

## การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรล (Hexestrol) ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

เอกชา ตนานนท์ชัย วรัญญา แก้วทิพย์ ศิริวัฒน์ رایณะสุข  
สุนีย์ คณาพิพัฒน์ พยุงศักดิ์ ภักมี รังสรรค์ เข้มสุวรรณ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM ในการทดสอบสารเฮกเอสโตรล เตรียมตัวอย่างโดยสกัดตัวอย่างด้วยเมทานอล จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิด อะซิโตไนไตรล์ และน้ำปราศจากไอออน ใช้คอลัมน์ชนิด Accucore RP-MS และสถานะของแมสสเปคโตรเมทรีแบบ ESI positive mode ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรล พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 40 - 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $r^2$ ) ของสารเฮกเอสโตรล เท่ากับ 0.9998 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เท่ากับ 15 และ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารเฮกเอสโตรลที่ระดับ 40, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 73.18, 106.55 และ 104.28 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารเฮกเอสโตรลที่ระดับ 40, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ร้อยละ 3.15, 8.26 และ 44.47 ตามลำดับ และทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของสารเฮกเอสโตรลที่ระดับ 40, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 3.20, 20.24 และ 37.64 ตามลำดับ จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ ที่ระดับความเข้มข้น 40 - 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในอาหารสัตว์

**คำสำคัญ :** สารเฮกเอสโตรล, การทดสอบความใช้ได้, อาหารสัตว์

---

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Aekkacha Tananonchai Warunya Kaewthip Siriwat Rainasuk  
Sunee Kanapipat Phayungsak Phakmee Rangsan Kemsuwan

### Abstract

The in-house method for determining Hexestrol in animal feed with LC-MS/MS technique was validated according to EURACHEM Guideline. For determination of Hexestrol the samples were extracted with methanol and analyzed by LC-MS/MS. The analysis was carried out using the mobile phase of acetonitrile and deionized water on an Accucore RP-MS column with ESI positive mode of mass spectrometry condition. The results of method validation of Hexestrol found the calibration curve at the level 40 – 1,000 µg/kg were good linearity; the correlation determination ( $r^2$ ) of Hexestrol were 0.9998. The limit of Detection and Limit of Quantitation were 15 and 40 µg/kg, respectively. The mean % recovery of Hexestrol at the levels 40, 500, and 1,000 µg/kg were 73.18, 106.55 and 104.28 respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the levels 40, 500, and 1,000 µg/kg of Hexestrol were 3.15, 8.26, and 44.47 respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility at the levels 40, 500, and 1,000 µg/kg of Hexestrol were 3.20, 20.24, and 37.64 respectively. The results of performance characteristics were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determining Hexestrol at the level of 40 – 1,000 µg/kg in animal feed.

**Keywords:** Hexestrol, method validation, animal feed

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

## การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรล (Hexestrol) ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

เอกชา ตนานนท์ชัย วรัญญา แก้วทิพย์ ศิริวัฒน์ รายนะสุข  
สุนีย์ คณาพิพัฒน์ พยุงศักดิ์ ภัคมี รังสรรค์ เข็มสุวรรณ

### บทนำ

ปัจจุบันการติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนสารเฮกเอสโตรล (Hexestrol) ในเนื้อสัตว์ และอาหารสัตว์ มีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากสารเฮกเอสโตรลเป็นสารที่ถูกมาใช้ในการรักษาสัตว์ และปรับปรุงคุณภาพเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารได้ โดยการฉีดหรือผสมในอาหารสัตว์ เช่น สุนัข ไก่ เป็นต้น เพื่อลดปริมาณไขมันเป็นการเพิ่มกล้ามเนื้อให้กับสัตว์ (Shao และคณะ, 2005) ซึ่ง Blasco และคณะ ในปี 2007 และ Schuz และคณะ ในปี 2015 ได้มีการรายงานว่าการบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีสารเฮกเอสโตรล ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ส่งผลกระทบต่อร่างกายมนุษย์ได้ เช่น มีแนวโน้มเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง เต้านม มะเร็งมดลูก และยังอาจเป็นสาเหตุของโรคที่เกี่ยวข้องกับต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting chemicals) ในประเทศไทย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีมติเพิกถอนใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับยา สารเฮกเอสโตรล ตั้งแต่ พ.ศ. 2529 และสหภาพยุโรป (European Union; EU) มีประกาศห้ามใช้สารเฮกเอสโตรลในการเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร และ ห้ามนำเข้าผลิตภัณฑ์ที่มีเฮกเอสโตรล โดยมีการตรวจสอบทั้งสารตั้งต้น และสารอนุพันธ์ ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ก่อนนำเข้าจำหน่าย (Concerning the prohibition on the use in stock farming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directs 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC., 1996)

ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS และเพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล จึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น ภายในห้องปฏิบัติการอ้างอิงวิธีทดสอบจาก Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol.404(8), September 2012

โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014) เพื่อแสดงว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธี และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

### 2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธี และทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

### 3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

3.2 ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ

ISO/IEC 17025:2017

3.3 ใช้ในการเฝ้าระวังการใช้ยาสัตว์และฮอร์โมนในระบบการผลิตสินค้าปศุสัตว์

### 4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ ดังนี้

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

4.1.1 ทดสอบ Fortified Sample ของสารเฮกเอสโตรล จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ของสารเฮกเอสโตรล และพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) แล้วพิจารณาค่า Correlation Coefficient ไม่น้อยกว่า 0.995

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

4.2.1 ทดสอบ Fortified Sample ของสารเฮกเอสโตรล ให้มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของสารเฮกเอสโตรล จาก  $LOD = 3S'_0$  และ  $LOQ = 10S'_0$

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

เมื่อ  $S_0$  = Standard Deviation จากการทดสอบซ้ำ

$n$  = จำนวนทดสอบซ้ำในงาน routine

$S'_0$  = Standard Deviation สำหรับคำนวณค่า LOD และ LOQ

4.2.2 ทำการยืนยันค่า LOD โดยทดสอบ Fortified sample ของสารเฮกเอสตรอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.1.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า Signal to Noise Ratio (S/N)  $\geq 3$  และ %Ion Ratio ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด หากไม่ได้ ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.2.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ Fortified Sample ของเฮกเอสตรอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.1.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาประเมินความแม่นยำและความเที่ยงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3 การทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.3.1 ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (Repeatability) ของวิธีทดสอบ โดยทดสอบตัวอย่าง Sample Blank และ Fortified Sample ของสารเฮกเอสตรอล 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (Within Laboratory Reproducibility) ของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน ทดสอบต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน แต่ละวันจะทำการทดสอบตัวอย่าง Sample Blank และ Fortified Sample ของสารเฮกเอสตรอล 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

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

4.3.4 ประเมินความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD<sub>r</sub>) ของความเข้มข้นสารที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD<sub>r</sub>)

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

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เดิมสารมาตรฐาน

4.3.5 ประเมินความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD<sub>R</sub>) ของความเข้มข้นสารที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (% PRSD<sub>R</sub>)

$$\text{สมการ Horwitz (With-in Laboratory Reproducibility) } \% \text{ PRSD}_R = 2C^{-0.1505}$$

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

#### 4.4 การทดสอบ Selectivity และ Specificity

4.4.1 เตรียมตัวอย่าง Sample Blank จำนวน 3 ซ้ำ

4.4.2 เตรียมตัวอย่าง Fortified Sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานเฮกเอสโตรล ความเข้มข้นที่ระดับ 0.004 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

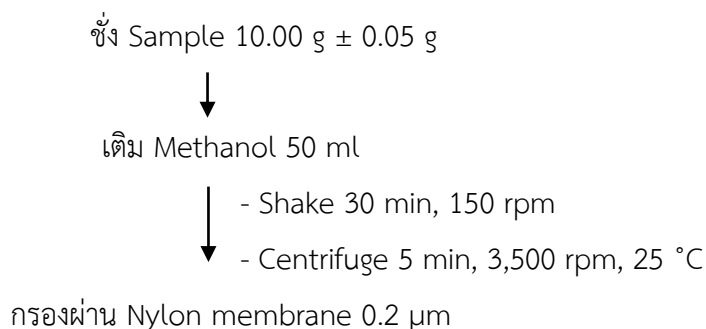
4.4.3 เตรียมตัวอย่าง Fortified Sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานเฮกเอสโตรล ความเข้มข้นที่ระดับ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเติมสารละลายมาตรฐานไดเอทิลstilbestrol (Diethylstilbestrol) ซึ่งสงสัยว่าจะรบกวนการทดสอบ ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

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

4.4.5 เปรียบเทียบสัญญาณของ Sample blank (ข้อ 4.4.1) และ Fortified Sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานเฮกเอสโตรล ว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใน Matrix ของ Sample Blank

4.4.6 เปรียบเทียบผลการทดสอบ Fortified Sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานเฮกเอสโตรล กับ Spike sample (ข้อ 4.4.3) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารเฮกเอสโตรล และเติมสารละลายมาตรฐานไดเอทิลstilbestrol ว่าพบ Peak ของสารไดเอทิลstilbestrol ที่ตำแหน่ง Retention Time เดียวกันกับสารเฮกเอสโตรลหรือไม่ หรือมี Peak ของสารไดเอทิลstilbestrol รบกวน Peak ของสารเฮกเอสโตรลหรือไม่

แผนผังขั้นตอนการทดสอบสารเฮกเอสโตรลในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

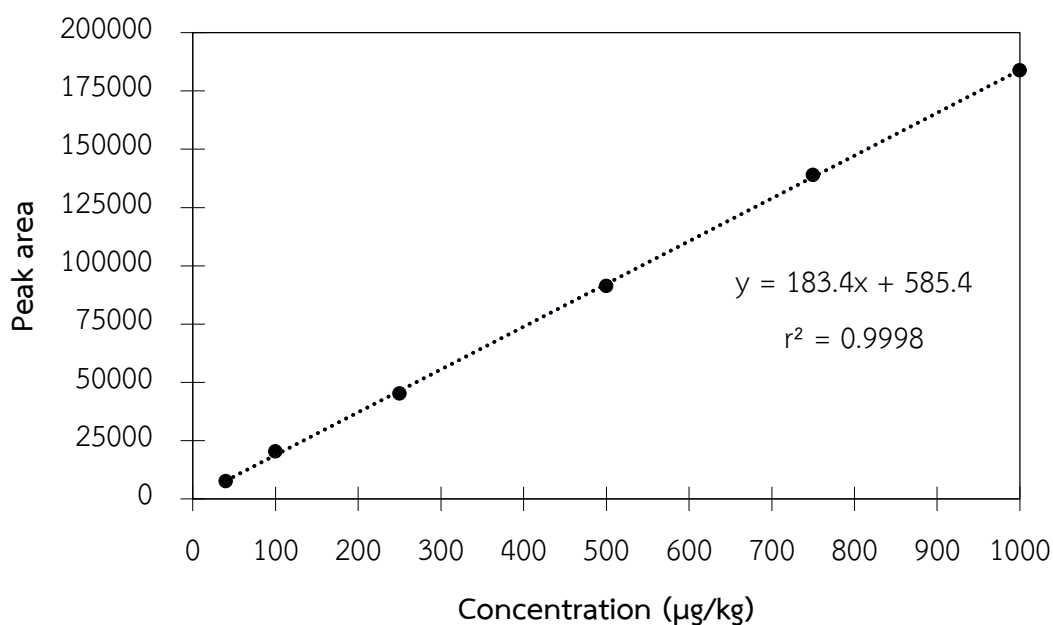


↓  
LC- MS/MS

## 5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (Working Range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ Fortified Sample ของสารเฮกเอสตรอล ในช่วงความเข้มข้น 40 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample และพื้นที่ใต้พีค (Peak area) ของสารเฮกเอสตรอลเมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Determination;  $r^2$ ) พบว่า มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ( $r^2 \geq 0.995$ ) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 40 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงเหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Fortified Sample ที่ 40 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak Area ของสารเฮกเอสตรอล

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

5.2.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารเฮกเอสตรอลโดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก  $LOD = 3S'_0$  และ  $LOQ = 10S'_0$  พบว่ามีค่าดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารเฮกเอสตรอล

| ลำดับ          | ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/kg}$ ) |
|----------------|----------------------------------|
| 1              | 18.96                            |
| 2              | 19.14                            |
| 3              | 19.92                            |
| 4              | 20.04                            |
| 5              | 20.42                            |
| 6              | 19.00                            |
| 7              | 21.75                            |
| 8              | 21.19                            |
| 9              | 19.89                            |
| 10             | 20.46                            |
| mean           | 20.08                            |
| SD             | 0.9210                           |
| $S'_0$         | 0.6512                           |
| $LOD = 3S'_0$  | 1.9537                           |
| $LOQ = 10S'_0$ | 6.5125                           |

5.2.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) ของสารเฮกเอสตรอลที่ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าร้อยละของ Ion Ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน พบว่ามีค่า  $S/N \geq 3$  และร้อยละของ ion ratio เป็นไปตาม

เกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision ดังนั้นค่า LOD ของสารเฮกเอสตรอล มีค่าเท่ากับ 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

5.2.3 ผลการยืนยันความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ) ของสารเฮกเอสตรอลที่ 10 และ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่า %RSD 21.23 ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC จึงทำการปรับค่า (2016) LOQ ที่ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมพบว่า ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 60 – 115 เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) และตามเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz ตามลำดับ ดังนั้นค่า LOQ ของสารเฮกเอสตรอล มีค่าเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 3

### 5.3 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ

5.3.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารเฮกเอสตรอลความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40 (LOQ), 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารสารเฮกเอสตรอลในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 60-115, 80-110 และ 80-110 ตามลำดับ ตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 4

5.3.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารพาราควอตที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40 (LOQ), 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD) ดังตารางที่ 5 และจากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

**ตารางที่ 2** ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารสารเฮกเอสตรอล ที่ระดับ 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

| ลำดับ | %IR    | S/N  |
|-------|--------|------|
| 1     | 101.23 | 28.9 |
| 2     | 111.95 | 26.9 |
| 3     | 89.98  | 30.5 |
| 4     | 111.17 | 25.9 |
| 5     | 92.72  | 28.4 |
| 6     | 94.91  | 18.3 |
| 7     | 105.19 | 16.5 |
| 8     | 124.05 | 14.0 |
| 9     | 101.39 | 19.0 |

|                                           |        |      |
|-------------------------------------------|--------|------|
| 10                                        | 113.43 | 18.3 |
| เกณฑ์ S/N $\geq$ 3                        |        |      |
| เกณฑ์ %lon ratio $\pm$ 20% (89.98-124.05) |        |      |

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารเฮกเอสตรอลที่ระดับ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

| ลำดับ                                   | สารเฮกเอสตรอล |           |
|-----------------------------------------|---------------|-----------|
|                                         | Conc. (µg/kg) | %Recovery |
| 1                                       | 33.44         | 83.61     |
| 2                                       | 33.98         | 84.94     |
| 3                                       | 35.09         | 87.74     |
| 4                                       | 32.61         | 81.52     |
| 5                                       | 34.53         | 86.33     |
| 6                                       | 32.79         | 81.97     |
| 7                                       | 32.60         | 81.50     |
| 8                                       | 31.72         | 79.29     |
| 9                                       | 32.21         | 80.52     |
| 10                                      | 34.03         | 85.08     |
| mean                                    | 33.30         | 83.25     |
| SD                                      | 1.09          |           |
| %RSD                                    | 3.27          |           |
| เกณฑ์ %Recovery = 60-115%               |               |           |
| %RSD = 17.90% (ที่ความเข้มข้น 40 µg/kg) |               |           |

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีทดสอบสารเฮกเอสตรอล

|                                     |                                                   |                                |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| ความเข้มข้น<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร<br>(%Recovery) | เกณฑ์การยอมรับ<br>(AOAC, 2016) |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|

|       |        |          |
|-------|--------|----------|
| 40    | 73.18  | 60 - 115 |
| 500   | 106.55 | 80 - 110 |
| 1,000 | 104.28 | 80 - 110 |

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำของวิธีทดสอบสารเฮกเอสตรอล

| ความเข้มข้น<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์<br>(Repeatability, $n=10$ ) | เกณฑ์การยอมรับ<br>$\%\text{PRSD}_R$ |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 40                                  | 10.75                                                             | 17.14                               |
| 500                                 | 1.55                                                              | 11.72                               |
| 1,000                               | 4.26                                                              | 10.56                               |

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified Sample ของสารพาราควอตที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40 (LOQ), 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz ( $\%\text{PRSD}_R$ ) ดังตารางที่ 6 และจากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำของวิธีทดสอบสารเฮกเอสตรอล

| ความเข้มข้น<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์<br>(With-in Laboratory Reproducibility, $n=20$ ) | เกณฑ์การยอมรับ<br>$\%\text{PRSD}_R$ |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 40                                  | 10.21                                                                                  | 27.12                               |
| 500                                 | 3.90                                                                                   | 18.00                               |
| 1,000                               | 3.58                                                                                   | 16.00                               |

#### 5.4 ผลการทดสอบ Selectivity และ Specificity

5.4.1 จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ Sample Blank พบว่ามีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ Fortified Sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารเฮกเอสตรอล แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน Matrix ของ Sample

5.4.2 จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานสาร เฮกเอสตรอลกับ ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานสารเฮกเอสตรอล และเติมสารละลายมาตรฐานที่สงสัยจะรบกวนคือ สารไดเอทิลสตีลเบสทรอล ที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง Spike Sample พบว่าไม่พบ Peak ของสารไดเอทิลสตีลเบสทรอล ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกับสารเฮกเอสตรอล แสดงว่าสารชนิดนี้ไม่มีผลต่อวิธีทดสอบนี้

## 6. สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารสารเฮกเอสตรอลในตัวอย่างอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าผลการทดสอบ Linearity และ Working range โดยการทดสอบ Fortified sample ของสารเฮกเอสตรอลในช่วงความเข้มข้น 40 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรง โดยค่า Coefficient of determination ( $r^2$ ) ไม่น้อยกว่า 0.995 ค่า Limit of Detection (LOD) และค่า Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 15 และ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับมีค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ที่ช่วงความเข้มข้น 40 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

## 7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความคงทนของวิธีทดสอบ (Ruggedness) ความชำนาญ (Proficiency Test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-Laboratory) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการทดสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและเที่ยงยิ่งขึ้น

## 8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ส่วนบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ ที่ดำเนินงานจัดหาวัสดุอุปกรณ์ในการปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษาค้นคว้าสำเร็จ

## 9. เอกสารอ้างอิง

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

Blasco, C, Van Poucke, C., and Van Peteghem, C. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2007; 1154: 230-9.5.

EURACHEM Guide, The fitness for purpose of analytical methods, 2<sup>nd</sup> ed. (2014).

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

Schuz, J., Espina, C., Villan, P., Herrero, R., Leon, M.E., Minozzi, S., et al. European code against cancer 4<sup>th</sup> edition: 12 ways to reduce your cancer risk. Cancer Epidemiol 2015; 39(Suppl 1): S1-10.

Shao, B., Zhao, R., Meng, J., Xue, Y., Wu, G., Hu, J., et al. Simultaneous determination of residue hormoneal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Chem Acta 2005; 548: 41-50.