# การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน สุนันท์ กิตติจารุวัฒนา องอาจ บุญบรรลุ
ธนธรณ์ ด้วงทอง ปนัดดา เต้าชัยภูมิ

**บทคัดย่อ**

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry โดยใช้คอลัมน์ Kinetex $C_{18}$, 100 x 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.7 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Phenomenex ใช้สารละลายตัวนำพาคือ 0.1% formic acid ใน water: 0.1% formic acid ใน acetonitrile (60: 40, v/v) แบบ isocratic elution อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 2 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาในฉีดแต่ละครั้ง 5 นาที ทดสอบหาปริมาณตัวยาสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ในช่วงความเข้มข้น 50 - 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การทดสอบตัวอย่างปนเปื้อนข้ามของยา (5% drug carryover) ในช่วงความเข้มข้น 4 - 12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และการทดสอบตัวอย่างปนเปื้อนข้ามของยา (1% drug carryover) ในช่วงความเข้มข้น 0.5 – 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; *r*) เท่ากับ 0.9999, 0.9996 และ 0.9995 ตามลำดับ การทดสอบความแม่นซึ่งประเมินจากร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 99.30 – 104.08 %, 84.12 – 97.45 % และ 99.14 – 106.00 % ตามลำดับ มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 27.07, 3.06 และ 0.41 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOQ) เท่ากับ 46.96, 4.23 และ 0.53 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อนำมาใช้การทดสอบการกระจายตัวของยาในอาหารสุกรพบว่ามีค่า repeatability อยู่ในช่วง 0.75 – 5.14 %RSD, 1.29 – 7.57 %RSD และ 1.55 – 6.20 %RSD ตามลำดับ และ intermediate precision อยู่ในช่วง 2.18 – 3.29 %RSD, 4.08 – 5.44 %RSD และ 2.67 – 4.80 %RSD ตามลำดับ ดังนั้นวิธีนี้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา สามารถตรวจสอบการกระจายตัวของยาเป็นเนื้อเดียวกันและการปนเปื้อนข้ามระหว่างชุดการผลิตได้

คำสำคัญ : tiamulin อาหารสัตว์ที่ผสมยา กระจายตัวของยาเป็นเนื้อเดียวกัน การปนเปื้อนข้าม liquid chromatography-mass spectrometry

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Chusak Ardsoongnearn, Sunan Kittijaruwattana, Ongart Boonbanlu,
Thanathorn Duangthong, Panadda Taochaiyaphum

**Abstract**

This study aimed to validate a method for analyzing tiamulin in medicated animal feed using liquid chromatography-mass spectrometry. A Kinetex C18 column (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) from Phenomenex was employed. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile (60:40, v/v), with isocratic elution at a flow rate of 0.2 mL/min. The injection volume was 2 µL, and the total run time for each injection was 5 minutes. The method was validated for uniform drug distribution (homogeneity) across concentrations of 50-250 mg/kg. Furthermore, drug carryover tests were conducted at 5% (4-12 mg/kg) and 1% (0.5-2.5 mg/kg) contamination levels. The correlation coefficients (r) were 0.9999, 0.9996, and 0.9995, respectively. Accuracy, assessed by recovery rates, ranged from 99.30% to 104.08%, 84.12% to 97.45%, and 99.14% to 106.00%, respectively. Limits of detection (LOD) were 27.07, 3.06, and 0.41 mg/kg, while limits of quantification (LOQ) were 46.96, 4.23, and 0.53 mg/kg, respectively. Repeatability ranged from 0.75% to 5.14% RSD, 1.29% to 7.57% RSD, and 1.55% to 6.20% RSD, while intermediate precision ranged from 2.18% to 3.29% RSD, 4.08% to 5.44% RSD, and 2.67% to 4.80% RSD. The method demonstrated suitability for determining tiamulin in medicated feed, allowing for the assessment of drug homogeneity and cross-contamination between production batches.

Keywords: tiamulin, medicated feed, 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 เป็นต้นทุนในการเลี้ยงสัตว์ของเกษตรกรและเป็นเครื่องมือหนึ่งในการรักษาโรคที่มีผลต่อสุขภาพสัตว์ และมนุษย์ จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพยาสัตว์ที่ใช้ในประเทศที่มีวางจำหน่ายในร้านขายยาสัตว์ ตลอดจนถึงการควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่โรงงานผลิตอาหารสัตว์เพื่อการรักษาโรคสัตว์ได้ผลดีปราศจากปัญหาจากยาสัตว์ตกค้าง และช่วยชะลอปัญหาการเกิดเชื้อดื้อยาในสัตว์

ด้วยเหตุผลดังกล่าวภายใต้แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564 ยุทธศาสตร์ที่ 4 การป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยาและควบคุมกำกับดูแลการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมในภาคการเกษตรและสัตว์เลี้ยง กรมปศุสัตว์ได้มุ่งมั่นดำเนินการเพื่อให้บรรลุเป้าหมายในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะลงร้อยละ 30 รวมถึงการควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ที่ผสมยา ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการควบคุมการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยา ซึ่งมีการกำหนดหลักเกณฑ์การควบคุมคุณภาพที่สำคัญคือ ทดสอบการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีการกระจายตัวของยาอย่างสม่ำเสมอตามใบสั่งยาของสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงไม่เกิดการปนเปื้อนข้ามระหว่างชุดการผลิต ตามที่กฎหมายกำหนด เป็นการลดโอกาสเกิดสารตกค้างรวมถึงการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ซึ่งการตรวจสอบกำหนดให้ใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ homogeneity และ carryover

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

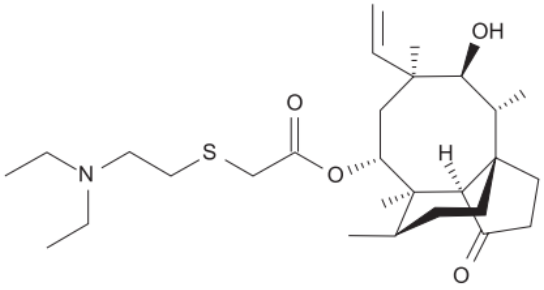


**Fig. 1.** Structure of tiamulin.

Dorota et al. (2010) ได้ทำการศึกษาการสกัดตัวอย่าง tiamulin ในรูปแบบสารผสมล่วงหน้า (premix) และอาหารสัตว์ที่ผสมยา (medicated feeding stuff) โดยสกัดตัวอย่างสารผสมล่วงหน้าด้วยน้ำ และสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาด้วย 1% sodium acetate in water และ hexane: ethyl acetate จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง กรอง และเจือจางด้วย 1% tartaric acid solution ก่อนนำไปฉีดผ่านคอลัมน์ C18, 4.6 x 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร ใช้ mobile phase

เป็น methanol: acetonitrile: 1% ammonium carbonate ที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร และนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) จากการทดสอบพบว่า รูปร่างของโครมาโตแกรมที่ดีที่สุดจากการทดสอบจะใช้อัตราส่วน mobile phase 50:25:25 pH ของ ammonium carbonate เท่ากับ 9.1 มีค่าความเป็นเส้นตรง ($r^2$) เท่ากับ 0.9999 ในช่วงความเข้มข้น 0.02 - 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) เท่ากับ 93% และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1.5%

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

จากการพัฒนาวิธีทดสอบ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ปี 2565 ซึ่งใช้คอลัมน์ Phenomenex, Kinetex $C_{18}$, 2.6 ไมโครเมตร ขนาด 150 × 3.0 มิลลิเมตร อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณการฉีด 5 ไมโครลิตร ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่คือ 0.1% formic acid ใน water และ 0.1% formic acid ใน acetonitrile (60 : 40, v/v) ในแบบ isocratic elution สามารถชะสาร tiamulin ได้ภายใน 10 นาที ทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นช่วงความเข้มข้น 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) ที่ 0.9982 ศึกษา matrix effect พบว่ามีการเกิดสัญญาณของสารที่ทดสอบลดลง ในการพัฒนาวิธีการสกัดโดยแปรชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตรสารละลาย ระยะเวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง พบว่าการใช้ 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ระยะเวลา 20 นาที ทำการสกัด 3 รอบ เป็นวิธีการสกัดที่เหมาะสม ในขั้นตอนถัดไปจึงทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของ Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures for Type C Medicated Feeds (2005) ในหัวข้อ specificity, linearity, range, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantitation และ robustness/ruggedness

**1. วัตถุประสงค์**

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ tiamulin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography - mass spectrometry สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover)

**2. ขอบข่าย**

ใช้สำหรับตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ tiamulin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่ช่วงระดับความเข้มข้น 50 - 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ความเข้มข้นในช่วง 4 - 12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (5% drug carryover) และความเข้มข้นในช่วง 0.5 – 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (1% drug carryover)

**3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้วิธีที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ tiamulin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

**4. วิธีดำเนินการ**

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo รุ่น TSQ plus

4.1.2 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ ยี่ห้อ Thermo รุ่น Lab Tower EDI 30

4.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XP205DR

4.1.4 เครื่องบดตัวอย่าง ยี่ห้อ FRITSCH รุ่น PULVERISETTE 6

4.1.5 เครื่องเขย่าแนวตั้ง ยี่ห้อ Yamato รุ่น SA 31

4.1.6 ตู้ดูดควัน (fume hood)

4.1.7 Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร

4.1.8 Volumetric flask ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร

4.1.9 Volumetric pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร

4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

4.2.1 Acetonitrile, LC grade

4.2.2 Formic acid, LCMS grade

4.2.3 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ.cm (น้ำ DI)

4.2.4 LC-column ยี่ห้อ Phenomenex Kinetex 1.7 ไมโครเมตร C18 ขนาด 100 × 2.1 มิลลิเมตร

4.3 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน tiamulin ยี่ห้อ TRC

4.4 ขั้นตอนการทดลอง

4.4.1 Condition ของ LC และ m/z ที่ใช้ในการทดสอบ

**Table 1.** LC condition.

| Parameters | Value |
|---|---|
| Column: | Phenomenex, Kinetex 1.7 µm C18 100 x 2.1 mm |
| Mobile phase: | 0.1%FA in water: 0.1%FA in Acetonitrile (60:40, v/v) |
| Flow rate: | 0.2 mL/min |
| Column temperature: | 40 °C |
| Sample temperature: | 25 °C |
| Injection volume: | 2 µL |
| End time | 5 min |

**Table 2.** H-ESI parameters.

| Parameters | Value |
|---|---|
| Positive Ion (V) | 3500 |
| Sheath Gas (Arb) | 50 |
| Aux Gas (Arb) | 10 |
| Sweep Gas (Arb) | 1 |
| Ion Transfer Tube Temp (°C) | 325 |
| Vaporizer Temp (°C) | 300 |
| CID gas (mTorr) | 1.5 |

**Table 3**. MS detection.

| Compounds | Precursor ions (m/z) | Product ions (m/z) | Collision Energy (V) | RF Lens (V) | Dwell Time (ms) |
|---|---|---|---|---|---|
| Tiamulin | 494.3 | 192.0 | 16.9 | 180 | 118.986 |
| | 494.3 | 119.0 | 23.20 | 180 | 118.986 |

4.4.2 การเตรียม mobile phase

4.4.2.1 Mobile phase A: 0.1% formic acid in di water: เตรียมโดยใช้ cylinder ขนาด 500 มิลลิลิตร ตวง di water ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิเปต formic acid 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกันกับ di water ด้วย กรองผ่าน cellulose acetate filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารละลายใส่ใน laboratory bottle ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไป degas

4.4.2.2 Mobile phase B: 0.1% formic acid in acetonitrile: เตรียมโดยใช้ cylinder ขนาด 500 มิลลิลิตร ตวง acetonitrile ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิเปต formic acid 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกันกับ acetonitrile ด้วย กรองผ่าน PTFE filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารละลายใส่ใน laboratory bottle ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไป degas

4.4.3 การเตรียม standard calibration curve solution สำหรับทดสอบ matrix effect

4.4.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน tiamulin ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน tiamulin ประมาณ 50 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water

4.4.3.2 การเตรียม standard calibration curve solution level 1 ความเข้มข้น 0.013 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม: ปิเปต standard solution ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.05 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 0.013 มิลลิกรัมต่อลิตร)

4.4.3.3 การเตรียม standard calibration curve solution level 2 ความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม: ปิเปต standard solution ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร)

4.4.3.4 การเตรียม standard calibration curve solution level 3 ความเข้มข้น 0.038 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม: ปิเปต standard solution ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.15 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 3.75 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 0.038 มิลลิกรัมต่อลิตร)

4.4.3.5 การเตรียม standard calibration curve solution level 4 ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม: ปิเปต standard solution ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.2 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร)

4.4.3.6 การเตรียม standard calibration curve solution level 5 ความเข้มข้น 0.063 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม: ปิเปต standard solution ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.25 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water (ความเข้มข้น 0.063 มิลลิกรัมต่อลิตร)

4.4.4 การเตรียม triturated matrix-fortified calibration curve สำหรับทดสอบ homogeneity, 5% drug carryover และ 1% drug carryover

4.4.4.1 ชั่งตัวอย่างอาหารสุกรที่ทำการตรวจสอบแล้วไม่พบ tiamulin (blank sample) ประมาณ 200 กรัม

4.4.4.2 บดตัวอย่างด้วยเครื่องบดตัวอย่างยี่ห้อ FRITSCH สำหรับเตรียม matrix-fortified solid reference standard ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยบดครั้งละประมาณ 100 กรัม ความเร็วของจานหมุน 400 รอบต่อนาที ใช้เวลาครั้งละ 5 นาที รวมตัวอย่างประมาณ 200 กรัม

4.4.4.3 การเตรียม matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ homogeneity (25 กรัม)

ขั้นตอนที่ 1 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วจากข้อ 4.4.4.2 ปริมาณ 24.969 ± 0.010 กรัม

ขั้นตอนที่ 2 ตักแบ่งลงใน mortar ประมาณ 4 เท่าของสารมาตรฐาน tiamulin 0.03 กรัม

ขั้นตอนที่ 3 ชั่งสารมาตรฐานให้ได้ tiamulin ประมาณ 31.3 มิลลิกรัม (น้ำหนักที่ชั่งต้องไม่ต่ำกว่า minimum weight และบันทึกน้ำหนักจริง) ค่อยๆ เทลงไปบดผสมกับอาหารสัตว์ที่บดแล้วใน mortar เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 4 ตักตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วจากขั้นตอนที่ 1 อีกประมาณ 4 เท่าของน้ำหนักรวมตัวอย่างของขั้นตอนที่ 3 ค่อยๆ เทลงไปใน mortar บดผสมเป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 5 แบ่งตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 1 ใส่ในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ประมาณ 10 กรัม และนำตัวอย่างที่บดผสมแล้วจากขั้นตอนที่ 4 ค่อยๆ เทใส่ในถุงพลาสติกให้หมด รัดถุงพลาสติกให้สนิทโดยให้มีอากาศอยู่ด้านใน ค่อยๆ ผสมตัวอย่างในถุงพลาสติกและหมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 6 นำตัวอย่างที่เหลืออยู่ในขั้นตอนที่ 1 มา rinse ตัวอย่างภายใน mortar โดยแบ่งตัวอย่างสำหรับ rinse 3 รอบ ใส่ใน mortar บดผสมให้ทั่วภายใน mortar แล้วเทใส่ในถุงพลาสติกรวมกัน หมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ทำการ rinse mortar อีก 2 รอบ จากนั้นผสมตัวอย่างทั้งหมด หมุนทุกทิศทางเป็นครั้งสุดท้ายให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที (25 กรัม)

ขั้นตอนที่ 7 นำ matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไปเตรียม matrix-fortified calibration curve ตาม Table 4.

4.4.4.4 การเตรียม matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ 5% drug carryover (60 กรัม)

ขั้นตอนที่ 1 ชั่ง matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 1.2 กรัม ลงใน mortar

ขั้นตอนที่ 2 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้ว 58.8 กรัม ตักแบ่งลงใน mortar ประมาณ 4 เท่าของตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 1 ค่อยๆ เทลงไปใน mortar บดผสมเป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 3 ตักตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วจากขั้นตอนที่ 2 ใส่ในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ให้หมด รัดถุงพลาสติกให้สนิทโดยให้มีอากาศอยู่ด้านใน ค่อยๆ ผสมตัวอย่างในถุงพลาสติกและหมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 4 นำตัวอย่างที่เหลืออยู่ในขั้นตอนที่ 2 มา rinse ตัวอย่างภายใน mortar โดยแบ่งตัวอย่างสำหรับ rinse 3 รอบ ใส่ใน mortar บดผสมให้ทั่วภายใน mortar แล้วเทใส่ในถุงพลาสติกรวมกัน หมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ทำการ rinse mortar อีก 2 รอบ จากนั้นผสมตัวอย่างทั้งหมด หมุนทุกทิศทางเป็นครั้งสุดท้ายให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที (60 กรัม)

ขั้นตอนที่ 5 นำ matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไปเตรียม matrix-fortified calibration curve ตาม Table 5.

4.4.4.5 การเตรียม matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ 1% drug carryover (50 กรัม)

ขั้นตอนที่ 1 ชั่ง matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 12.5 กรัม ลงใน mortar

ขั้นตอนที่ 2 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้ว 37.5 กรัม ตักแบ่งลงใน mortar ประมาณ 4 เท่าของตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 1 ค่อยๆ เทลงไปใน mortar บดผสมเป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 3 ตักตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดแล้วจากขั้นตอนที่ 2 ใส่ในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ให้หมด รัดถุงพลาสติกให้สนิทโดยให้มีอากาศอยู่ด้านใน ค่อยๆ ผสมตัวอย่างในถุงพลาสติกและหมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 4 นำตัวอย่างที่เหลืออยู่ในขั้นตอนที่ 2 มา rinse ตัวอย่างภายใน mortar โดยแบ่งตัวอย่างสำหรับ rinse 3 รอบ ใส่ใน mortar บดผสมให้ทั่วภายใน mortar แล้วเทใส่ในถุงพลาสติกรวมกัน หมุนทุกทิศทางให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ทำการ rinse mortar อีก 2 รอบ จากนั้นผสมตัวอย่างทั้งหมด หมุนทุกทิศทางเป็นครั้งสุดท้ายให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที (50 กรัม)

ขั้นตอนที่ 5 นำ matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไปเตรียม matrix-fortified calibration curve ตาม Table 6.

**Table 4**. Matrix-fortified calibration curve for homogeneity.

| Level | blank sample (g) | 1,000 mg/kg tiamulin addition (g) | final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1 | 19 | 1 | 50 |
| 2 | 18 | 2 | 100 |
| 3 | 17 | 3 | 150 |
| 4 | 16 | 4 | 200 |
| 5 | 15 | 5 | 250 |

**Table 5**. Matrix-fortified calibration curve for 5% drug carryover.

| Level | blank sample (g) | 20 mg/kg tiamulin addition (g) | final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1 | 8 | 2 | 4 |
| 2 | 7 | 3 | 6 |
| 3 | 6 | 4 | 8 |
| 4 | 5 | 5 | 10 |
| 5 | 4 | 6 | 12 |

**Table 6**. Matrix-fortified calibration curve for 1% drug carryover.

| Level | blank sample (g) | 5 mg/kg tiamulin addition (g) | final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1 | 9 | 1 | 0.5 |
| 2 | 8 | 2 | 1 |
| 3 | 7 | 3 | 1.5 |
| 4 | 6 | 4 | 2 |
| 5 | 5 | 5 | 2.5 |

**Table 7**. Sample preparation.

| ลำดับที่ | Homogeneity | 5% Drug carryover | 1% Drug carryover |
|---|---|---|---|
| 1 | ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม | ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม | ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม |
| 2 | เติม 1% sodium carbonate 10 mL | เติม 1% sodium carbonate 10 mL | เติม 1% sodium carbonate 10 mL |
| 3 | เติม Hexane : Ethyl acetate (3:1,v/v) 10 mL | เติม Hexane : Ethyl acetate (3:1,v/v) 10 mL | เติม Hexane : Ethyl acetate (3:1,v/v) 10 mL |
| 4 | เขย่าแนวตั้ง 60 นาที (speed 9) | เขย่าแนวตั้ง 60 นาที (speed 9) | เขย่าแนวตั้ง 60 นาที (speed 9) |
| 5 | Centrifuge 5000 rpm 10 °C 15 min | Centrifuge 5000 rpm 10 °C 15 min | Centrifuge 5000 rpm 10 °C 15 min |
| 6 | ดูดส่วนใสด้านบนลง tube นำไประเหยแห้งด้วย TurboVap ที่ 40 °C | ดูดส่วนใสด้านบนลง tube นำไประเหยแห้งด้วย TurboVap ที่ 40 °C | ดูดส่วนใสด้านบนลง tube นำไประเหยแห้งด้วย TurboVap ที่ 40 °C |
| 7 | ทำตามข้อ 3-6 อีกรอบ | ทำตามข้อ 3-6 อีกรอบ | ทำตามข้อ 3-6 อีกรอบ |
| 8 | เติม 0.1% tartaric acid in water 10 mL ลงใน tube | เติม 0.1% tartaric acid in water 10 mL ลงใน tube | เติม 0.1% tartaric acid in water 10 mL ลงใน tube |
| 9 | Vortex 30 วินาที | Vortex 30 วินาที | Vortex 30 วินาที |
| 10 | Sonicate 5 นาที | Sonicate 5 นาที | Sonicate 5 นาที |
| 11 | ปิเปต 1 mL ลงใน volumetric flask 50 mL ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water | ปิเปต 1 mL ลงใน volumetric flask 100 mL ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water | ปิเปต 1 mL ลงใน volumetric flask 25 mL ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water |
| 12 | ปิเปต 1 mL ลงใน volumetric flask 25 mL ปรับปริมาตรด้วย 0.1% tartaric acid in water | กรองด้วย nylon filter ขนาด 0.2 um | กรองด้วย nylon filter ขนาด 0.2 um |
| 13 | กรองด้วย nylon filter ขนาด 0.2 um | - | - |
| 14 | ฉีดเข้าเครื่อง UHPLC-MS/MS | ฉีดเข้าเครื่อง UHPLC-MS/MS | ฉีดเข้าเครื่อง UHPLC-MS/MS |

4.4.5 ขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)

4.4.5.1 ศึกษาช่วงของการทดสอบ (linearity and working range) โดยเตรียม matrix-fortified calibration curve ด้วยเทคนิค trituration ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50 - 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ตาม Table 4 ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 4 - 12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (4, 6, 8, 10 และ 12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับทดสอบ 5% drug carryover ตาม Table 5 และให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5 – 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับทดสอบ 1% drug carryover ตาม Table 6 เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 injection นำค่า ion ratio ของพื้นที่ใต้พีคระหว่าง analyte/internal standard และความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (*r*) เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005)

4.4.5.2 ศึกษา accuracy โดยการเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ตาม Table 8 ความเข้มข้น 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %5 drug carryover ตาม Table 9 และความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %1 drug carryover ตาม Table 10 โดยเตรียมความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ฉีดซ้ำละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % recovery homogeneity อยู่ในช่วง 90 - 107% และ drug carryover อยู่ในช่วง 80 - 110 (AOAC, 2019)

**Table 8.** The preparation of matrix-fortified sample for testing of homogeneity.

| Level | Blank sample (g) | 1000 mg/kg tiamulin addition (g) | Final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1 | 36 | 4 | 100 |
| 2 | 34 | 6 | 150 |
| 3 | 32 | 8 | 200 |

**Table 9.** The preparation of matrix-fortified sample for testing of 5% drug carryover.

| Level | Blank sample (g) | 20 mg/kg tiamulin addition (g) | Final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1 | 28 | 12 | 6 |
| 2 | 24 | 16 | 8 |
| 3 | 20 | 20 | 10 |

**Table 10.** The preparation of matrix-fortified sample for testing of 1% drug carryover.

| Level | Blank sample (g) | 5 mg/kg tiamulin addition (g) | Final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1 | 32 | 8 | 1 |
| 2 | 28 | 12 | 1.5 |
| 3 | 24 | 16 | 2 |

4.4.5.3 ศึกษา precision โดยการเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ความเข้มข้น 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %5 drug carryover และความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ 1% drug carryover ตาม Table 8 - 10 โดยเตรียมความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ฉีดซ้ำละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ homogeneity %RSD ≤ 4.8 และ drug carryover ≤ 11 (AOAC, 2019)

4.4.5.4 ศึกษา limit of detection (LOD) โดยเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %5 drug carryover และความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %1 drug carryover ตาม Table 11 ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เกณฑ์การทดสอบ signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 (FDA, 2005)

**Table 11.** The preparation of LOD testing samples for homogeneity and drug carryover study.

| Sample | Tiamulin concentration (mg/kg) | Blank sample (g) | Addition (g) | Final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|---|
| Homogeneity | 1000 | 19.6 | 0.4 | 20 |
| 5% drug carryover | 20 | 18 | 2 | 2 |
| 1% drug carryover | 5 | 19 | 1 | 0.25 |

4.4.5.5 ศึกษา limit of quantitation (LOQ) โดยเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ homogeneity ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %5 drug carryover และ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ 1% drug carryover ตาม Table 14 ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เกณฑ์การทดสอบ signal to noise ratio (S/N) ≥ 10 (FDA, 2005)

**Table 12.** The preparation of LOQ testing samples for homogeneity and drug carryover study.

| Sample | Tiamulin concentration (mg/kg) | Blank sample (g) | Addition (g) | Final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|---|
| Homogeneity | 1,000 | 19 | 1 | 50 |
| 5% drug carryover | 20 | 8 | 2 | 4 |
| 1% drug carryover | 5 | 9 | 1 | 0.5 |

4.4.5.6 การศึกษาความจำเพาะ/ความสามารถในการแยกสาร (specificity/selectivity) โดยการเติมสารที่คาดว่าจะก่อสัญญาณรบกวน ได้แก่ salinomycin, monensin, amoxicillin และ ampicillin เติมลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ tiamulin ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 5 กรัม ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ตาม Table 13

**Table 13.** The preparation of specificity and selectivity testing samples

| Blank sample (g) | 1,000 mg/kg Amoxicillin addition (g) | Final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|
| 20 | 3 | 150 |

4.4.5.7 การศึกษา robustness โดยการทดสอบความคงทนของวิธีว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบเพียงเล็กน้อยแล้วจะยังให้ผลการทดสอบเหมือนเดิมโดยเตรียมตัวอย่างตาม Table 14 สกัดตัวอย่าง Table 7 วิธี homogeneity และวางแผนการทดสอบตามวิธีของ Youden's test ตาม Table 15 - 16 เตรียมจำนวน 2 ซ้ำ ๆ ละ 1 injection

**Table 14.** The preparation of robustness testing samples.

| Tiamulin concentration (mg/kg) | Blank sample (g) | Addition (g) | Final concentration (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1000 | 120 | 30 | 150 |

**Table 15**. Factors and levels investigated in the robustness test.

| Factor | Parameter | Nominal condition | High value (+) | Low value (-) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | ปริมาตรการเติม 1% sodium carbonate (mL) | 10 mL | 12 mL (A) | 8 mL (a) |
| 2 | ความเข้มข้นของ sodium carbonate (%) | 1% | 1.2 % (B) | 0.8 % (b) |
| 3 | ปริมาตรการเติม hexane : ethyl acetate (3:1,v/v) | 10 mL | 12 mL (C) | 8 mL (c) |
| 4 | เวลาในการเขย่า (นาที) | 60 นาที | 65 นาที (D) | 55 นาที (d) |
| 5 | เวลาในการ centrifuge (นาที) | 15 นาที | 20 นาที (E) | 10 นาที (e) |
| 6 | ความเร็วรอบของ centrifuge (rpm) | 5,000 rpm | 5,500 rpm (F) | 4,500 rpm (f) |
| 7 | อุณหภูมิใน chamber ของ centrifuge (°C) | 10 °C | 12 °C (G) | 8 °C (g) |

**Table 16**. The selected Youden's test design.

| Factor | Parameter factorial combination | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | การทดลองที่ 1 | การทดลองที่ 2 | การทดลองที่ 3 | การทดลองที่ 4 | การทดลองที่ 5 | การทดลองที่ 6 | การทดลองที่ 7 | การทดลองที่ 8 |
| 1 | A | A | A | A | a | a | a | a |
| 2 | B | B | b | b | B | B | b | b |
| 3 | C | c | C | c | C | c | C | c |
| 4 | D | D | d | d | d | d | D | D |
| 5 | E | e | E | e | e | E | e | E |
| 6 | F | f | f | F | F | f | f | F |
| 7 | G | g | g | G | g | G | G | g |
| **Result** | **s** | **t** | **u** | **v** | **w** | **x** | **y** | **z** |

คำนวณอิทธิพลของตัวแปรแต่ละตัว

$$\text{“A - a”} = \left(\frac{s + t + u + v}{4}\right) - \left(\frac{w + x + y + z}{4}\right)$$

$$\text{“B - b”} = \left(\frac{s + t + w + x}{4}\right) - \left(\frac{u + x + y + z}{4}\right)$$

.

.

$$\text{“G - g”} = \left(\frac{s + v + x + y}{4}\right) - \left(\frac{t + u + w + z}{4}\right)$$

คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) ของผลต่างทั้งหมด 7 ค่า เกณฑ์การยอมรับ $\sqrt{2} * s$

ถ้า [A-a].....[G-g] > $\sqrt{2} * s$ หมายความว่า การปรับเปลี่ยนมีผลต่อความทนของวิธีทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ถ้า [A-a].....[G-g] < $\sqrt{2} * s$ หมายความว่า การปรับเปลี่ยนไม่มีผลต่อวิธีทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.4.6 ศึกษา matrix effect ของการทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity, 5% drug carryover และ 1% drug carryover โดยการเตรียม matrix-fortified calibration curve ตาม Table 4 – 6 นำตัวอย่างไปสกัดตาม Table 7 และเตรียม standard solution calibration curve ตามข้อ 4.4.3 จากนั้นคำนวณหา matrix effect โดยใช้สูตร

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

**5. ผลการทดลอง**

5.1 ผลการศึกษาช่วงของการทดสอบ (linearity and working range) โดยเตรียม matrix-fortified calibration curve ด้วยเทคนิค trituration ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50 - 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 4 - 12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ 5% drug carryover และความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5 – 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ 1% drug carryover ตาม Table 17 - 20 และ Fig. 2 – 4

**Table 17.** Linearity and working range of tiamulin.

| Parameters | Homogeneity | 5% drug carryover | 1% drug carryover |
|---|---|---|---|
| Slope | 188.7 | 2353.6 | 8492.1 |
| Intercept | -19.6 | -1444.2 | 461.4 |
| *r* | 0.9999 | 0.9996 | 0.9995 |

จากผลการศึกษา linearity and working range ของการทดสอบ homogeneity, 5% drug carryover และ 1% drug carryover พบว่ามีค่า *r* เท่ากับ 0.9999, 0.9996 และ 0.9995 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005) ตาม Table 17 และ Fig. 2 - 4

**Table 18.** Linearity and working range of tiamulin (homogeneity).

| No. | Concentration (mg/kg) | | | | | % Recovery | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 50 mg/kg | 100 mg/kg | 150 mg/kg | 200 mg/kg | 250 mg/kg |
| 1 | 51 | 100 | 153 | 204 | 255 | 102 | 100 | 102 | 102 | 102 |
| 2 | 51 | 101 | 151 | 202 | 252 | 101 | 101 | 101 | 101 | 101 |
| 3 | 50 | 100 | 150 | 201 | 251 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| **Mean** | **50.50** | **100.33** | **151.50** | **202.08** | **252.58** | **101.00** | **100.33** | **101.00** | **101.04** | **101.03** |
| **SD** | **0.50** | **0.63** | **1.39** | **1.77** | **2.27** | **1.00** | **0.63** | **0.93** | **0.89** | **0.91** |
| **%RSD** | **0.99** | **0.63** | **0.92** | **0.88** | **0.90** | **0.99** | **0.63** | **0.92** | **0.88** | **0.90** |

จากผลการศึกษา linearity and working range ของการทดสอบ homogeneity ทดสอบ accuracy และ precision ตลอดช่วงของ linearity and working range พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 100.33-101.04% และ %RSD อยู่ในช่วง 0.63-0.99 ตาม Table 18

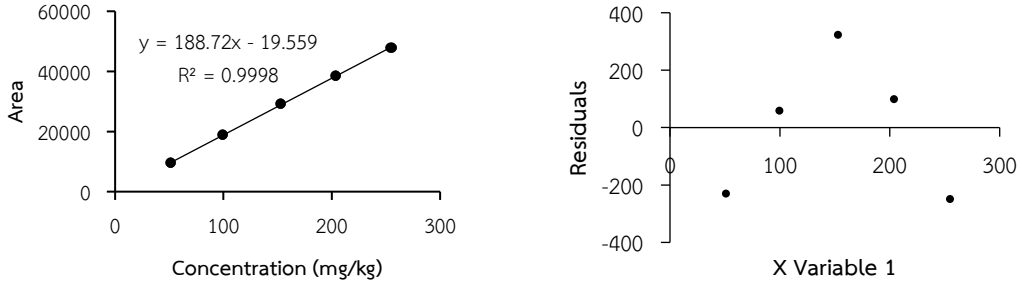


**Fig. 2.** Linearity and working range of matrix-fortified calibration curve of tiamulin (homogeneity).

**Table 19.** Linearity and working range of tiamulin (5% drug carryover).

| No. | Concentration (mg/kg) | | | | | % Recovery | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 4 mg/kg | 6 mg/kg | 8 mg/kg | 10 mg/kg | 12 mg/kg |
| 1 | 3.98 | 5.98 | 7.98 | 9.98 | 11.96 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 4.04 | 6.06 | 8.08 | 10.08 | 12.10 | 101 | 101 | 101 | 101 | 101 |
| 3 | 4.04 | 6.06 | 8.08 | 10.08 | 12.10 | 101 | 101 | 101 | 101 | 101 |
| **Mean** | 4.02 | 6.03 | 8.05 | 10.05 | 12.05 | 100.50 | 100.56 | 100.58 | 100.47 | 100.44 |
| **SD** | 0.03 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.08 | 0.87 | 0.77 | 0.72 | 0.58 | 0.67 |
| **%RSD** | 0.86 | 0.77 | 0.72 | 0.57 | 0.67 | 0.86 | 0.77 | 0.72 | 0.57 | 0.67 |

จากผลการศึกษา linearity and working range ของการทดสอบ 5% drug carryover ทดสอบ accuracy และ precision ตลอดช่วงของ linearity and working range พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 100.44-100.58% และ %RSD อยู่ในช่วง 0.57-0.86 ตาม Table 19

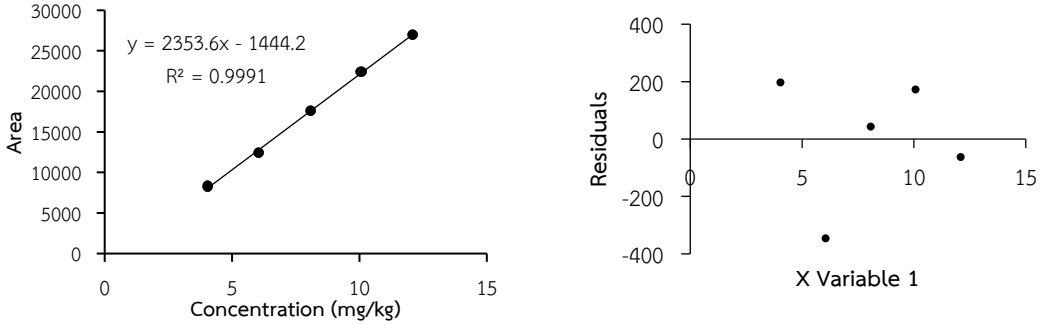


**Fig. 3.** Linearity and working range of matrix-fortified calibration curve of tiamulin (5% drug carryover).

**Table 20.** Linearity and working range of amoxicillin (1% drug carryover).

| No. | Concentration (mg/kg) | | | | | % Recovery | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 0.5 mg/kg | 1 mg/kg | 1.5 mg/kg | 2 mg/kg | 2.5 mg/kg |
| 1 | 0.51 | 1.02 | 1.53 | 2.04 | 2.55 | 102 | 102 | 102 | 102 | 102 |
| 2 | 0.51 | 1.01 | 1.52 | 2.02 | 2.53 | 101 | 101 | 101 | 101 | 101 |
| 3 | 0.51 | 1.01 | 1.51 | 2.02 | 2.52 | 101 | 101 | 101 | 101 | 101 |
| **Mean** | 0.51 | 1.01 | 1.52 | 2.03 | 2.53 | 101.33 | 101.17 | 101.22 | 101.25 | 101.20 |
| **SD** | 0.003 | 0.008 | 0.01 | 0.013 | 0.018 | 0.58 | 0.76 | 0.69 | 0.66 | 0.72 |
| **%RSD** | 0.57 | 0.75 | 0.69 | 0.65 | 0.71 | 0.57 | 0.75 | 0.69 | 0.65 | 0.71 |

จากผลการศึกษา linearity and working range ของการทดสอบ 1% drug carryover ทดสอบ accuracy และ precision ตลอดช่วงของ linearity and working range พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 101.17-101.33% และ %RSD อยู่ในช่วง 0.57-0.75 ตาม Table 20

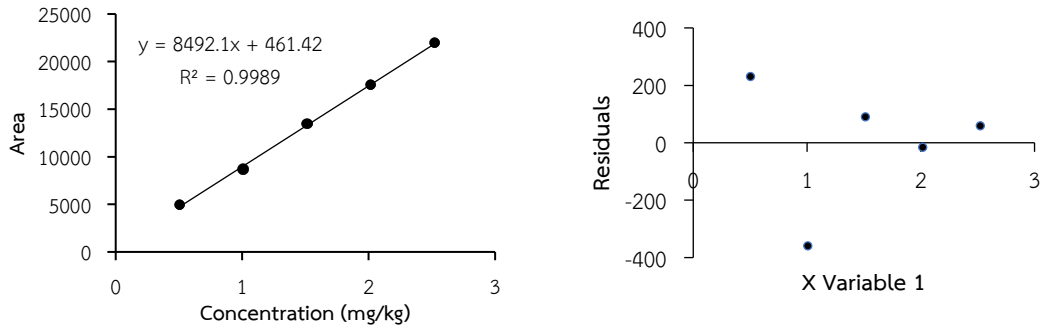


**Fig. 4.** Linearity and working range of matrix-fortified calibration curve of tiamulin (1% drug carryover).

5.2 ผลศึกษา accuracy โดยการเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ตาม Table 21 ความเข้มข้น 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %5 drug carryover ตาม Table 22 และความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %1 drug carryover ตาม Table 23

**Table 21.** Accuracy of tiamulin LC analysis (homogeneity).

| No. | Day 1 | | | Day 2 | | | Day 3 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 100 mg/kg | 150 mg/kg | 200 mg/kg | 100 mg/kg | 150 mg/kg | 200 mg/kg | 100 mg/kg | 150 mg/kg | 200 mg/kg |
| 1 | 103.90 | 161.92 | 198.53 | 105.13 | 153.95 | 202.13 | 101.79 | 151.60 | 204.53 |
| 2 | 104.36 | 160.19 | 198.15 | 105.09 | 155.92 | 203.92 | 103.57 | 156.83 | 205.56 |
| 3 | 91.48 | 155.18 | 205.92 | 105.18 | 154.75 | 203.08 | 103.57 | 153.94 | 206.47 |
| 4 | 95.75 | 147.40 | 182.72 | 105.46 | 156.54 | 201.59 | 105.40 | 156.27 | 205.31 |
| 5 | 103.12 | 150.82 | 208.30 | 103.43 | 153.22 | 204.08 | 104.94 | 148.50 | 198.51 |
| 6 | 104.41 | 155.41 | 206.07 | 101.45 | 151.15 | 204.22 | 104.72 | 155.04 | 203.82 |
| 7 | 103.79 | 153.65 | 190.57 | 102.30 | 154.81 | 206.24 | 104.58 | 154.99 | 205.27 |
| **Mean** | 100.97 | 154.94 | 198.61 | 104.01 | 154.33 | 203.61 | 104.08 | 153.88 | 204.21 |
| **SD** | 5.19 | 5.03 | 9.31 | 1.62 | 1.79 | 1.54 | 1.22 | 2.92 | 2.65 |
| **RSD** | 5.14 | 3.25 | 4.69 | 1.56 | 1.16 | 0.75 | 1.17 | 1.90 | 1.30 |
| **%Recovery** | 100.97 | 103.29 | 99.30 | 104.01 | 102.89 | 101.80 | 104.08 | 102.59 | 102.11 |

จาก Table 21 พบว่า % recovery ของ tiamulin สำหรับทดสอบ homogeneity มีค่าอยู่ในช่วง 99.30 – 104.08 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ %recovery 90 - 107% (AOAC, 2019)

**Table 22.** Accuracy of tiamulin LC analysis (5% drug carryover).

| No. | Day 1 | | | Day 2 | | | Day 3 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 6 mg/kg | 8 mg/kg | 10 mg/kg | 6 mg/kg | 8 mg/kg | 10 mg/kg | 6 mg/kg | 8 mg/kg | 10 mg/kg |
| 1 | 4.82 | 7.11 | 9.77 | 5.18 | 7.37 | 9.34 | 5.29 | 8.12 | 8.75 |
| 2 | 4.84 | 7.65 | 9.78 | 5.17 | 7.66 | 9.09 | 5.26 | 8.07 | 8.33 |
| 3 | 5.65 | 7.50 | 9.61 | 5.01 | 7.54 | 8.73 | 5.40 | 8.05 | 9.11 |
| 4 | 5.27 | 7.71 | 8.97 | 5.04 | 7.49 | 8.75 | 5.21 | 8.18 | 9.99 |
| 5 | 5.23 | 6.93 | 8.37 | 5.02 | 7.61 | 8.67 | 5.21 | 8.26 | 9.48 |
| 6 | 4.89 | 7.49 | 8.52 | 4.91 | 7.62 | 8.83 | 5.47 | 6.82 | 9.40 |
| 7 | 5.23 | 8.13 | 9.09 | 5.00 | 7.55 | 8.64 | 5.21 | 7.07 | 9.51 |
| **Mean** | 5.13 | 7.50 | 9.16 | 5.05 | 7.55 | 8.86 | 5.29 | 7.80 | 9.22 |
| **SD** | 0.30 | 0.40 | 0.58 | 0.10 | 0.10 | 0.26 | 0.10 | 0.59 | 0.55 |
| **RSD** | 5.89 | 5.28 | 6.36 | 1.91 | 1.29 | 2.90 | 1.96 | 7.57 | 5.94 |
| **%Recovery** | 85.55 | 93.79 | 91.59 | 84.12 | 94.36 | 88.64 | 88.21 | 97.45 | 92.24 |

จาก Table 22 พบว่า % recovery ของ tiamulin สำหรับทดสอบ 5% drug carryover มีค่าอยู่ในช่วง 84.12 – 97.45 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ %recovery 80 - 110% (AOAC, 2019)

**Table 23.** Accuracy of tiamulin LC analysis (1% drug carryover).

| No. | Day 1 | | | Day 2 | | | Day 3 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 mg/kg | 1.5 mg/kg | 2 mg/kg | 1 mg/kg | 1.5 mg/kg | 2 mg/kg | 1 mg/kg | 1.5 mg/kg | 2 mg/kg |
| 1 | 1.01 | 1.60 | 2.07 | 0.93 | 1.47 | 1.97 | 1.07 | 1.38 | 2.07 |
| 2 | 1.08 | 1.50 | 2.11 | 0.99 | 1.47 | 1.98 | 1.06 | 1.45 | 2.12 |
| 3 | 0.90 | 1.44 | 1.93 | 1.00 | 1.49 | 2.06 | 1.06 | 1.52 | 2.02 |
| 4 | 1.07 | 1.45 | 2.13 | 0.99 | 1.51 | 2.10 | 1.06 | 1.54 | 2.05 |
| 5 | 1.01 | 1.39 | 2.04 | 1.01 | 1.54 | 2.02 | 1.08 | 1.51 | 2.07 |
| 6 | 1.02 | 1.61 | 2.11 | 1.02 | 1.54 | 2.09 | 1.01 | 1.51 | 2.04 |
| 7 | 1.07 | 1.62 | 2.15 | 1.06 | 1.55 | 2.04 | 1.08 | 1.50 | 2.08 |
| **Mean** | 1.02 | 1.52 | 2.08 | 1.00 | 1.51 | 2.04 | 1.06 | 1.49 | 2.06 |
| **SD** | 0.06 | 0.09 | 0.07 | 0.04 | 0.03 | 0.05 | 0.02 | 0.05 | 0.03 |
| **RSD** | 6.07 | 6.20 | 3.59 | 3.92 | 2.26 | 2.48 | 2.25 | 3.68 | 1.55 |
| **%Recovery** | 102.29 | 101.05 | 103.86 | 100.00 | 100.67 | 101.86 | 106.00 | 99.14 | 103.21 |

จาก Table 23 พบว่า % recovery ของ tiamulin สำหรับทดสอบ 1% drug carryover มีค่าอยู่ในช่วง 99.14 – 106.00 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ %recovery 80 - 110% (AOAC, 2019)

5.3 ผลการศึกษา precision โดยการเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ตาม Table 24 ความเข้มข้น 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %5 drug carryover ตาม Table 25 และความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %1 drug carryover ตาม Table 26

**Table 24.** Precision of sample LC analysis (homogeneity).

| No. | 100 mg/kg | | | 150 mg/kg | | | 200 mg/kg | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (n=7) | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| Mean | 100.97 | 104.01 | 104.08 | 154.94 | 154.33 | 153.88 | 198.61 | 203.61 | 204.21 |
| SD | 5.19 | 1.62 | 1.22 | 5.03 | 1.79 | 2.92 | 9.31 | 1.54 | 2.65 |
| $\%RSD_r$ | 5.14 | 1.56 | 1.17 | 3.25 | 1.16 | 1.90 | 4.69 | 0.75 | 1.30 |
| $\%RSD_R$ (n=21) | | 3.29 | | | 2.18 | | | 2.95 | |

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

จาก Table 24 พบว่า repeatability ของการทดสอบ homogeneity มีค่าอยู่ในช่วง 0.75 – 5.14 $\%RSD_r$ และ intermediate precision จากการทดสอบตัวอย่าง 3 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 2.18 – 3.29 $\%RSD_R$ เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 4.8 (AOAC, 2019)

**Table 25.** Precision of sample LC analysis (5% drug carryover).

| No. | 6 mg/kg | | | 8 mg/kg | | | 10 mg/kg | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (n=7) | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| Mean | 5.13 | 5.05 | 5.29 | 7.50 | 7.55 | 7.80 | 9.16 | 8.86 | 9.22 |
| SD | 0.30 | 0.10 | 0.10 | 0.40 | 0.10 | 0.59 | 0.58 | 0.26 | 0.55 |
| $\%RSD_r$ | 5.89 | 1.91 | 1.96 | 5.28 | 1.29 | 7.57 | 6.36 | 2.90 | 5.94 |
| $\%RSD_R$ (n=21) | | 4.08 | | | 5.44 | | | 5.36 | |

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

จาก Table 25 พบว่า repeatability ของการทดสอบ 5% drug carryover มีค่าอยู่ในช่วง 1.29 – 7.57 $\%RSD_r$ และ intermediate precision จากการทดสอบตัวอย่าง 3 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 4.08 – 5.44 $\%RSD_R$ เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 8 (AOAC, 2019)

**Table 26.** Precision of sample LC analysis (1% drug carryover).

| No. | 1 mg/kg | | | 1.5 mg/kg | | | 2 mg/kg | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (n=7) | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| Mean | 1.02 | 1.00 | 1.06 | 1.52 | 1.51 | 1.49 | 2.08 | 2.04 | 2.06 |
| SD | 0.06 | 0.04 | 0.02 | 0.09 | 0.03 | 0.05 | 0.07 | 0.05 | 0.03 |
| $\%RSD_r$ | 6.07 | 3.92 | 2.25 | 6.20 | 2.26 | 3.68 | 3.59 | 2.48 | 1.55 |
| $\%RSD_R$ (n=21) | | 4.80 | | | 4.23 | | | 2.67 | |

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

จาก Table 26 พบว่า repeatability ของการทดสอบ 1% drug carryover มีค่าอยู่ในช่วง 1.55 – 6.20 $\%RSD_r$ และ intermediate precision จากการทดสอบตัวอย่าง 3 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 2.67 – 4.80 $\%RSD_R$ เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 11 (AOAC, 2019)

5.4 ผลการศึกษา limit of detection (LOD) โดยเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %5 drug carryover และความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %1 drug carryover ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ตาม Table 27

**Table 27.** LOD in the studies of homogeneity, 5% drug carryover and 1% drug carryover.

| No. | Homogeneity | | 5% drug carryover | | 1% drug carryover | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 20 mg/kg | S/N | 2 mg/kg | S/N | 0.25 mg/kg | S/N |
| 1 | 29.26 | 151 | 2.92 | 180 | 0.41 | 14 |
| 2 | 29.10 | 246 | 2.86 | 105 | 0.42 | 22 |
| 3 | 24.71 | 308 | 2.87 | 162 | 0.41 | 15 |
| 4 | 25.10 | 200 | 2.94 | 216 | 0.42 | 25 |
| 5 | 29.92 | 280 | 2.92 | 242 | 0.42 | 24 |
| 6 | 29.24 | 216 | 3.16 | 22 | 0.42 | 25 |
| 7 | 25.42 | 352 | 3.26 | 42 | 0.40 | 17 |
| 8 | 26.13 | 306 | 3.30 | 47 | 0.41 | 30 |
| 9 | 26.01 | 225 | 3.15 | 168 | 0.39 | 11 |
| 10 | 25.79 | 150 | 3.19 | 202 | 0.42 | 19 |
| **Mean** | **27.07** | **243.51** | **3.06** | **138.76** | **0.41** | **20.21** |
| **SD** | **2.04** | **67.86** | **0.17** | **78.94** | **0.01** | **6.01** |
| **%RSD** | **7.54** | **27.87** | **5.57** | **56.89** | **2.41** | **29.76** |

5.5 ผลการศึกษา limit of quantitation (LOQ) โดยเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ homogeneity ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ %5 drug carryover และ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ 1% drug carryover ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ตาม Table 28

**Table 28.** LOQ in the studies of homogeneity, 5% drug carryover and 1% drug carryover.

| No. | Homogeneity | | 5% drug carryover | | 1% drug carryover | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 50 mg/kg | %recovery | 4 mg/kg | %recovery | 0.5 mg/kg | %recovery |
| 1 | 45.03 | 90.06 | 4.13 | 103.17 | 0.53 | 105.88 |
| 2 | 44.20 | 88.40 | 4.17 | 104.25 | 0.52 | 104.44 |
| 3 | 46.60 | 93.19 | 4.28 | 107.07 | 0.53 | 106.87 |
| 4 | 46.11 | 92.22 | 4.25 | 106.34 | 0.47 | 94.67 |
| 5 | 45.33 | 90.67 | 4.43 | 110.76 | 0.54 | 107.16 |
| 6 | 46.38 | 92.75 | 4.12 | 102.69 | 0.51 | 101.83 |
| 7 | 46.89 | 93.77 | 4.36 | 108.93 | 0.53 | 105.86 |
| 8 | 46.51 | 93.03 | 4.01 | 100.35 | 0.53 | 105.34 |
| 9 | 53.19 | 106.38 | 4.19 | 104.77 | 0.53 | 105.73 |
| 10 | 49.36 | 98.72 | 4.39 | 109.79 | 0.55 | 109.06 |
| **Mean** | **46.96** | **93.92** | **4.23** | **105.84** | **0.53** | **104.68** |
| **SD** | **2.58** | **5.16** | **0.13** | **3.34** | **0.02** | **3.98** |
| **%RSD** | **5.50** | **5.50** | **3.16** | **3.16** | **4.29** | **3.81** |

5.6 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (specificity) โดยการเติม salinomycin, monensin, amoxicillin และ ampicillin ลงไปรวมกับ tiamulin พบว่าวิธีทดสอบสามารถแยก tiamulin ได้และไม่พบพีครบกวนใน MRM channel ของ tiamulin ตาม Fig. 5

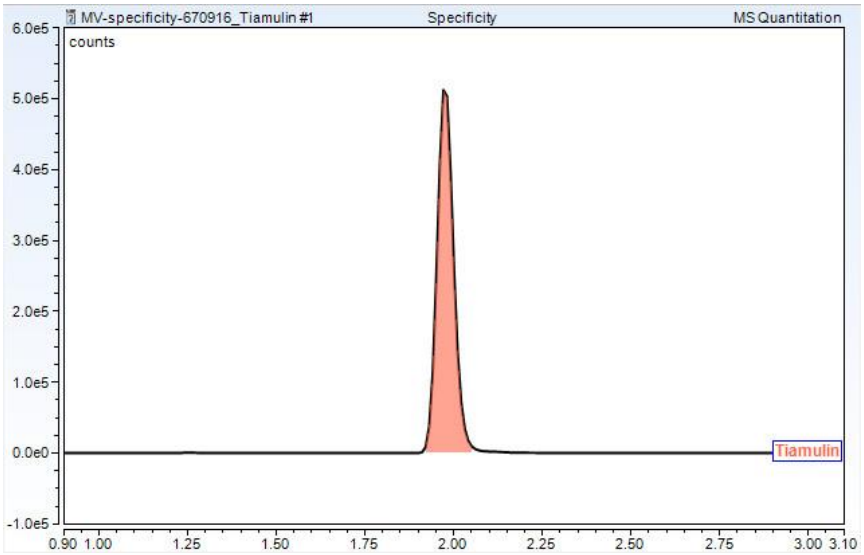


**Fig. 5.** Chromatogram ของสารมาตรฐานที่มีการเติม salinomycin, monensin, amoxicillin และ ampicillin

5.7 ผลการทดสอบ robustness ตาม Table 29-30 และ Fig. 6 พบว่าการทดสอบพารามิเตอร์ [A-a] ถึง [G-g] มีค่า $\sqrt{2} * s$ น้อยกว่า 28.11 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ไม่มีผลต่อวิธีทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**Table 29**. The result tiamulin 150 mg/kg Youden's test.

| Factor | Parameter factorial combination | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Treatment 1 (mg/kg) | Treatment 2 (mg/kg) | Treatment 3 (mg/kg) | Treatment 4 (mg/kg) | Treatment 5 (mg/kg) | Treatment 6 (mg/kg) | Treatment 7 (mg/kg) | Treatment 8 (mg/kg) |
| 1 | A | A | A | A | a | a | a | a |
| 2 | B | B | b | b | B | B | b | b |
| 3 | C | c | C | c | C | c | C | c |
| 4 | D | D | d | d | d | d | D | D |
| 5 | E | e | E | e | e | E | e | E |
| 6 | F | f | f | F | F | f | f | F |
| 7 | G | g | g | G | g | G | G | g |
| Result | 173.02 | 159.01 | 140.77 | 149.17 | 156.67 | 154.78 | 105.87 | 157.43 |
| S | 19.88 | | | | | | | |
| $\sqrt{2} * s$ | 28.11 | | | | | | | |

**Table 30**. Effects from a seven-factors Youden's test design.

| ลำดับ | Parameter | Value |
|---|---|---|
| 1 | ปริมาตรการเติม 1% sodium carbonate (mL) [A-a] | 11.80 |
| 2 | ความเข้มข้นของ sodium carbonate (%) [B-b] | 22.56 |
| 3 | ปริมาตรการเติม hexane : ethyl acetate (3:1,v/v) [C-c] | -11.02 |
| 4 | เวลาในการเขย่า (นาที) [D-d] | -1.52 |
| 5 | เวลาในการ centrifuge (นาที) [E-e] | 13.82 |
| 6 | ความเร็วรอบของ centrifuge (rpm) [F-f] | 18.97 |
| 7 | อุณหภูมิใน chamber ของ centrifuge (°C) [G-g] | -7.76 |

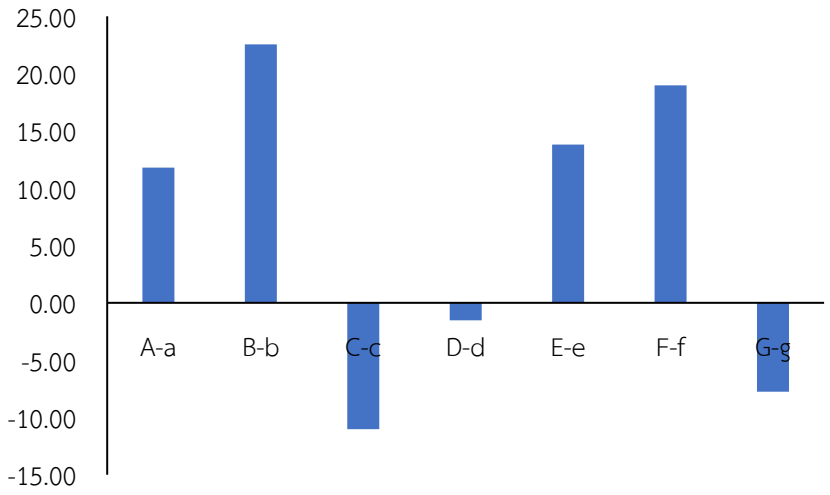


**Fig. 6.** Effects from a seven-factors Youden's test design

5.8 ผลการศึกษา matrix effect ของการทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity และ drug carryover ตาม Table 31 และ 32 และ Fig. 7

**Table 31.** Matrix-fortified calibration curve and standard solution calibration curve in the studies of homogeneity, 5% drug carryover and 1% drug carryover.

| Parameters | Matrix-fortified calibration curve | | | Standard solution calibration curve | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Homogeneity | 5% Drug carryover | 1% Drug carryover | Homogeneity | 5% Drug carryover | 1% Drug carryover |
| Slope | 2370671 | 723770 | 566392 | 2493914 | 1514990 | 2642989 |
| Intercept | -3263 | -500 | -1348 | 3313 | -13997 | 997 |
| *r* | 0.9999 | 0.9980 | 0.9988 | 0.9997 | 0.9996 | 0.9994 |

**Table 32.** Matrix effect in the studies of homogeneity, 5% drug carryover and 1% drug carryover.

| Homogeneity | 5% drug carryover | 1% drug carryover |
|---|---|---|
| 95.06 | 47.77 | 21.43 |

ผลการศึกษา matrix effect จากการเปรียบเทียบ slope ของ matrix-fortified calibration curve เทียบกับ standard calibration solution ตาม Table 32 พบว่า การทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity, 5% drug carryover และ 1% drug carryover มีการเกิดสัญญาณลดของสารที่ทดสอบ (signal suppression)

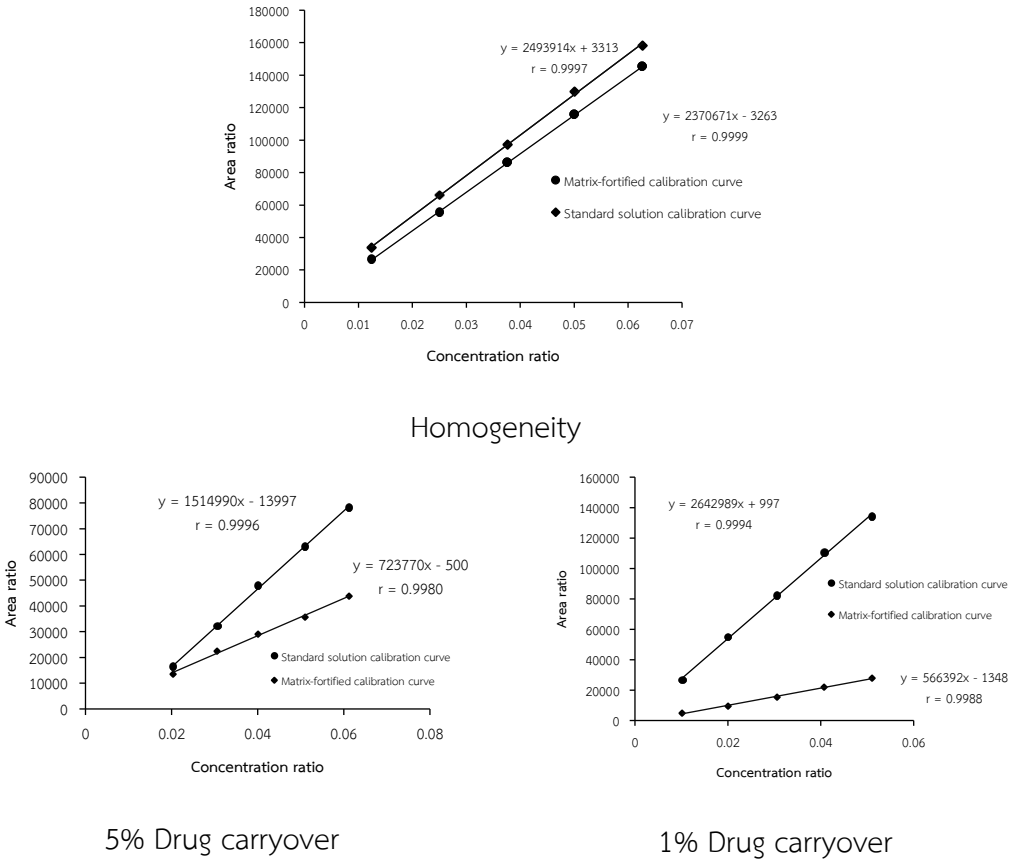


**Fig. 7.** Matrix-fortified calibration curve and standard solution calibration curve in the studies of homogeneity, 5% drug carryover and 1% drug carryover.

**6. สรุปผลการทดลอง**

จากการพัฒนาวิธีทดสอบ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ปี 2565 ซึ่งใช้คอลัมน์ Phenomenex, Kinetex $C_{18}$, 2.6 ไมโครเมตร ขนาด 150 × 3.0 มิลลิเมตร อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณการฉีด 5 ไมโครลิตร ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่คือ 0.1% formic acid ใน water และ 0.1% formic acid ใน acetonitrile (60 : 40, v/v) ในแบบ isocratic elution สามารถชะสาร tiamulin ได้ภายใน 10 นาที ทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นช่วงความเข้มข้น 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใช้ 0.1% formic acid ใน 80% acetonitrile ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ระยะเวลา 20 นาที ทำการสกัด 3 รอบ แต่พบว่าเมื่อทดสอบ calibration curve ในช่วง drug carryover แล้วพบปัญหาค่า *r* ไม่ผ่านเกณฑ์ความเป็นเส้นตรง ($r \geq 0.995$) จึงได้ทำการทบทวนวรรณกรรมเพิ่มเติม พบว่า Dorota et al. (2010) ได้ทำการศึกษาการสกัดตัวอย่าง tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา (medicated feeding stuff) โดยสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาด้วย 1% sodium carbonate in water และ hexane: ethyl acetate ทำการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC ให้ผลเป็นที่น่าพอใจจึงนำมาใช้ในการสกัดตัวอย่างเพื่อหาความเป็นไปได้ในการใช้ทดสอบ tiamulin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาในการทดสอบ homogeneity, 5% drug carryover และ 1% drug carryover โดยใช้ matrix-fortified calibration curve ด้วยเทคนิค trituration เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีในครั้งนี้

จากการศึกษาทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยใช้คอลัมน์ Kinetex $C_{18}$ 100 x 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.7 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Phenomenex สามารถตรวจวิเคราะห์ tiamulin homogeneity ได้ในช่วง 50-250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 5% drug carryover ได้ในช่วง 4-12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1% drug carryover ได้ในช่วง 0.5-2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การศึกษา matrix effect พบว่า การทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญ homogeneity, 5% drug carryover และ 1% drug carryover มีการเกิดสัญญาณลดของสารที่ทดสอบ (signal suppression) ดังนั้น matrix มีอิทธิพลต่อการทดสอบปริมาณตัวยาเมื่อทดสอบแบบ homogeneity และ drug carryover จึงควรใช้ matrix-fortified calibration curve ในการทำงาน

การศึกษา robustness พบว่าการทดสอบพารามิเตอร์ [A-a] ถึง [G-g] มีค่า $\sqrt{2} * s$ น้อยกว่า 28.11 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ไม่มีผลต่อวิธีทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษา specificity โดยการเติม salinomycin, monensin, amoxicillin และ ampicillin ลงไปรวมกับ tiamulin พบว่าวิธีทดสอบสามารถแยก tiamulin ได้และไม่พบพีคของ salinomycin, monensin, amoxicillin และ ampicillin ใน MRM channel ของ tiamulin

ดังนั้นผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบค่าตัวแปรต่างๆ เป็นไปตามค่ามาตรฐานตาม Table 33 ซึ่งดำเนินการภายใต้กรอบการปฏิบัติงานของบุคลากร เครื่องมือ สภาวะแวดล้อมของห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ วิธีทดสอบการทดสอบ tiamulin ในอาหารอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) เป็นไปตาม

วัตถุประสงค์การใช้งาน สามารถนำมาใช้ในการทดสอบตัวอย่างของห้องปฏิบัติการฯ การประเมินความไม่แน่นอนของการทดสอบ และใช้ประเมินความสามารถของผู้ทดสอบต่อไปได้

**Table 33.** Method validation performance characteristic of tiamulin in medicated feed.

| Parameters ที่ทดสอบ | เกณฑ์การทดสอบ | ผลการทดสอบ |
|---|---|---|
| **Linearity (*r*)** | | |
| Homogeneity | $r \geq 0.995$ | 0.9999 |
| 5% Drug carryover | $r \geq 0.995$ | 0.9996 |
| 1% Drug carryover | $r \geq 0.995$ | 0.9995 |
| **Accuracy (%recovery)** | | |
| Homogeneity | 90 – 107 % | 99.30 – 104.08 % |
| 5% Drug carryover | 80 – 110 % | 84.12 – 97.45 % |
| 1% Drug carryover | 80 – 110 % | 99.14 – 106.00 % |
| **Repeatability (%$RSD_r$)** | | |
| Homogeneity | %RSD ≤ 5.3 | 0.75 – 5.14 %RSD |
| 5% Drug carryover | %RSD ≤ 8 | 1.29 – 7.57 %RSD |
| 1% Drug carryover | %RSD ≤ 11 | 1.55 – 6.20 %RSD |
| **Intermediate precision (%$RSD_R$)** | | |
| Homogeneity | %RSD ≤ 7 | 2.18 – 3.29 %RSD |
| 5% Drug carryover | %RSD ≤ 8 | 4.08 – 5.44 %RSD |
| 1% Drug carryover | %RSD ≤ 8 | 2.67 – 4.80 %RSD |
| **LOD** | | |
| Homogeneity | S/N ≥ 3 | S/N = 243.51 |
| 5% Drug carryover | S/N ≥ 3 | S/N = 138.76 |
| 1% Drug carryover | S/N ≥ 3 | S/N = 20.21 |
| **LOQ** | | |
| Homogeneity | 50 mg/kg | 46.96 mg/kg |
| 5% Drug carryover | 4 mg/kg | 4.23 mg/kg |
| 1% Drug carryover | 0.5 mg/kg | 0.53 mg/kg |

## 7. ข้อเสนอแนะ

-

## 8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2567 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## 9. เอกสารอ้างอิง

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

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

Moore, D.B., Britton, N.L., Smallidge, R.L., & Riter, K.L. (2002). Determination of Tiamulin in Type C Medicated Swine Feeds Using High Throughput Extraction with Liquid Chromatography. Journal of AOAC international vol. 85. No 3. p. 682 – 685

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

Rodriguez-Comesana M., B. Cancho-Grande., J. Simal-Gandara, (2023). Screening Method for Detecting Cross-Contamination Residues of Tiamulin in Swine Feeds. Journal of AOAC international vol. 86. No 3. p. 682 – 685