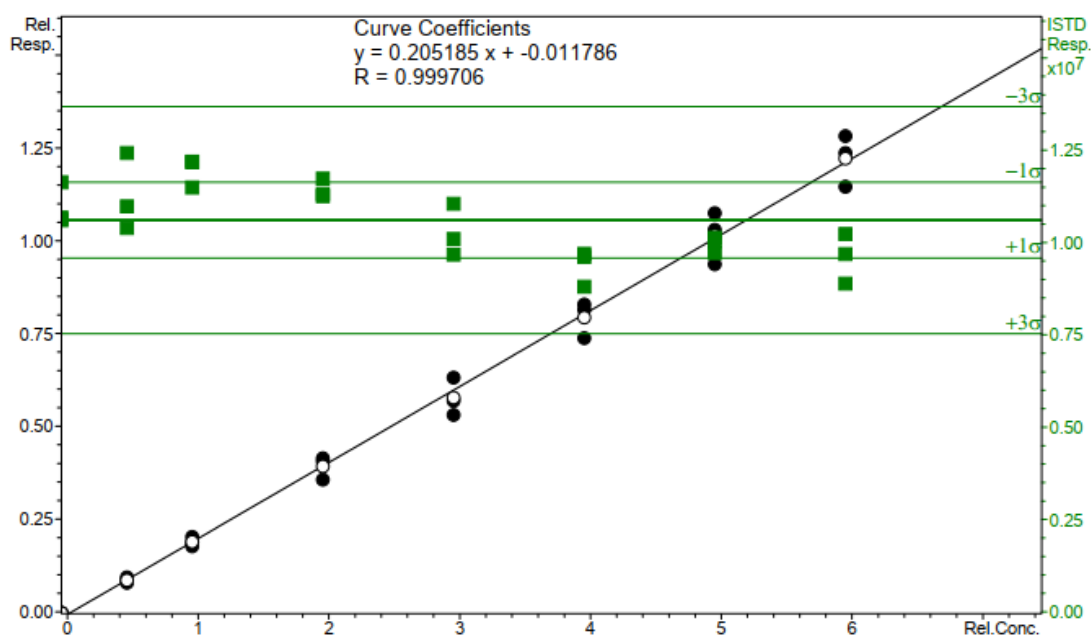


Fig. 7. Working range of matrix-fortified calibration curve of salinomycin (homogeneity).

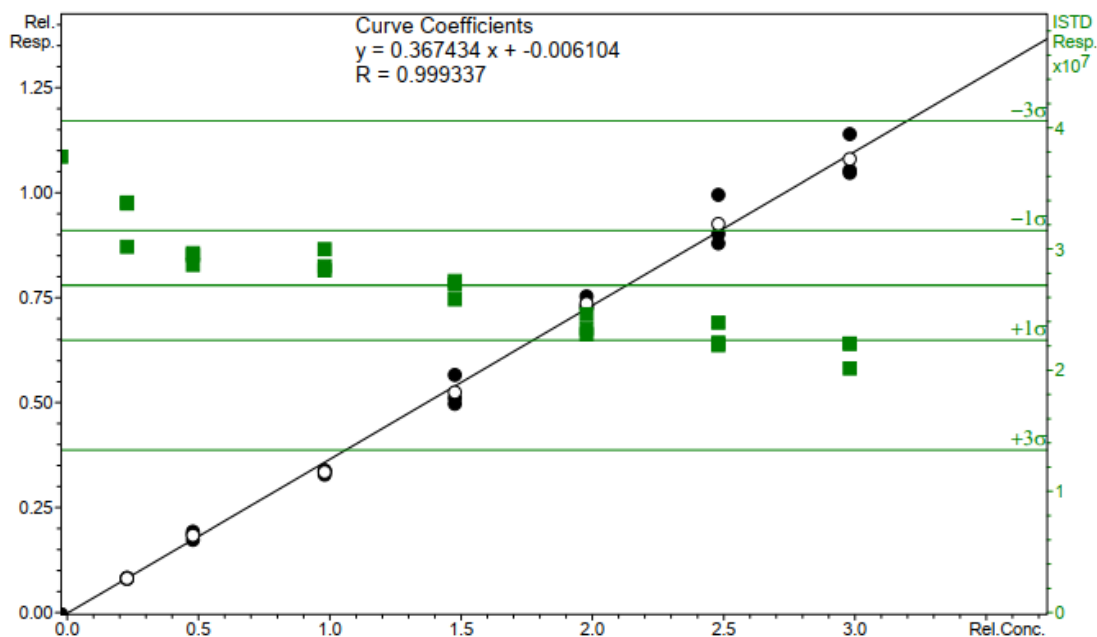


Fig. 8. Working range of matrix-fortified calibration curve of salinomycin (drug carryover).

5.2 ผลการศึกษา linearity โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 - 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 - 5.0 มิลลิกรัมต่อ สำหรับทดสอบ drug carryover ตาม table 7 และ Fig. 9 - 10

Table 7 Linearity of salinomycin.

Parameters	Homogeneity	Drug carryover
Slope	0.204163	0.350793
Intercept	-0.013816	-0.005468
r	0.9990	0.9980
r^2	0.9980	0.9960

จากผลการศึกษา linearity ตาม table 7 พบว่า การทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และ drug carryover มีค่า r เท่ากับ 0.9990 และ 0.9980 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า salinomycin มี linearity ในช่วงดังกล่าว

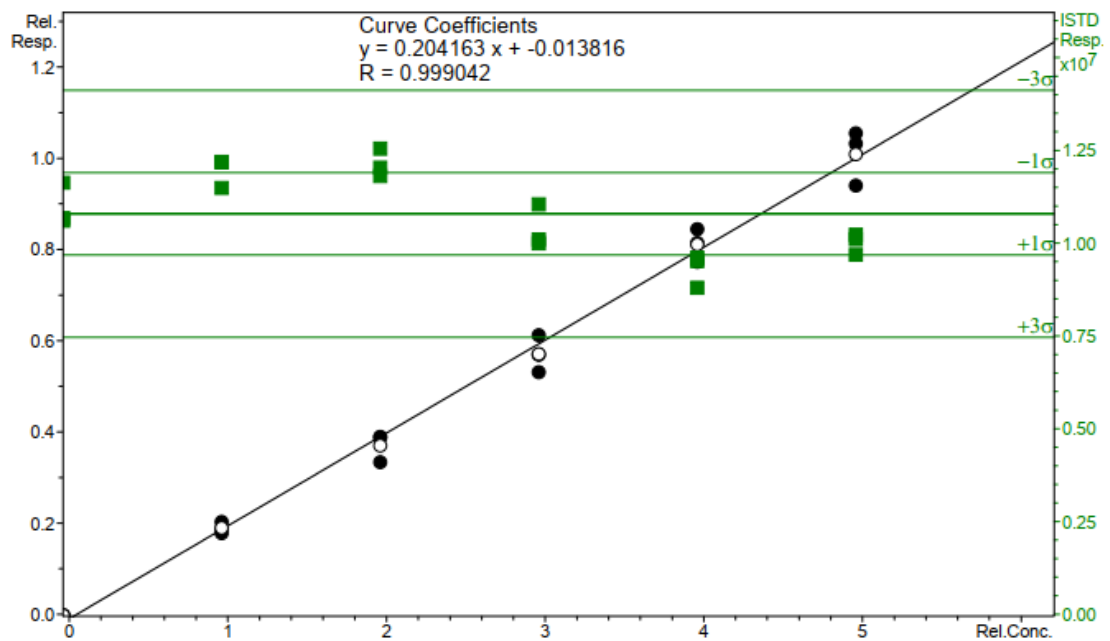


Fig. 9. Matrix-fortified calibration curve of salinomycin (homogeneity).

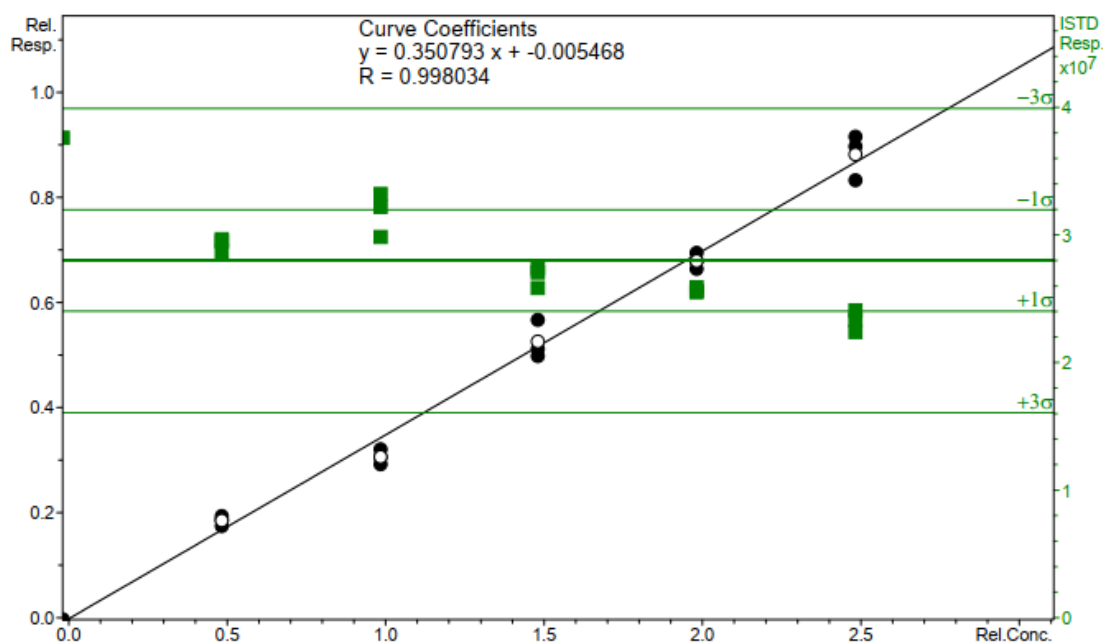


Fig. 10. Matrix-fortified calibration curve of salinomycin (drug carryover).

5.3 ผลการศึกษา matrix effect ของการทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และ drug carryover ตาม table 8 - 9

Table 8 Matrix-fortified calibration curve and standard solution calibration curve in the studies of homogeneity and drug carryover.

Parameters	Matrix-fortified calibration curve		Standard solution calibration curve	
	Homogeneity	Drug carryover	Homogeneity	Drug carryover
Slope	0.204163	0.350793	0.17668	0.440034
Intercept	-0.011786	-0.006104	-0.000685	0.014461
<i>r</i>	0.9997	0.9993	0.9998	0.9984
<i>r</i> ²	0.9994	0.9986	0.9996	0.9968

Table 9 Matrix effect in the studies of homogeneity and drug carryover.

Homogeneity	Drug carryover
115.5	97.7

ผลการศึกษา matrix effect จากการเปรียบเทียบ slope ของ matrix-fortified calibration curve เทียบกับ standard calibration solution ตาม table 9 พบว่า การทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity มีการเกิดสัญญาณเพิ่มของสารที่ทดสอบ (signal enhancement) การทดสอบ drug carryover มีการเกิดสัญญาณลดของสารที่ทดสอบ (signal suppression) ดังนั้น matrix อาจมีอิทธิพลต่อการทดสอบปริมาณตัวยาเมื่อทดสอบแบบ homogeneity และ drug carryover จึงควรใช้ matrix-fortified calibration curve ในการทำงาน

- 5.4 ผลการศึกษา accuracy โดยการเตรียม fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และความเข้มข้น 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ carryover ให้ผลตาม table 10 -11

Table 10 Accuracy of salinomycin LC analysis (homogeneity).

No.	Day 1			Day 2			Day 3		
	40	60	80	40	60	80	40	60	80
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
1	32.99	53.06	81.85	33.92	55.57	82.75	40.11	62.55	73.12
2	36.64	50.75	74.62	36.55	62.53	80.26	34.24	55.47	83.26
3	36.98	51.82	74.63	40.50	60.93	85.02	33.88	59.88	79.93
4	38.75	49.51	76.18	39.65	62.03	80.81	32.99	60.65	77.73
5	36.53	50.62	77.05	38.01	60.19	79.71	37.18	66.04	76.96
6	38.27	52.37	78.73	40.23	62.79	83.00	36.16	61.44	67.11
7	36.73	48.34	70.12	36.04	61.98	81.50	38.18	60.15	74.56
8	33.14	56.39	85.66	35.84	60.28	84.44	37.47	60.40	80.35
9	37.58	50.32	76.65	41.15	61.61	83.78	35.66	62.03	74.23
10	34.82	54.98	73.60	40.23	64.27	82.40	40.95	60.09	76.56
Mean	36.70	50.92	76.17	37.84	60.86	81.86	36.11	60.88	76.10
SD	1.85	1.65	3.67	2.46	2.50	1.85	2.57	3.18	5.19
%RSD	5.04	3.23	4.82	6.51	4.11	2.26	7.12	5.22	6.81
%Recovery	91.75	84.87	95.21	94.61	101.43	102.33	90.27	101.47	95.12

Table 11 Accuracy of salinomycin LC analysis (drug carryover).

No.	Day 1			Day 2			Day 3		
	2.0	3.0	4.0	2.0	3.0	4.0	2.0	3.0	4.0
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
1	2.05	3.03	3.70	1.96	2.97	3.86	1.82	2.76	3.53
2	2.05	3.17	3.78	1.88	2.87	3.83	1.64	2.46	4.06
3	1.77	3.06	3.90	1.98	2.90	3.82	1.91	2.91	4.13
4	2.05	2.95	3.94	1.95	3.07	3.95	1.86	2.51	4.01
5	1.84	3.02	3.99	1.95	2.86	3.97	1.82	2.83	3.91
6	1.67	2.90	3.53	1.81	2.99	3.67	1.90	2.92	3.94
7	2.07	2.99	3.78	1.82	2.91	3.78	1.75	2.56	4.08
8	1.92	3.08	3.44	1.96	2.90	3.85	1.89	2.50	4.01
9	1.99	3.13	3.88	2.04	2.89	3.66	1.65	2.40	4.11
10	1.92	2.85	3.76	1.82	3.05	3.81	1.94	2.51	4.05
Mean	1.93	3.02	3.80	1.91	2.94	3.84	1.81	2.71	3.95
SD	0.16	0.08	0.16	0.07	0.08	0.10	0.09	0.20	0.20
%RSD	8.52	2.77	4.11	3.55	2.60	2.61	5.08	7.21	5.07
%Recovery	96.33	100.57	95.06	95.37	97.92	96.03	90.72	90.22	98.76

จาก table 10 - 11 พบว่า % recovery ของ salinomycin สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และทดสอบ drug carryover มีค่าเท่ากับ 84.78 – 102.33 % และ 90.22 - 100.57 % และ repeatability อยู่ระหว่าง 2.26 – 7.12 %RSD และ 2.60 – 8.52 %RSD ตามลำดับ

5.5 ผลการศึกษา precision โดยการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ 3 วัน (table 12)

Table 12 Precision of sample LC analysis (homogeneity).

No.	Concentration 60 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	54.14	53.19	57.36
2	58.59	56.56	54.50
3	57.50	52.33	50.55
4	50.76	55.48	57.87
5	51.27	45.18	50.25
6	52.12	50.83	53.42
7	54.30	57.39	52.65
8	50.49	52.77	54.91
9	51.54	55.19	53.57
10	51.09	53.13	54.15
Mean	53.18	53.21	53.92
SD	2.89	3.48	2.49
%RSD _r	5.43	6.54	4.61
%RSD _R		5.42	

หมายเหตุ เมื่อ %RSD_r คือ repeatability และ %RSD_R คือ intermediate precision

จาก table 12 พบว่า repeatability ของการทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity อยู่ระหว่าง 4.61 - 6.54 %RSD และ reproducibility จากการทดสอบตัวอย่าง 3 วัน เท่ากับ 5.42 %RSD

5.6 ผลการศึกษา LOD ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาสำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และทดสอบ drug carryover ตาม table 13 พบว่าสามารถตรวจพบ salinomycin ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Table 13 LOD in the studies of homogeneity and drug carryover.

No.	Homogeneity		Drug carryover	
	5 mg/kg	S/N	0.25 mg/kg	S/N
1	detected	107.33	detected	501.33
2	detected	127.00	detected	365.00
3	detected	113.33	detected	869.00
4	detected	104.00	detected	624.67
5	detected	115.33	detected	482.33
6	detected	86.33	detected	415.00
7	detected	91.00	detected	357.67
8	detected	104.00	detected	559.00
9	detected	109.00	detected	323.33
10	detected	109.33	detected	408.00
Mean	-	106.67	-	490.53
SD	-	11.64	-	163.29
%RSD	-	10.91	-	33.29

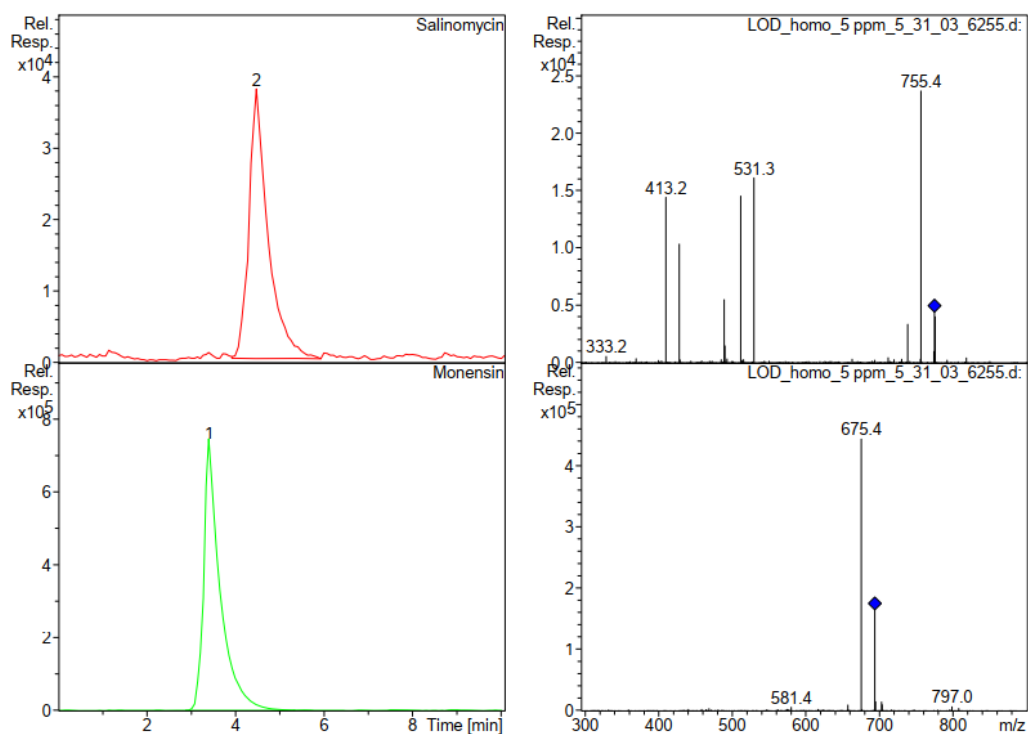


Fig. 11. Chromatogram of salinomycin at LOD in the studies of homogeneity.

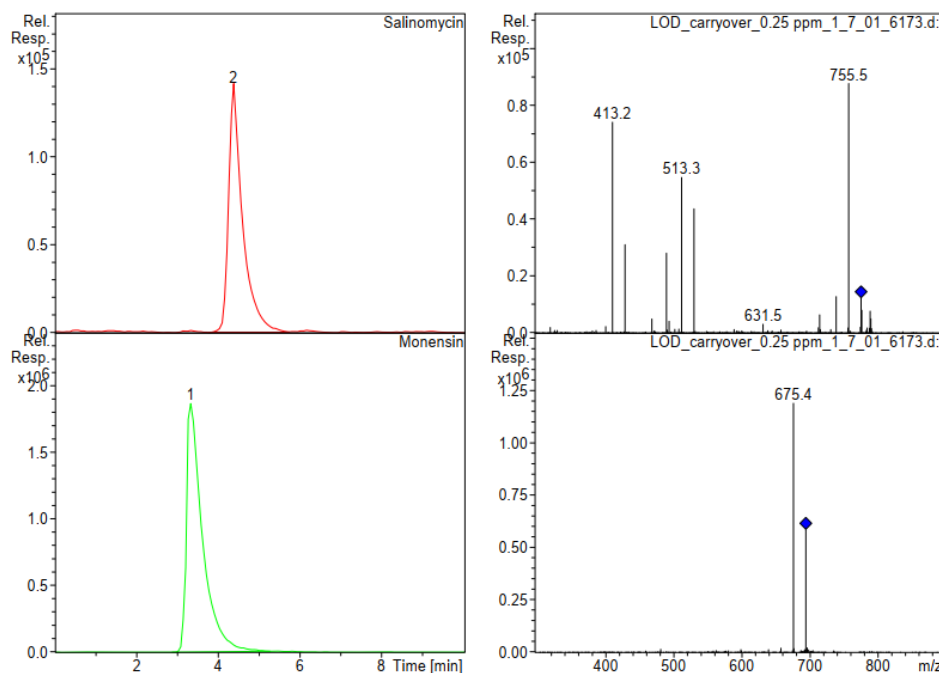


Fig. 12. Chromatogram of salinomycin at LOD in the studies of drug carryover.

5.7 ผลการศึกษา LOQ ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาสำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และทดสอบ drug carryover ตาม table 14 พบว่า ได้ความเข้มข้นเฉลี่ย เท่ากับ 20.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า S/N เฉลี่ย เท่ากับ 259.90 และ 335.30 ตามลำดับ

Table 14 LOQ in the studies of homogeneity and drug carryover.

No.	Homogeneity		Drug carryover	
	20 mg/kg	S/N	1.0 mg/kg	S/N
1	22.05	309	1.17	383
2	20.46	283	1.06	499
3	19.53	183	0.99	440
4	20.46	223	0.92	369
5	22.99	259	1.10	423
6	21.92	296	1.12	344
7	17.59	282	1.17	264
8	19.1	251	1.14	210
9	17.55	311	1.06	117
10	19.1	202	1.09	304
Mean	20.08	259.90	1.08	335.30
SD	1.93	42.32	0.09	121.07
%RSD	9.61	16.28	7.90	36.11

5.8 ผลการศึกษาการสกัดตัวอย่างโดย ขั้นตอนที่ 1 ใช้ 3 ตัวอย่างซึ่งสกัดตามข้อ 4.4.7 ทำการสกัด 1, 2 และ 3 รอบ ตามลำดับ ก่อนปรับปริมาตรและนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC- MS ion trap ขั้นตอนที่ 2 นำกากส่วนที่เหลือจากการสกัดในขั้นตอนที่ 1 ของทั้ง 3 ตัวอย่างมาทำการสกัดอีกรอบด้วย 20 มิลลิลิตร ของ 90% methanol โดยการเขย่าแนวตั้งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองส่วนใสไปฉีดโดยไม่ต้องทำการเจือจางเพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของสารที่ยังเหลืออยู่ภายหลังการสกัด (table 15)

Table 15 Sample extraction efficiency while utilizing various extraction rounds ranges from 1 to 3 cycles (first step).

Sample number	Sample 60 mg/kg (first step)		
	1 cycle	2 cycle	3 cycle
1	46.37	51.12	56.13
2	47.53	54.28	64.73
3	51.83	48.83	57.61
Mean	48.58	51.41	59.49
%Recovery	80.96	85.68	99.15
SD	2.88	2.74	4.60
%RSD	5.93	5.32	7.73

จากการศึกษาจำนวนรอบที่ในการสกัดตาม table 15 พบว่า การสกัด 3 รอบให้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 99.15 % ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของสารที่เหลืออยู่เพียง 0.74 % (table 16)

Table 16 The sample residual percentage following the first step of sample extraction (second step).

Sample number	Sample residual percentage (second step)		
	1 cycle	2 cycle	3 cycle
1	4.81	1.81	0.73
2	4.57	1.80	0.72
3	4.21	1.83	0.76
Mean	4.53	1.81	0.74
SD	0.30	0.01	0.02
%RSD	6.64	0.79	2.56

5.9 ผลการศึกษา specificity/selectivity โดยการเติมสาร narasin และ lasalocid ลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ตรวจไม่พบ salinomycin พบว่าที่ retention time (3.6 นาที) ไม่พบการรบกวนของสารดังกล่าว (Fig. 13.) แสดงถึงควมมี specificity ของวิธี

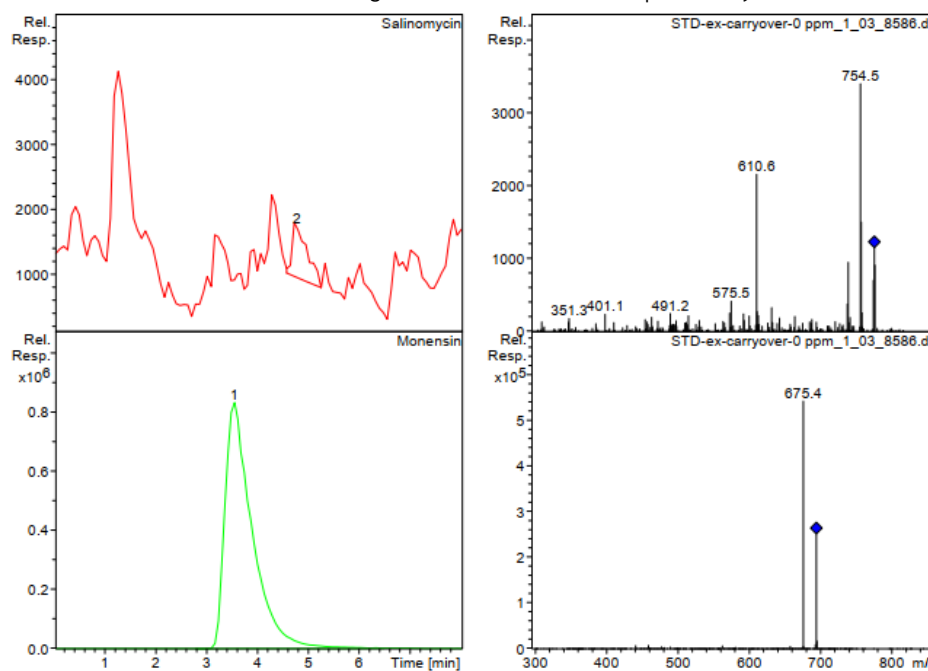


Fig. 13. Chromatogram of the sample after narasin and lasalocid addition.

5.10 ผลการศึกษาแปรรยะเวลาในการสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น 20, 30 และ 40 นาที ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 59.88, 62.64 และ 59.51 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ตาม table 17 ซึ่ง 3 วิธีมีประสิทธิภาพในการสกัดเท่ากัน แสดงถึงควม robustness ของวิธี

Table 17 The results of samples extraction using different extraction intervals range from 20, 30, and 40 minutes.

No.	Concentration (mg/kg)		
	20 min	30 min	40 min
1	59.63	62.03	61.21
2	62.35	61.61	56.60
3	60.06	59.61	62.32
4	59.19	61.14	62.23
5	59.96	67.46	55.64
6	58.11	64.01	59.08
Mean	59.88	62.64	59.51
SD	1.40	2.76	2.89
%RSD	2.34	4.40	4.86

5.11 ผลการศึกษาแปรระดับความเข้มข้นของ buffer เป็น 7 ระดับ รวมน้ำ DI ได้แก่ 5 mM ammonium acetate, 10 mM ammonium acetate, 20 mM ammonium acetate, 30 mM ammonium acetate, 40 mM ammonium acetate, 50 mM ammonium acetate และน้ำ DI โดยทดสอบตัวอย่างความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (table 18)

Table 18 The effects of mobile phase buffer concentration on LC separation parameters.

Buffer	Parameters	Salinomycin	Monensin
Water	RT (min)	3.3	3.9
	Capacity factor	2.3	2.9
	S/N	2079.7	3668.4
5 mM ammonium acetate	RT (min)	3.6	3.5
	Capacity factor	2.6	2.5
	S/N	4911.5	16438.3
10 mM ammonium acetate	RT (min)	3.8	3.4
	Capacity factor	2.8	2.4
	S/N	557.5	1059.9
20 mM ammonium acetate	RT (min)	4.0	3.4
	Capacity factor	3	2.4
	S/N	623.3	1121.5
30 mM ammonium acetate	RT (min)	4.1	3.4
	Capacity factor	3.1	2.4
	S/N	1399.6	500233.3
40 mM ammonium acetate	RT (min)	4.1	3.3
	Capacity factor	3.1	2.3
	S/N	11868.7	139111.9
50 mM ammonium acetate	RT (min)	4.3	3.3
	Capacity factor	3.3	2.3
	S/N	15806.9	340537.2

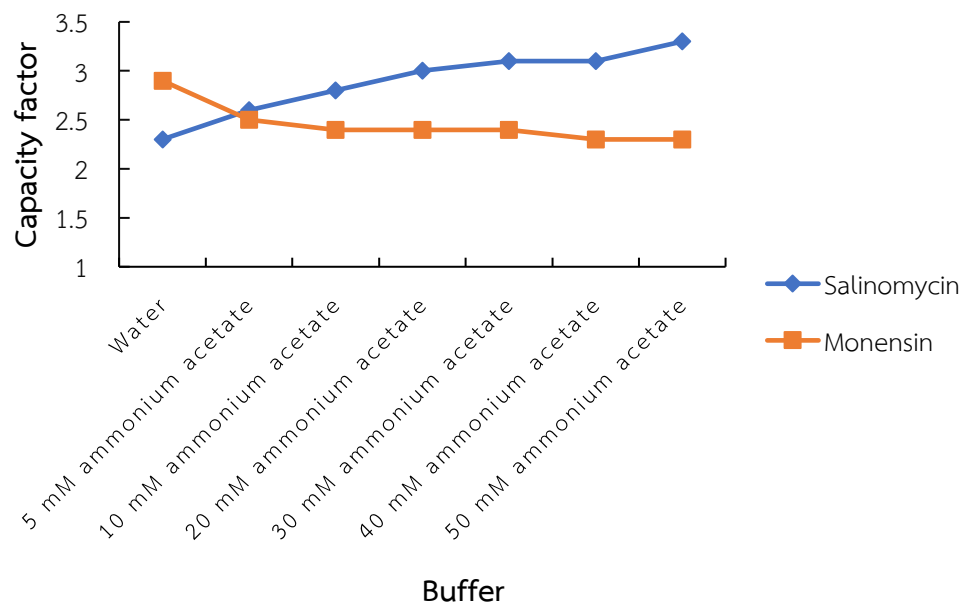


Fig. 14. Relationship between the concentration of the mobile phase buffer and the capacity factor.

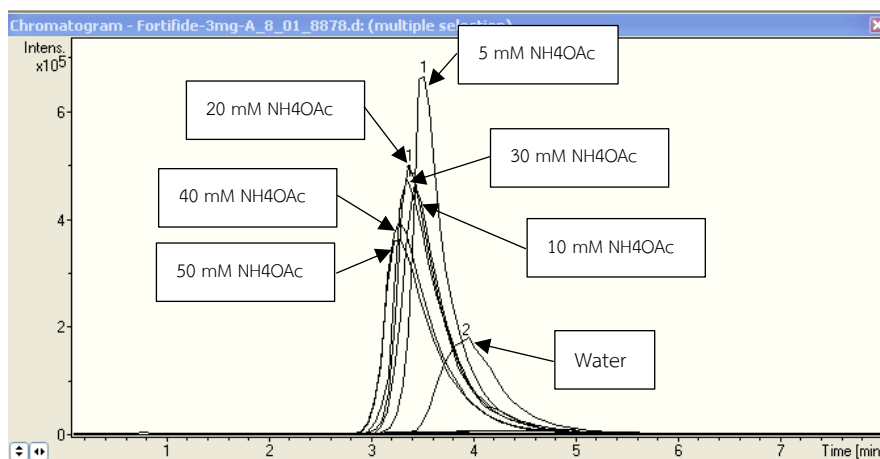


Fig. 15. Monensin chromatogram at various mobile phase buffer concentrations.

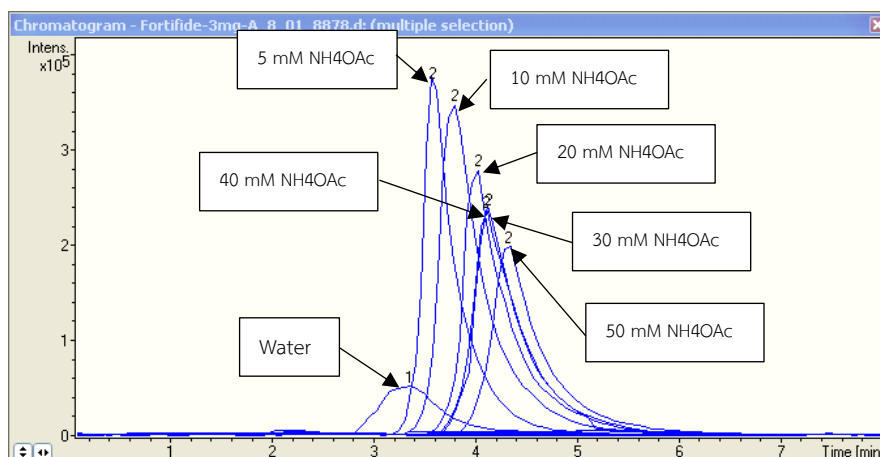


Fig. 16. Salinomycin chromatogram at various mobile phase buffer concentrations.

5.12 ผลการศึกษาแปรระดับ pH ของ buffer 50 mM ammonium acetate เป็น 3 ระดับ ได้แก่ 3.0, 5.0 และ pH 7.0 โดยทดสอบตัวอย่างความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (table 19)

Table 19 The effects of mobile phase pH on LC separation parameters.

Compounds	pH 3.0			pH 5.0			pH 7.0		
	RT (min)	Capacity factor	S/N	RT (min)	Capacity factor	S/N	RT (min)	Capacity factor	S/N
Salinomycin	5.3	4.3	293.6	4.6	3.6	478.7	4.5	3.5	277.4
Monensin	5.0	4.0	1010.5	3.8	2.8	912.2	3.4	2.4	706.2

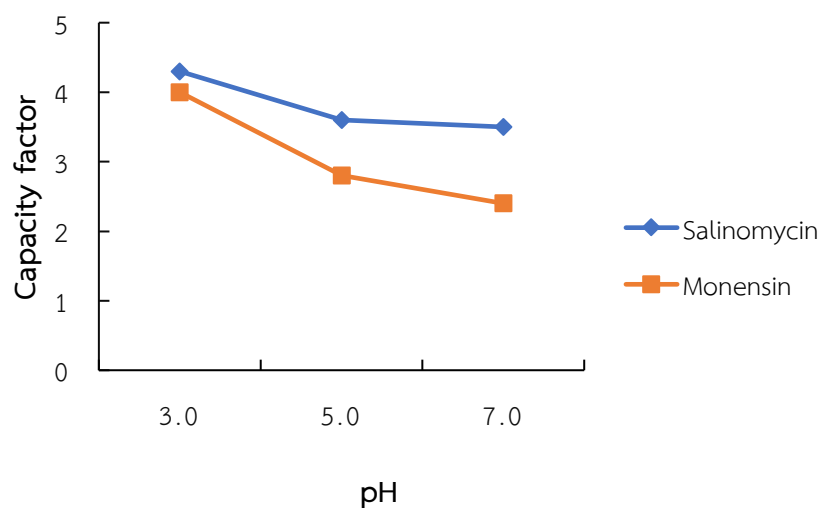


Fig. 17. Relationship between the pH of the mobile phase buffer and the capacity factor.

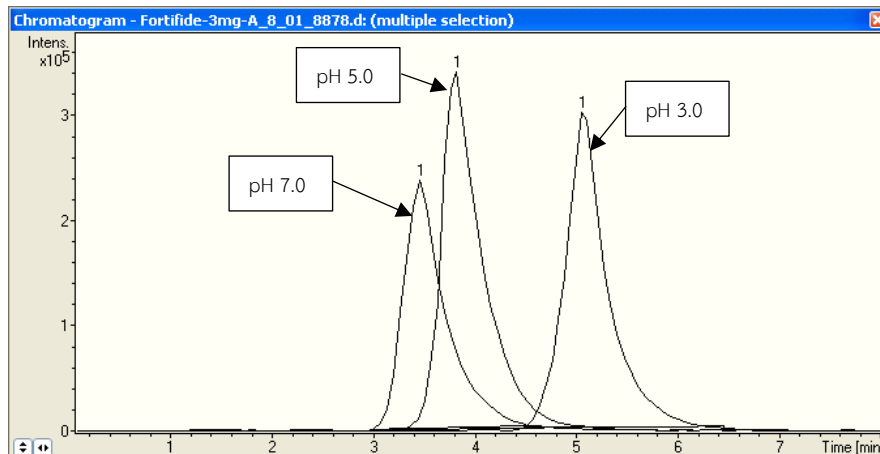


Fig. 18. Monensin chromatogram at various mobile phase buffer pH.

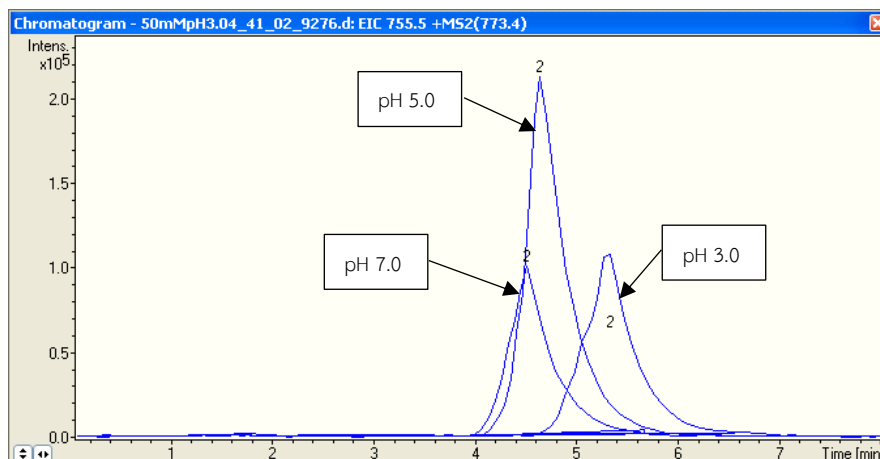


Fig. 19. Salinomycin chromatogram at various mobile phase buffer pH.

6. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของการหาปริมาณ salinomycin ในอาหารสัตว์พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 20 - 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบตัวอย่างหาปริมาณด้วยยาสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และช่วงความเข้มข้น 1.0 - 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับการทดสอบตัวอย่างปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) เท่ากับ 0.9990 และ 0.9980 ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำซึ่งประเมินจากร้อยละการกลับคืน อยู่ในช่วง 84.87 - 102.33 % และ 90.22 - 100.57 % ตามลำดับและ repeatability อยู่ในช่วง 4.61 - 6.54 %RSD และ intermediate precision เท่ากับ 5.42 %RSD มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOQ) เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังนั้นวิธีนี้มีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา

Table 20 Method validation performance characteristic of salinomycin in medicated feed.

Performance characteristic	Criteria	Result
Linearity (<i>r</i>)		
- Homogeneity	$r \geq 0.995$	$r \geq 0.9997$
- Drug carryover	$r \geq 0.995$	$r \geq 0.9993$
Accuracy (%recovery)		
- Homogeneity	80 – 110 %	84.87 – 102.33
- Drug carryover	80 – 110 %	90.22 – 100.57
Precision (%RSD)		
- Homogeneity	%RSD $\leq$ 8.6	2.26 – 7.12 %
- Drug carryover	%RSD $\leq$ 15	2.60 – 8.52 %
LOD		
- Homogeneity	5.0 mg/kg	detected
- Drug carryover	0.25 mg/kg	detected
LOQ		
- Homogeneity	20 mg/kg	20.08 mg/kg
- Drug carryover	1.0 mg/kg	1.08 mg/kg

7. ข้อเสนอแนะ

-

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.

Food and Drug Administration (2005), Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures for Type C Medicated Feeds, Available from : <https://fda.report/media/70019/CVM-GFI--135-Validation-of-Analytical-Procedures-for-Type-C-Medicated-Feeds.pdf> [2022, September]

- Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC). Available from:
http://www.famic.go.jp/ffis/oie/obj/a13_sl.pdf [2022, September]
- Dusi G. and V. Gamba, (1999). Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, 835 pp. 243 – 246
- Sokolic M. and M. Pokorny, (1991). Comparative determination of salinomycin by high performance liquid chromatography, microbiological and colorimetric methods in testing production processes and animal feed preparations. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* Vol.9, Nos 10-12, pp. 1047-1053
- ใจพร พุ่มคำ. วารสารอาหารและยา ฉบับเดือนกันยายน-ธันวาคม 2555. [Online], 2021. Available from : <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/article/download/138475/102928> [2022, September]