

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสาร Furaltadone ในอาหารสัตว์ โดยวิธี

Screening test

แกมกาญจน์ ไชยมงคล รัฐกานต์ ศรีศิริ เกรียงไกร เกื้อกุล วารินทร์ อนมนวล ศิริวรรณ จันมี

บทคัดย่อ

ฟูรัลทาโดน (Furaltadone ; FTD) เป็นยาปฏิชีวนะ (Antibacterial agent) ในกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) ที่ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อก่อโรคในสัตว์ ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และโรคผิวหนังติดเชื้อในสัตว์ แต่การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์นั้น ทำให้เกิดการตกค้าง ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม และอาจทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับแบคทีเรียดื้อยาในสัตว์ได้ เมื่อผู้บริโภครับประทานเนื้อสัตว์เหล่านั้นเข้าไป อาจตกค้างในร่างกายทำให้เกิดอันตรายได้

ปัจจุบันได้มีการวิเคราะห์ Nitrofurans ในอาหารสัตว์ด้วยวิธี screening test เพื่อพัฒนาให้ผู้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ชนิดยาในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลง และให้ใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบเชิงปริมาณสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ จึงมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ screening test และพบว่าวิธีทดสอบมีความจำเพาะต่อ FTD โดยมี limit of detection (LOD) เท่ากับ 1 mg/kg และมี cut-off limit เท่ากับ 3 mg/kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ LOD และ limit of quantification (LOQ) ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ที่สามารถตรวจวัด FTD ได้ในระดับความเข้มข้น 50 ppb - 1 ppm มากขึ้น ถือเป็นการเพิ่มความสามารถของการทดสอบด้วยวิธี screening และเหมาะสมกับการตรวจสอบการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน

คำสำคัญ Furaltadone, อาหารสัตว์, Screening test

Method validation of Furaltadone detection in animal feeds by screening test

Gamgan Chaimongkol Rattakan Srisiri Kriangkrai Kuakoon Warin Anomnual Siriwan Chanmee

Abstract

Furaltadone (Furaltadone; FTD) is an antibiotic (Antibacterial agent) in the nitrofurans group. (Nitrofurans) that acts to destroy pathogens in animals both gram-positive and gram-negative bacteria. It is widely used to treat intestinal infections, urinary tract infections, and infectious skin diseases in animals, but the use of antibiotics in animal husbandry causes residual contamination of the environment, and it can cause problems with drug-resistant bacteria in animals. When consumers eat those meats, residues may remain in the body and cause harm.

Nitrofurans in animal feeds are currently being analyzed by screening tests in order to enable testers to analyze drugs at lower concentrations and as close to the lowest concentration that the quantitative test method can detect. The validity of the screening test method was therefore tested and found that it is specific to FTD with a limit of detection (LOD) of 1 mg/kg and a cut-off limit of 3 mg/kg, which is approximate with LOD and limit of quantification (LOQ) of the quantitative analysis by Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC-MS/MS) technique that can be measured. FTD can be achieved at higher concentrations of 50 ppb - 1 ppm, this increases the capability of screening testing and is suitable for the detection of current antibiotic contamination.

Keyword: Furaltadone, Feed, Screening test

บทนำ

ฟูรัลทาโดน (Furaltadone ; FTD) มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{13}H_{16}N_4O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 324.29 กรัม/โมล เป็นยาปฏิชีวนะ (Antibacterial agent) ในกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) ที่ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อก่อโรคในสัตว์ ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และโรคผิวหนังติดเชื้อในสัตว์ เช่น วัว ควาย สุกร เป็ด ไก่ ปลา และกุ้ง เป็นต้น แต่การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์นั้น ทำให้เกิดการตกค้าง ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม และอาจก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาในสัตว์ได้ โดยเมื่อยาเข้าสู่ร่างกายของสัตว์จะเข้าสู่กระบวนการ Metabolism อย่างรวดเร็ว และตกค้างในเนื้อสัตว์ในรูปอนุพันธ์ (metabolites) ส่งผลถึงผู้บริโภค เมื่อผู้บริโภครับประทานเนื้อสัตว์เหล่านี้เข้าไป อาจเกิดการตกค้าง เป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) และสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ที่มีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทส่วนกลาง และกระบวนการทำงานของระบบทางเดินอาหาร มีความอันตรายต่อผู้บริโภค

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) ถูกห้ามใช้ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา ญี่ปุ่น สิงคโปร์และประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) พบว่า วันที่ 13 มีนาคม ปี ค.ศ. 2003 EU ได้มีการกำหนดค่าขีดจำกัดปริมาณสารตกค้างสูงสุด (maximum residue limits, MRLs) ของสารตั้งต้นทุกตัวในกลุ่มไนโตรฟูแรน ไว้ที่ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือ 1 ส่วนในล้านส่วน (part per million, ppm) (Barbosa et al., 2007) จากการศึกษาพบว่าในอดีตมีการใช้ยานี้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ ในปี 2010 Thongsrisomboon et al. ได้ทำการตรวจวัดสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์จากร้านค้าในจังหวัด เชียงใหม่ ประเทศไทย และนำมาตรวจพบว่าอาหารสัตว์ 1 ใน 4 ตัวอย่างตรวจพบปริมาณ FTD ที่ 1.63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเกินจากเกณฑ์ที่กำหนดไว้ที่ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการตรวจหาสารตกค้างเหล่านี้ในอาหารที่สัตว์บริโภค และควบคุมการใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์อย่างเข้มงวด ดังที่มีประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 ข้อ 3 ระบุ ห้ามใช้ ยา เกสซ์เคมีภัณฑ์ เกลือของเกสซ์เคมีภัณฑ์ เกสซ์เคมีภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูป และเคมีภัณฑ์ เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ 9 กลุ่ม ซึ่งยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) เป็น 1 ใน 9 กลุ่มที่มีการสั่งห้ามใช้ ปัจจุบันได้มีการวิเคราะห์ ฟูรัลทาโดน (Furaltadone) ในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี screening test โดยใช้ทฤษฎีการเกิดสี (Colorimetric method) ของสารประกอบที่มีโมเลกุลของสารกลุ่ม Chromophore จะทำปฏิกิริยาเคมีกับน้ำยาทดสอบทำให้เกิดสารสีคราม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตามชุดตรวจ screening test สำหรับยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) ในปัจจุบันสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของยาได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 10 ppm (กรัมปศุสัตว์, 2544) แต่เนื่องจากยากลุ่มดังกล่าวถูกห้ามใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ให้มีความสอดคล้องกับกฎหมายที่เกี่ยวข้อง จึงต้องมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธี โดยใช้วิธี screening test เพื่อให้สามารถตรวจได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลง และให้ใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบ

เชิงปริมาณ LC-MS/MS สามารถตรวจวัดได้คือระดับความเข้มข้น 50ppb - 1 ppm นอกจากนี้ ยังเป็นการเฝ้าระวังและควบคุมการใช้ยาตามกฎหมาย เพื่อความปลอดภัยปราศจากสารตกค้างของสินค้าปศุสัตว์ และผู้บริโภคต่อไป

1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Furaltadone (FTD) สารกลุ่ม Nitrofurans ในอาหารสัตว์ โดยวิธี screening test ให้สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของ FTD ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด และให้ใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบเชิงปริมาณ LC-MS/MS สามารถตรวจวัดได้ เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและยอมรับของผลวิเคราะห์

2. ขอบข่าย

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Furaltadone ในอาหารสัตว์ด้วยวิธี screening test โดยใช้อาหารไก่เป็นตัวแทน และตรวจยืนยันปริมาณวิเคราะห์ Furaltadone ด้วยวิธี LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ FTD สารกลุ่ม Nitrofurans ในอาหารสัตว์โดยวิธี screening test ว่ามีความเหมาะสมในการคัดกรองสารกลุ่ม Nitrofurans ในอาหารสัตว์ และทราบระดับความเข้มข้นต่ำสุด (limit of detection : LOD) และ cut-off limit ที่สามารถตรวจสอบได้ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification : LOQ) มากยิ่งขึ้น ช่วยให้เกิดความน่าเชื่อถือของวิธี screening test มากขึ้น

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

4.1.1 Screening Test

- 4.1.1.1 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Stereomicroscope)
- 4.1.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง (Electronic balance)
- 4.1.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Electronic balance)
- 4.1.1.4 เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (3D mixer)
- 4.1.1.5 จานแก้ว (Petri dish)
- 4.1.1.6 ถุงมือ (Gloves)
- 4.1.1.7 ช้อนตักตัวอย่างชนิดใบพาย (Spatula)

- 4.1.1.8 จานหลุม (Spot plate)
- 4.1.2 LC-MS/MS
 - 4.1.2.1 เครื่อง Liquid Chromatography Mass spectrometer – Mass spectrometer (Triple quadrupole) LC-MS/MS
 - 4.1.2.2 เครื่องเขย่าตัวอย่าง (Shaker)
 - 4.1.2.3 เครื่อง Ultrasonic bath
 - 4.1.2.4 ชุดกรองเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)
 - 4.1.2.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Electronic balance)
 - 4.1.2.6 Micropipette ขนาด 10-100 μL , 100-1,000 μL และ 1-10 ml
 - 4.1.2.7 Dispenser ขนาด 50 ml
 - 4.1.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงระเหยแห้ง
 - 4.1.2.9 คอลัมน์ (Column) C18 ขนาด 100 x 2.1 mm, 2.6 μm .
 - 4.1.2.10 Solid phase extraction (SPE) ชนิด Aluminum oxide ขนาด 4 g/35 ml.
 - 4.1.2.11 Centrifuge tube ชนิด polypropylene ขนาด 50 ml.
 - 4.1.2.12 Disposable syringe ขนาด 3 ml.
 - 4.1.2.13 Syringe membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μm , เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm.
 - 4.1.2.14 Laboratory sealing film
 - 4.1.2.15 Tip ขนาด 10-100 μL , 100-1,000 μL .
 - 4.1.2.16 เครื่องระเหยสารตัวอย่าง (Nitrogen Evaporator)
- 4.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน
 - 4.2.1 น้ำยา Nitro1
 - 4.2.2 น้ำยา Nitro 2
 - 4.2.3 สารมาตรฐานฟูรัลทาโดน (FTD) Furaltadone hydrochloride 94.60% Purity (g/g)
 - 4.2.4 อะซีโตนไทรล์ (Acetonitrile)
 - 4.2.5 กรดฟอร์มิก (Formic acid)
 - 4.2.6 เมทานอล (Methanol)
 - 4.2.7 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
 - 4.2.8 เฮกเซน (Hexane)
 - 4.2.9 เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate)

5. วิธีดำเนินการ

- 5.1 ศึกษาข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง และวางแผนการทดลอง
- 5.2 จัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี สารมาตรฐานเพื่อใช้ในการทดสอบ

5.3 ตรวจวิเคราะห์ยา FTD ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่จะนำมาใช้ในการทดลอง (Sample blank) ด้วยวิธี LC-MS/MS และ Screening test ให้มั่นใจว่าไม่มีการปลอมปนยา FTD ก่อนนำตัวอย่างมาทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

5.3.1 การตรวจวิเคราะห์ยา FTD ในตัวอย่างอาหารสัตว์ด้วยวิธี Screening test โดยผู้ทดสอบงานกายภาพจำนวน 12 คน ทดสอบคนละ 10 ซ้ำ

5.3.1.1 หยดสารละลาย Nitro1 จำนวน 9 หยด และ Nitro2 จำนวน 1 หยด ในอัตราส่วน 9:1 ผสมกันลงในจานหลุม

5.3.1.2 ใช้ช้อนตักสาร (Spatula) ตักตัวอย่างอาหารสัตว์โรยให้กระจายบางๆลงในจานหลุมที่มีสารละลาย Nitro1 และ Nitro2 ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope ทันที ถ้าตรวจไม่พบยา FTD (-) จะไม่เกิดสีตามที่กำหนด ถ้าตรวจพบยา FTD (+) จะเกิดสีคราม ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเกิดสีของอาหารสัตว์ผสม FTD

ชนิดยา	ปฏิกิริยาการเกิดสีของยา
ผลบวก (+)	สีคราม
ผลลบ (-)	ไม่เกิดสี

5.3.2 การตรวจวิเคราะห์ยา FTD ในตัวอย่างอาหารสัตว์ด้วยวิธี LC-MS/MS มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

ชั่งตัวอย่าง 10.00 g $\pm$ 0.05 g ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml



เติมน้ำ 10 ml และเติมอะซีโตนไตรคล 40 ml ปิดจุกและใช้ sealing film พันจุกให้สนิท



นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 30 นาที



เทสารละลายใส่หลอดปั่นเหวี่ยงชนิดโพลีโพรพิลีน ขนาด 50 ml ปิดฝาให้แน่นสนิท นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C



นำส่วนใสที่ได้ Load ผ่าน SPE Alumina column โดยทิ้งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ 2 ml แรก แล้วเก็บสารละลายผ่านคอลัมน์ที่เหลือ เปิดสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ 10 ml ลงในขวดแก้วสำหรับสกัดนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน อุณหภูมิ 40°C $\pm$ 2°C ให้เหลือ 5 ml



สกัดด้วยเฮกเซน 1 ครั้ง จำนวน 2 ml แล้วดูดชั้นเฮกเซนทิ้งไป

หากเตรียมอาหารสัตว์ผสม FTD 2000 กรัม ต้องเตรียมเนื้อสาร 0.020 g จาก Standard ที่มีเนื้อสาร 94.60% w/v

สูตร	$W_T = \frac{W_C \times MW_{(salt\ base)} \times 100}{\% \text{ Purity} \times MW_{(free\ base)}}$	เมื่อความบริสุทธิ์ของสารอยู่ในรูป % Purity
------	--	--

เมื่อ W_T คือ น้ำหนักสารมาตรฐานที่ต้องชั่ง (g)

W_C คือ น้ำหนักของสารมาตรฐานที่คำนวณได้จากความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม (g)

$MW_{(salt\ base)}$ คือ มวลโมเลกุลของสารมาตรฐานที่อยู่ในรูป salt base

$MW_{(free\ base)}$ คือ มวลโมเลกุลของสารมาตรฐานที่อยู่ในรูป free base

% Purity คือ ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (%)

$$\text{สูตร } W_T = \frac{W_C \times MW_{(salt\ base)} \times 100}{\% \text{ Purity} \times MW_{(free\ base)}}$$

แทนค่า
$$W_T = \frac{0.020 \text{ g} \times 360.75 \text{ g/mol} \times 100}{94.60 \times 324.25 \text{ g/mol}}$$

$$W_T = \frac{721.5}{30,674.05}$$

$$W_T = 0.02352 \text{ g}$$

เตรียม FTD 10 mg/kg จำนวน 2,000 g จะต้องชั่งสารมาตรฐาน FTD 0.02352 g

โดยชั่งสารมาตรฐาน FTD 0.02352 กรัม ผสมกับอาหารสัตว์ 0.02648 กรัม เขย่าด้วยเครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน 30 นาที จากนั้น เติมอาหารสัตว์เพิ่มขึ้นทีละ 2 เท่า เขย่า 30 นาที ที่ทุกรอบการเติมอาหาร จนได้ปริมาณตัวอย่างตามที่ต้องการ ดังตารางที่ 3 จากนั้นนำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD ความเข้มข้น 10 mg/kg ที่ได้ไปตรวจหาปริมาณ FTD และทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ด้วยวิธี LC-MS/MS และ Screening Test

ตารางที่ 3 เตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD ความเข้มข้น 10 mg/kg ปริมาณ 2,000 กรัม

เติมสารมาตรฐาน FTD (g)	เติมอาหารสัตว์ (g)	ปริมาตรรวม(g) อาหารสัตว์+FTD	ผสมตัวอย่างด้วยเครื่อง 3D Mixer
0.02352	0.02648	0.05	30 นาที
-	0.05	0.10	30 นาที
-	0.10	0.20	30 นาที

-	0.20	0.40	30 นาที
-	0.40	0.80	30 นาที
-	0.80	1.60	30 นาที
-	1.60	3.20	30 นาที
-	3.20	6.40	30 นาที
-	6.40	12.80	30 นาที
-	12.80	25.60	30 นาที
-	25.60	51.20	30 นาที
-	51.20	102.40	30 นาที
-	102.40	204.80	30 นาที
-	204.80	409.60	30 นาที
-	409.60	819.20	30 นาที
-	819.20	1638.4	30 นาที
-	361.6	2000.0	2 ชั่วโมง 30 นาที

5.4.1 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD เข้มข้น 10 mg/kg โดยแบ่งตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD เข้มข้น 10 mg/kg ออกเป็นถุงละ 25 กรัม สุ่ม 10 ถุง เพื่อทดสอบด้วยวิธี screening test และอีก 10 ถุง เพื่อทดสอบด้วยวิธี LC-MS/MS

จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test) ของการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD เข้มข้น 10 mg/kg ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD เข้มข้น 10 mg/kg

ตัวอย่าง	รายละเอียดตัวอย่าง	Screening test	LC-MS/MS
A	อาหารสัตว์	-	-
B	อาหารสัตว์+ FTD 10 mg/kg	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง ตรวจพบยา - หมายถึง ตรวจไม่พบยา

ตัวอย่าง A อาหารสัตว์ ทั้ง 10 ถุง ให้ผลลบ เมื่อทดสอบ Screening test ด้วยชุดน้ำยา Nitro1 Nitro2 และให้ผลลบ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค LC-MS/MS

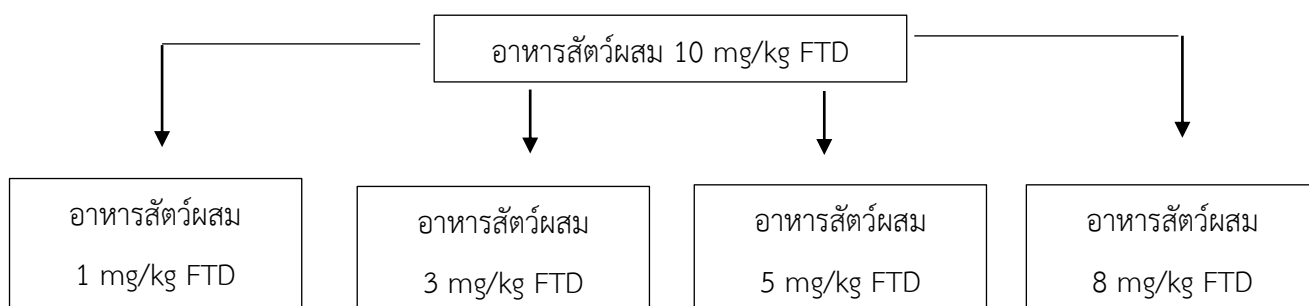
ตัวอย่าง B อาหารสัตว์ + FTD 10 mg/kg ทั้ง 10 ถัง ให้ผลบวก เมื่อทดสอบ Screening test ด้วยชุดน้ำยา Nitro1 Nitro2 และให้ผลบวก เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค LC-MS/MS และจากการทดสอบด้วย one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณ FTD ของทั้ง 20 ซ้ำนั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) พบว่าทุกตัวอย่างที่ทำการสุ่มทดสอบด้วยเทคนิค screening ให้ผลเป็นไปในแนวทางเดียวกัน และเทคนิค LC-MS/MS ให้ผลค่าเฉลี่ยปริมาณ FTD เมื่อทดสอบด้วยสถิติ one-way ANOVA ผลที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงทำให้สรุปได้ว่า ชุดตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยาที่เตรียมขึ้นนั้น มีความเป็นเนื้อเดียวกัน เหมาะสมแก่การนำไปเตรียมตัวอย่าง เจือจางเป็นความเข้มข้นระดับ 1 3 5 และ 8 mg/kg และจะทำการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ในตัวอย่าง อาหารสัตว์ + FTD ในความเข้มข้นที่เป็น Cut-off limit ต่อไป

5.4.2 นำตัวอย่างอาหารสัตว์ FTD ความเข้มข้น 10 mg/kg มาเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD ความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 8 mg/kg ด้วยวิธี gradual mixing with 2-fold trituration

5.4.2.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยา

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ + FTD ความเข้มข้น 10 mg/kg ที่ได้มาทดสอบปริมาณยา FTD ด้วยเทคนิค LC- MS/MS เพื่อนำค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง 10 mg/kg ที่ได้จากการทดสอบไปคำนวณ เพื่อเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 8 mg/kg ต่อไป ดังรูปภาพที่ 1 และ ตารางที่ 5



รูปภาพที่ 1 การเตรียมอาหารสัตว์ผสมฟูรัลทาโดน (Furaltadone)

ตารางที่ 5 วิธีเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD แต่ละระดับความเข้มข้น

target	Matrix	Samples
อาหารสัตว์ผสม FTD 8 mg/kg จำนวน 400 กรัม	อาหารสัตว์ 71.289 กรัม	อาหารสัตว์ผสม FTD 10 mg/kg จำนวน 328.771 กรัม
อาหารสัตว์ผสม FTD 5 mg/kg จำนวน 400 กรัม	อาหารสัตว์ 194.556 กรัม	อาหารสัตว์ผสม FTD 10 mg/kg จำนวน 205.444 กรัม
อาหารสัตว์ผสม FTD 3 mg/kg จำนวน 1200 กรัม	อาหารสัตว์ 830.200 กรัม	อาหารสัตว์ผสม FTD 10 mg/kg จำนวน 369.800 กรัม
อาหารสัตว์ผสม FTD 1 mg/kg จำนวน 400 กรัม	อาหารสัตว์ 358.911 กรัม	อาหารสัตว์ผสม FTD 10 mg/kg จำนวน 41.089 กรัม

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

กรมปศุสัตว์

5.5 ตรวจตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD ความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg เพื่อวิเคราะห์หาค่า Cut-off limit และระดับความเข้มข้นต่ำสุด (limit of detection: LOD) ด้วยวิธี Screening test

ค่า Limit of detection (LOD) ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ คือ ระดับความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่ผู้ทดสอบสามารถตรวจพบได้ ซึ่งสามารถหาได้โดยการสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการให้ผลทดสอบที่ถูกต้อง (Positive response rate) และค่าความเข้มข้นของสารที่ระดับต่าง ๆ

ค่า Cut-off limit หรือ Cut-off concentration คือ ระดับความเข้มข้นของสารที่ผู้ทดสอบสามารถให้ผลทดสอบถูกต้อง 100% และมีค่า False negative rate ต่ำ เช่น 5% หรือกล่าวได้ว่าเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ผู้ทดสอบสามารถให้ผลทดสอบถูกต้องที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสามารถหาได้โดยการสร้างกราฟระหว่าง ร้อยละของการให้ผลทดสอบที่ถูกต้อง (Positive response rate) และ ค่าความเข้มข้นของสารที่ระดับต่างๆ

5.6 คำนวณคุณลักษณะเฉพาะแสดงสมรรถนะของวิธีทดสอบ (Performance Characteristics)

คำนวณหา False positive rate และ False negative rate ตามสมการดังนี้

$$\text{False positive rate} = \frac{fp}{tn+fp} \quad \text{โดยที่}$$

False positive (fp) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวกปลอม

True negative (tn) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นลบจริง

$$\text{False negative rate} = \frac{fn}{tp+fn} \quad \text{โดยที่}$$

True positive (tp) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวกจริง

False negative (fn) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นลบปลอม

คำนวณหาค่า Sensitivity rate และค่า Specificity rate ตามสมการดังนี้

$$\text{Sensitivity rate} = \frac{\text{true positive}}{\text{total number of known positive}} = \frac{tp}{tp+fn} \quad \text{โดยที่}$$

True positive (tp) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวกจริง

False negative (fn) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นลบปลอม

$$\text{Specificity rate} = \frac{\text{true negative}}{\text{total number of known negative}} = \frac{tn}{tn+fp} \quad \text{โดยที่}$$

True negative (tn) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นลบจริง

False positive (fp) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวกปลอม

6. ผลการทดลอง

6.1 การตรวจวิเคราะห์ยา FTD ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg ด้วยวิธี LC-MS/MS จากการตรวจวิเคราะห์ยา FTD ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg ด้วยวิธี LC-MS/MS พบว่า ความเข้มข้นเฉลี่ยที่วัดได้อยู่ที่ 1.086 3.134 4.742 8.142 และ 9.735 mg/kg ตามลำดับ และมี %Recovery อยู่ที่ 108.5 104.5 94.8 101.76 และ 97.35 ตามลำดับ ดังตารางที่ 6 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 6 การทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS

ความเข้มข้น พารามิเตอร์	1 mg/kg	3 mg/kg	5 mg/kg	8 mg/kg	10 mg/kg
ความเข้มข้นเฉลี่ย	1.086	3.134	4.742	8.142	9.735
% Recovery	108.5	104.5	94.8	101.76	97.35

6.2 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test)

จากตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Test of Homogeneity of Variances พบว่า $F_{cal} = 0.620678$ และ $F_{crit} = 3.020383$ ซึ่ง $F_{crit} > F_{cal}$ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 7 ความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) ของยา FTD ในอาหารสัตว์ 3 mg/kg โดยนำปริมาณความเข้มข้นที่วัดได้ โดยวิธี LC-MS/MS มาคำนวณค่าทางสถิติ One-Way ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.0033	9	0.000366	0.620678	0.757180022	3.020383
Within Groups	0.0059	10	0.000589			
Total	0.0092	19				

6.3 การทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD ด้วยวิธี Screening test โดยผู้ทดสอบงานกายภาพ 12 คน โดยทดสอบท่านละ 10 ซ้ำ เพื่อหาค่า Cut-off limit จากการทดสอบชุดตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยาทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น ดังตารางที่ 8 พบว่าอาหารสัตว์ผสม FTD ที่ระดับ 3, 5, 8 และ 10 mg/kg ผู้ทดสอบ

ทั้งหมดสามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างถูกต้องทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ส่วนที่ระดับ 1 mg/kg ผู้ทดสอบทั้งหมดสามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างถูกต้องเพียง 76 ตัวอย่าง นั่นคือสามารถวิเคราะห์ FTD ได้ถูกต้องทั้งหมดที่ระดับต่ำสุด เท่ากับ 3 mg/kg จึงสรุปได้ว่า ค่าCut-off limit เท่ากับ 3 mg/kg

ตารางที่ 8 การทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมFTD ด้วยวิธี Screening test

จำนวนผู้ทดสอบ 12 คน		ระดับความเข้มข้นFTDในตัวอย่างอาหารสัตว์ (mg/kg)					
ชนิดยา	ผลการทดสอบ	0	1	3	5	8	10
FTD	+/-	0 / 120	76 / 44	120 / 0	120 / 0	120 / 0	120 / 0

หมายเหตุ + หมายถึง พบยา FTD , - หมายถึง ไม่พบยา FTD

6.4 การทดสอบความคงตัว (Stability test)

การทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมFTD ด้วยวิธี Screening test ได้ค่า Cut-off เท่ากับ 3 mg/kg จึงได้นำค่าดังกล่าวมาทดสอบความคงตัว (Stability test) ของยา FTD ในอาหารสัตว์ และนำค่าปริมาณยา FTD ในอาหารสัตว์ที่ตรวจวัดจากวิธี LC-MS/MS มาทดสอบทางสถิติ โดยการวัดระดับความเข้มข้นในแต่ละช่วงเปรียบเทียบกับวันแรกที่เตรียมตัวอย่าง โดยวัดปริมาณในช่วง Day7, Day14, Day30 พบว่า t Stat มีค่าเท่ากับ -0.6971, 1.8125 และ 0.9723 ตามลำดับ ส่วน t Critical มีค่าเท่ากับ 2.5931, 2.2010 และ 2.2010 ตามลำดับ แสดงว่าตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD มีความคงตัวตลอด30วัน เนื่องจากค่า t stat มีค่าน้อยกว่า t Critical ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความคงตัว (Stability) ของยา FTD ในอาหารสัตว์ 3 mg/kg นำปริมาณความเข้มข้นที่วัดได้โดยวิธี LC-MS/MS มาคำนวณค่าทางสถิติ F-test และ T-test

พารามิเตอร์	ระยะเวลา		
	Day7	Day14	Day30
t Stat	-0.6971	1.8125	0.9723
t Critical (critical C value)	2.5931	2.2010	2.2010
Stability = t Stat < t Critical	Pass	Pass	Pass

จากการทดสอบความคงตัว (Stability test) ของยา FTD ในอาหารสัตว์ที่ระดับความเข้มข้น 3 mg/kgโดยการตรวจการมองเห็นสีครามของยาในแต่ละช่วงเปรียบเทียบกับวันแรกที่เตรียมตัวอย่าง พบว่า Day7 ถึงDay30 สามารถตรวจพบสีของยา FTD ได้ 100% ดังตารางที่10

ตารางที่ 10 ความคงตัว (Stability) ของยาFTD ในอาหารสัตว์ 3mg/kg ตรวจด้วยวิธี Screening test

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์	สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์	กรมปศุสัตว์
------------------------------	----------------------------------	-------------

หน้า จาก 15

ระยะเวลา	Day7	Day14	Day30
Screening Test	100%	100%	100%

6.5 ผลการคำนวณ Performance characteristics

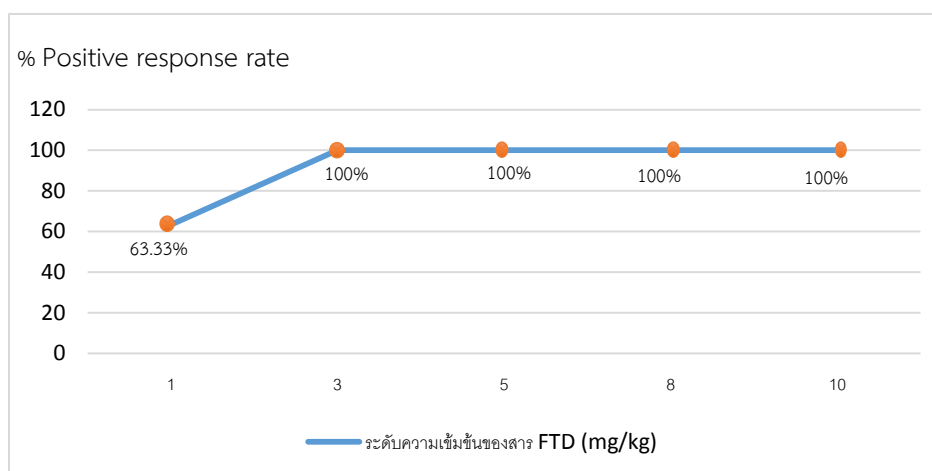
จากการคำนวณ performance characteristics ของการทดสอบสาร FTD ด้วยวิธี screening test พบว่าที่ความเข้มข้นระดับ 3, 5, 8 และ 10 mg/kg มี sensitivity rate 1.000 (100%) และมี specificity 1.000 (100%) คือ ผู้ทดสอบสามารถให้ผลวิเคราะห์ที่ 4 ระดับความเข้มข้นนี้ถูกต้อง 100% และไม่มีผลปลอม หรือบวกปลอม โดยที่ 4 ระดับความเข้มข้นนี้ มี false negative rate เท่ากับ 0% ส่วนที่ความเข้มข้น 1 mg/kg นั้น พบว่ามี specificity rate 1.000 (100%) เช่นกัน บ่งบอกถึงว่าผู้ทดสอบสามารถระบุชนิดยาได้ถูกต้อง แต่มี sensitivity rate อยู่ที่ 63.33% และมี false negative rate อยู่ที่ 36.67% ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การทดสอบ Performance characteristics ของวิธี screening test

จำนวนผู้ทดสอบ 12 คน		ระดับความเข้มข้นFTDในตัวอย่างอาหารสัตว์ (mg/kg)					
ชนิดยา	ผลการทดสอบ	0	1	3	5	8	10
Furaltadone	% Positive response rate	0.00	63.33	100.0	100.0	100.0	100.0
	False positive rate (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	False negative rate (%)	0.0	36.67	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sensitivity rate (%)	0.0	63.33	100.0	100.0	100.0	100.0
	Specificity rate (%)	100	100	100	100	100	100

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 11 มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Positive response rate และระดับความเข้มข้นของสาร FTD (mg/kg) จะพบว่าการวิเคราะห์ FTD ระดับความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่ผู้ทดสอบสามารถตรวจพบได้ หรือ limit of detection (LOD) อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/kg และในการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้น 3 mg/kg ผู้ทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง 100% หรือเรียกว่าค่า cut-

off limit ดังรูปภาพที่ 2



รูปภาพที่ 2 % Positive response rate ของการวิเคราะห์อาหารสัตว์ผสมFTDที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

7. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ FTD ในอาหารสัตว์ โดยวิธี screening test ซึ่งใช้การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยา ด้วยวิธี gradual mixing with 2-fold trituration โดยใช้เครื่องผสมตัวอย่างอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันแบบ 3D mixer เมื่อทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg โดยผู้ทดสอบงานกายภาพ 12 คน พบว่า มีค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 1 mg/kg และมี cut-off limit เท่ากับ 3 mg/kg จากนั้นทำการทดสอบยืนยันปริมาณวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS วิธีทดสอบนี้มี working range ระหว่าง 0.05 – 1.00 mg/kg พบว่าทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น มีความเข้มข้นเฉลี่ยที่ตรวจวัดได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ %Recovery 80-110 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน(Homogeneity) ของยา FTD ที่ระดับ 3 mg/kg ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA พบว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และเมื่อทดสอบความคงตัว (Stability) ของตัวอย่างอาหารสัตว์ผสม FTD ที่ Day 0 ถึง Day 30 ด้วยวิธี screening test พบว่ายามีความคงตัวอยู่ในระดับ 100%

8. ข้อเสนอแนะ

วิธีการเตรียมตัวอย่างที่ได้สามารถเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยาให้มีความเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งเหมาะสมที่จะใช้ในการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยาในครั้งต่อไป เช่น ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบประสิทธิภาพห้องปฏิบัติการ (ring test) เป็นต้น และการตรวจ Screening test Furaltadone ในช่วงระยะเวลา 30 วันหลังมีการผสมยาในอาหารสัตว์ ยังคงมีความคงตัว (Stability) ตามผลการทดลองข้างต้น

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงาน

ขอขอบคุณนางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และนางสาวสุรตนา บุญใส ที่ให้คำแนะนำการเตรียมตัวอย่างและการดำเนินงานด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณนายศิริวัฒน์ رایณะสุข และ นางสาวพรเพ็ญ เจียมประสูตร รวมถึงบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (งานสารตกค้าง) ที่เอื้อเพื่อการตรวจสอบปริมาณสาร Furaltadone ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ขอขอบคุณบุคลากรงานทดสอบกายภาพ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ทุกท่าน และขอขอบคุณคุณแพรวพรรณ ห้องทองแดง คุณดรุณี กอเขาะ ผู้พัฒนาชุดทดสอบสำหรับคำแนะนำด้วยดีเสมอมา

10. เอกสารอ้างอิง

แพรวพรรณ ห้องทองแดง, ดรุณี กอเขาะ, มนวิภา จารุตามระ, เอกสารวิชาการสิ่งประดิษฐ์ชุด
ตรวจสอบชนิดยาในอาหารสัตว์ (Testing Kits for Drugs in Feed), 2545 เลข
ทะเบียนผลงาน (44)-0704-236

Barbosa, J., Moura, S., Barbosa, R., Ramos, F. and Noronha da Silveira, M, I. (2007).
Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 586:359-365.

Li, J., Liu, J., Zang, C, H., Li, H. and Wang, P, J. (2010). Broad specificity indirect competitive immunoassay for determination of nitrofurans in animal feeds. *Analytica Chimica Acta*. 678: 1-6.

Thongsrisomboon, P., Liawruangrath, B., Liawrungrath, S. and Sateinperakul, S. (2010).
Determination of nitrofurans residues in animal feeds by flow injection chemiluminescence procedure. *Food Chemistry* 123: 834-839.

B. Magnusson and U.Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and

Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from
www.eurachem.org

M. Valcarcel, S. Cardenas, D. Barcelo et al., Methodology of qualitative chemical
analysis, report EUR 20605 EN, European Commission, 2002 ISBN 92-
894-5194-7

Esther Trullols, Itziar Ruisanchez, F. Xavier Rius, Validation of Qualitative analytical
methods, Trend in Analytical Chemistry, Vol.23, No2, 2004

AOAC Official Methods of Analysis, (2016). Guidelines for Standard Method
Performance Requirements. Appendix F, p. 9