

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะไครลาไมซินในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

ศิริวัฒน์ รายนะสุข วรรณญา แก้วทิพย์ สุนีย์ คณาพิพัฒน์
รัชนก ทองอ่อน เสาวรี อุดมพันธ์ ภาณุพันธุ์ สว่างวงศ์

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะไครลาไมซิน ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM เตรียมตัวอย่างโดยสกัดตัวอย่างโดยการเติมโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส และอะซิโตนไตรล จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิด 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำปราศจากไอออน และ 0.1% กรดฟอร์มิกในอะซิโตนไตรล ใช้คอลัมน์ชนิด C₁₈ และสถานะของแมสสเปคโตรเมทรีแบบ ESI negative mode ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะไครลาไมซิน พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) ของสารอะไครลาไมซิน เท่ากับ 0.9975 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เท่ากับ 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารอะไครลาไมซิน ที่ระดับ 0.05, 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 92.40, 95.64 และ 98.13 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารอะไครลาไมซิน ที่ระดับ 0.05, 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 4.87, 2.44 และ 1.26 ตามลำดับ และทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของสารอะไครลาไมซิน ที่ระดับ 0.05, 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 8.95, 2.28 และ 3.02 ตามลำดับ จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสารอะไครลาไมซิน ในอาหารสัตว์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 – 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารสัตว์

คำสำคัญ : สารอะไวลาไมซิน, การตรวจสอบความใช้ได้, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Siriwat Rainasuk Warunya Kaewthip Sunee Kanapipat
Ratchanok Tong-on Saowaree Udompun Panupan Sawangwong

Abstract

In-house method for the determination of Avilamycin in animal feed with LC-MS/MS was validated according to EURACHEM Guide. The samples were extracted with Sodium sulfate anhydrous and Acetonitrile analyzed by LC-MS/MS. The analysis was carried out using the mobile phase of 0.1 % formic acid in Deionization (water) and 0.1 % formic acid in acetonitrile on a C₁₈ column and ESI negative mode of mass spectrometry condition. The results of method validation of Avilamycin were found that the calibration curve at the level 0.05 – 0.75 mg/kg were good linear; the correlation determination (r^2) of Avilamycin were 0.9975. Limit of Detection and Limit of Quantitation were 0.01 and 0.05 mg/kg, respectively. The mean % recovery of Avilamycin at the level 0.05, 0.25 and 0.75 mg/kg were 92.40, 95.64 and 98.13 respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 0.05, 0.25 and 0.75 mg/kg of Avilamycin were 4.87, 2.44 and 1.26 respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility at the level 0.05, 0.25 and 0.75 mg/kg of Avilamycin were 8.95, 2.28 and 3.02 respectively. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of Avilamycin at the level 0.05 – 0.75 mg/kg in animal feed.

Keywords : Avilamycin, method validation, animal feed

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

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะไลาไมซินในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

ศิริวัฒน์ รายนะสุข วรรณญา แก้วทิพย์ สุนีย์ คณาพิพัฒน์
รัชนก ทองอ่อน เสาวรี อุดมพันธ์ ภาณุพันธุ์ สว่างวงศ์

บทนำ

อะไลาไมซิน เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มออร์โธมัยซิน (Orthosomycin) ที่เกิดจากกระบวนการหมักของ *Streptomyces viridochromogenes* จัดอยู่ในกลุ่มที่เป็น esters ของกรด Dichlorisoevernic acid มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก ในปัจจุบันสารอะไลาไมซิน มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรขุน ไก่เนื้อ และเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากมีความสามารถในการควบคุมโรคอุจจาระร่วงของลูกสุกรหย่านมที่เกิดจากเชื้อ *Escherichia coli* ป้องกันโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Clostridium perfringens* ในไก่เนื้อ ช่วยในการดูดซึมกลูโคสในลำไส้และส่งเสริมการเจริญเติบโตในสุกรและไก่เนื้อ ทำให้มีอัตราการแลกเนื้อ (FCR) สูงขึ้น และมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์

ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนา และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะไลาไมซินในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS และเพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล จึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะไลาไมซินในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ อ้างอิงวิธีทดสอบจาก Journal of Pharmaceutical and Biomedical

Analysis 53(2010) 929-938 โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014) เพื่อแสดงว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธี และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะโวล่าไมซิน ในอาหารสัตว์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะโวล่าไมซินในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีทดสอบสารอะโวล่าไมซินในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

3.2 ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017

3.3 ใช้ในการเฝ้าระวังปัญหาเชื้อดื้อยาในระบบการผลิตสินค้าปศุสัตว์

4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

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

4.1.1 ทดสอบ Fortified sample ของสารอะโวล่าไมซิน จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05, 0.10, 0.15, 0.25, 0.50 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ของสารอะโวล่าไมซิน และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า correlation of determination (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995

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

4.2.1 ทดสอบ Fortified Sample ของสารอะไธลาไมซิน ให้มีความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของสารแต่ละชนิดจาก $LOD = 3S'_0$ 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 ของสารอะไธลาไมซิน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า Signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 และ Ion ratio ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด หากไม่ได้ ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.2.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารอะไธลาไมซิน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาประเมินความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3 การทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.3.1 ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำ (repeatability) ของวิธีทดสอบ โดยทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified sample ของสารอะไธลาไมซิน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05 (LOQ), 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำ (with-in laboratory reproducibility) ของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน ทดสอบต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน แต่ละวัน จะทำการทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified sample ของสารอะไธลาไมซิน 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.05 (LOQ), 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

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

4.3.4 ประเมินความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD_r) ของความเข้มข้นสารที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r)

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

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.3.5 ประเมินความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD_R) ของความเข้มข้นสารที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (% PRSD_R)

$$\text{สมการ Horwitz (with-in laboratory reproducibility) } \% PRSD_R = 2 C^{-0.1505}$$

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.4 การทดสอบ Selectivity และ Specificity

4.4.1 เตรียมตัวอย่าง Sample blank จำนวน 3 ขั้ว

4.4.2 เตรียมตัวอย่าง Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารอะโวลาลไมซิน ความเข้มข้นที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ขั้ว

4.4.3 เตรียมตัวอย่าง Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารอะโวลาลไมซิน ความเข้มข้นที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเติมสารละลายมาตรฐานกลุ่ม Anticoccidial Substances ซึ่งสงสัยว่าจะรบกวนการทดสอบ ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ขั้ว

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

4.4.5 เปรียบเทียบสัญญาณของ Sample blank (ข้อ 4.4.1) และ Fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารอะโวลาลไมซิน ว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใน matrix ของ Sample blank

4.4.6 เปรียบเทียบผลการทดสอบ Fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารอะโวลาลไมซิน กับ Spike sample (ข้อ 4.4.3) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารอะโวลาลไมซิน และเติมสารละลายมาตรฐานกลุ่ม Anticoccidial substances ว่าพบ Peak ของสารกลุ่ม Anticoccidial substances ที่ตำแหน่ง Retention time เดียวกันกับสารอะโวลาลไมซิน หรือไม่ หรือมี Peak ของสารกลุ่ม Anticoccidial substances รบกวน Peak ของสารอะโวลาลไมซิน หรือไม่

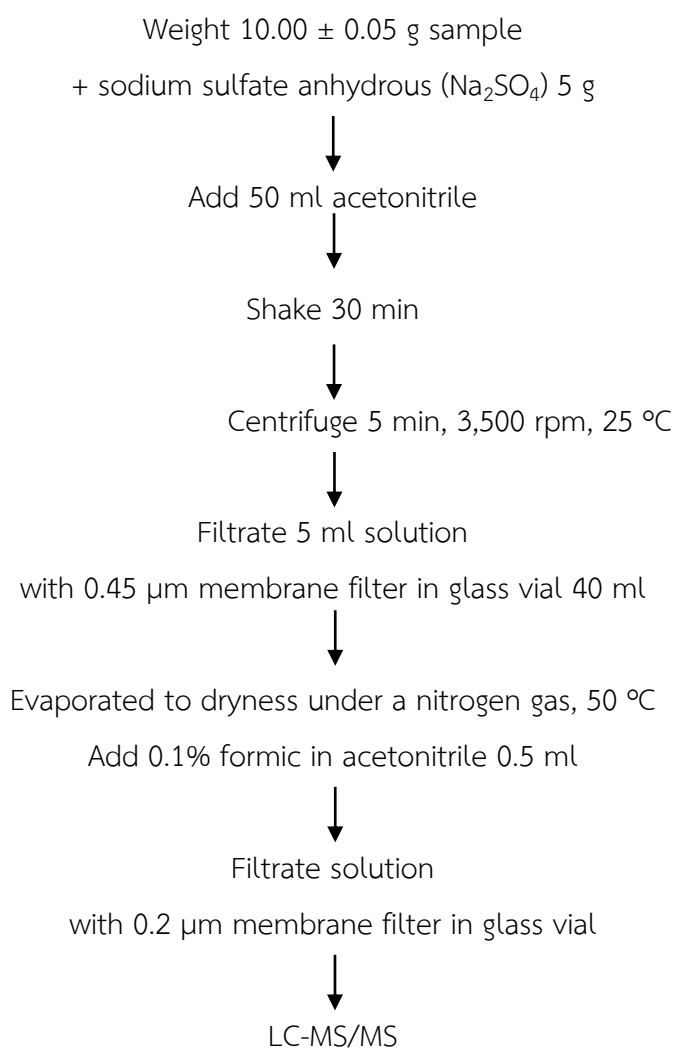
4.5 ทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (Ruggedness; major change)

4.5.1 ทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารอะไธลามะซิน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05 (LOQ), 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ชั่ว ในอาหารสุกร

4.5.2 ทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารอะไธลามะซิน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05 (LOQ), 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ชั่ว ในอาหารไก่

4.5.3 ทดสอบหาความแตกต่างทางสถิติของอาหารทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ F-test และ t-test

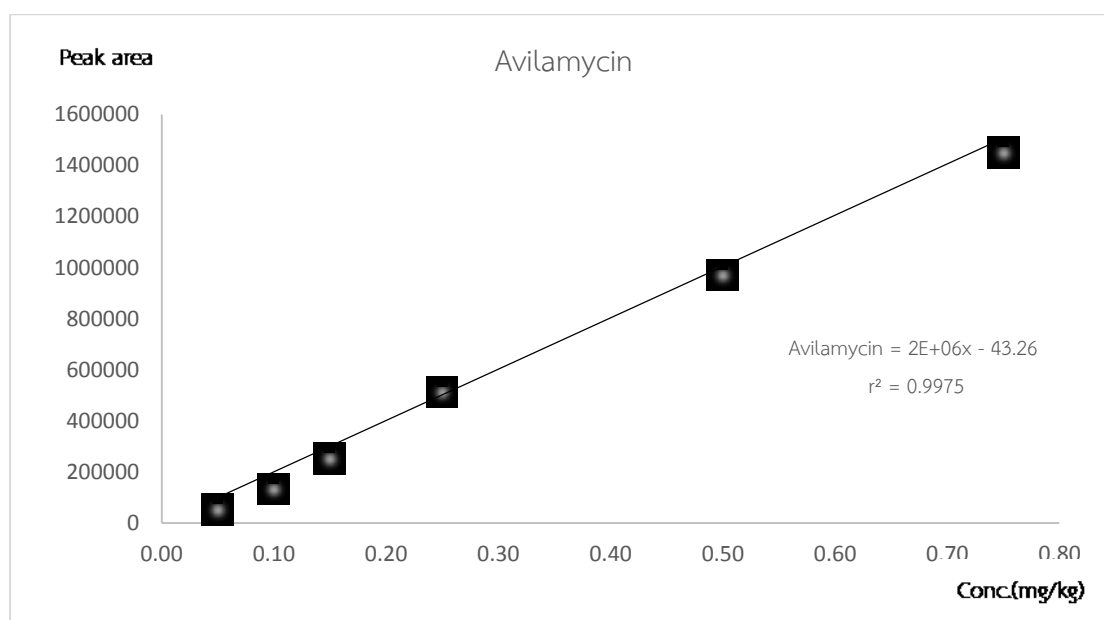
แผนผังขั้นตอนการทดสอบสารอะไธลามะซิน ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS



5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (Working range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ Fortified sample ของสารอะโวลาไมซิน ในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample และพื้นที่ใต้พีค (Peak area) ของสารอะโวลาไมซิน เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation of determination ; r^2) พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.05 – 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี เหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ที่ 0.05 – 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area ของสารอะโวลาไมซิน

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

5.2.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารอะโวลาไมซิน โดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ขั้ว คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก $LOD=3S'_0$ และ $LOQ=10S'_0$ พบว่ามีค่าดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารอะไลาไมซิน

ลำดับ	Avilamycin Conc.(mg/kg)
1	0.048
2	0.049
3	0.042
4	0.050
5	0.041
6	0.045
7	0.049
8	0.049
9	0.048
10	0.050
average	0.047
% Recovery	94.20
SD	0.003
$\sqrt{n}$	1.414
S_0'	0.002
$LOD=3S_0'$	0.007
$LOQ=10S_0'$	0.023

5.2.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) ของสารอะไลาไมซินที่ 0.007 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า $S/N < 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน พบว่ามีค่า $S/N \geq 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision ดังนั้นค่า LOD ของสารอะไลาไมซินมีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

5.2.3 ผลการยืนยันความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ) ของสารอะไลาไมซิน ที่ 0.023 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %Recovery ไม่อยู่ในช่วง 60 – 115 และ %RSD ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) จึงทำการปรับค่า LOQ ที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %Recovery อยู่ในช่วง 60 – 115 เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) และตามเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz ตามลำดับ ดังนั้นค่า LOQ ของสารอะไลาไมซิน มีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารอะไลาไมซิน ที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	LOD (0.01 mg/kg)	
	Avilamycin	
	S/N	%IR
1	588.67	69.18
2	517.67	73.14
3	501.66	76.18
4	476.91	75.93
5	626.35	77.11
6	539.10	68.88
7	712.84	68.59
8	761.58	68.60
9	519.84	74.99
10	513.15	70.67

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารอะไลาไมซิน ที่ระดับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	LOQ (0.05 mg/kg)	
	Avilamycin	
	Conc. (mg/kg)	% Recovery
1	0.043	86.00
2	0.042	84.00
3	0.044	88.00
4	0.049	98.00
5	0.044	88.00

6	0.049	98.00
7	0.039	78.00
8	0.040	80.00
9	0.049	98.00
10	0.040	80.00
mean	0.044	87.80
SD	0.004	
%RSD	8.88	
เกณฑ์ %Recovery = 60-115%, %RSD = 16.57		

5.3 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ

5.3.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารอะไธลาไมซิน 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารอะไธลาไมซิน อยู่ในช่วงตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีทดสอบ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)
0.05	60 - 115	92.40
0.25	80 - 110	95.64
0.75	80 - 110	98.13

5.3.2 จากการทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารอะไธลาไมซิน 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r) ดังตารางที่ 5 และจากการทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _R	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability, n=10)
0.05	16.57	4.87
0.25	13.01	2.44
0.75	11.02	1.26

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified sample ของ สารอะไลาไมซิน 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_R) ดังตารางที่ 6 และจากการทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _R	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (with-in laboratory reproducibility, n=20)
		Avilamycin
0.05	25.11	8.95
0.25	19.71	2.28
0.75	16.70	3.02

5.4 ผลการทดสอบ Selectivity และ Specificity

5.4.1 จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ Sample blank พบว่ามีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารอะไลาไมซิน แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน matrix ของ sample

5.4.2 จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานสารอะไลาไมซิน กับตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานสารอะไลาไมซิน และเติมสารละลายมาตรฐานที่สงสัยที่จะรบกวนคือ สารกลุ่ม Anticoccidial substances ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง Spike sample พบว่าไม่พบ peak สารกลุ่ม Anticoccidial substances ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกับสารอะไลาไมซิน แสดงว่าสารชนิดนี้ไม่มีผลต่อวิธีทดสอบนี้

5.5 ผลการทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (Ruggedness test)

จากการทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (Ruggedness test) โดยเปรียบเทียบว่าวิธีทดสอบสารอะไลาไมซิน ในตัวอย่างอาหารสุกร สามารถนำไปใช้ทดสอบในอาหารไก่ได้หรือไม่ ซึ่งเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนจากตัวอย่างอาหารสัตว์ที่

แตกต่าง (F-test) โดยเปรียบเทียบความแปรปรวนที่คำนวณได้ (F_{cal}) กับค่าแปรปรวนจากตาราง (F_{crit}) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบจากตัวอย่างอาหารสัตว์ที่แตกต่าง (t-test) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้ (t_{cal}) กับค่าเฉลี่ยจากตาราง (t_{crit}) พบว่า ความแปรปรวนจากการใช้วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($F_{cal} < F_{crit}$) จากนั้นนำผลของความแปรปรวนที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของวิธีวิเคราะห์จากตัวอย่างอาหารสุกรและอาหารไก่ พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($t_{cal} < t_{crit}$)

ดังนั้น วิธีทดสอบสารอะไลาไมซิน โดยเทคนิค LC- MS/MS สามารถใช้ในการทดสอบทั้งตัวอย่างอาหารสุกรและอาหารไก่ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงรายละเอียดผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย F-Test และ T-Test

Analyze	Conc. (mg/kg)	SD		%RSD		df ของ F-test	F_{cal}	F_{crit}	df ของ t-test	t_{cal}	t_{crit}
		อาหารสุกร	อาหารไก่	อาหารสุกร	อาหารไก่						
AVI	0.05	0.002	0.004	4.872	8.172	9,9	2.563	4.025	18	1.562	2.100
	0.25	0.006	0.005	2.442	1.995	9,9	1.475	4.025	18	0.794	2.100
	0.75	0.009	0.008	1.265	1.138	9,9	1.237	4.025	18	0.101	2.100

* df คือ degree of freedom

6. สรุปผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะไลาไมซิน ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าผลการทดสอบ Linearity และ Working range โดยการทดสอบ Fortified sample ของสารอะไลาไมซิน ในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรง โดยค่า correlation of determination (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 ค่า Limit of Detection (LOD) และค่า Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับมีค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016)

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้น วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับทดสอบสารอะไวลาไมซินในอาหารสัตว์ ที่ช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (Proficiency test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและเที่ยงยิ่งขึ้น และควรให้ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอะไวลาไมซิน สารอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อขยายขอบข่ายของวิธีทดสอบ

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสาวสุนีย์ คณา-พิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และ นางสาวภิรมภรณ์ เกื้อนถ้ำแก้ว หัวหน้ากลุ่มบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ ที่ดำเนินงานจัดหาวัสดุอุปกรณ์ ในการปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี(สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

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

Charles A. Scott, Durand W. Yordy and Mark R. Coleman. Determination of Avilamycin in Poultry Feed by Liquid Chromatography. Journal of AOAC International. Vol.82. No.3. 1999. p. 579-585

EURACHEM Guide, The fitness for purpose of analytical methods, 2nd 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.

Mark Cronly, P.Behan, B. Foley, E. Malone, S.Earley, M.Gallagher, P.Shearan and L.Regan.

Development and validation of a rapid multi-class method for the

Confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig and poultry compound feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol.53, 2010. p. 929-938