

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบซาลิโนมายซิน ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยวิธี microbiological assay

สุนันท์ กิตติจรรุวัฒนา ชุศักดิ์ อางสูงเนิน รังษิยา คติการ

บทคัดย่อ

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบซาลิโนมายซิน (Salinomycin) ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา แบบ 3-โดส (3-dose microbiological assay) โดยใช้เชื้อมาตรฐาน *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ปริมาณเชื้อ 1×10^9 CFU/mL ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.75, 1.5 และ 3.0 $\mu\text{g/mL}$ ทดสอบหาปริมาณด้วยยาสำคัญและการกระจายตัวของยาอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ในช่วงความเข้มข้น 40 - 80 mg/kg ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) เท่ากับ 0.9888 การทดสอบความแม่นยำซึ่งประเมินจากร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 95.1–102.5% ผลของ repeatability มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.88-2.26 และ intermediate precision มีค่า %RSD ที่ 1.76 ดังนั้น วิธีการทดสอบจุลชีววิทยา แบบ 3-โดสนี้มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบความสม่ำเสมอของซาลิโนมายซินในอาหารสัตว์ที่ผสมยา เพื่อให้มั่นใจว่าการกระจายตัวของยาเป็นไปอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน

คำสำคัญ : อาหารสัตว์ที่ผสมยา ซาลิโนมายซิน วิธีทางจุลชีววิทยา แบบ 3-โดส

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for the determination of salinomycin in medicated feed by microbiological assay

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsoongnearn, Rangsiya Katikarn

Abstract

The validation of the 3-dose microbiological assay for testing salinomycin in medicated feed, using *Bacillus subtilis* ATCC 6633 as the reference strain, demonstrated robust performance. With a bacterial concentration of 1×10^9 CFU/mL and standard solution concentrations of 0.75, 1.5, and 3.0 $\mu\text{g/mL}$, the method showed strong linearity across the range of 40 - 80 mg/kg, evidenced by a correlation coefficient (r) of 0.9888. Accuracy was confirmed with recovery rates between 95.1% and 102.5%. Repeatability results indicated low variability, with %RSD values ranging from 0.88 to 2.26, while intermediate precision showed a %RSD of 1.76. These findings affirm that the 3-dose microbiological assay is a suitable method for assessing the homogeneity of salinomycin in medicated feed, ensuring consistent drug distribution throughout the product.

Keywords: medicated feed, salinomycin, microbiological assay, 3-doses

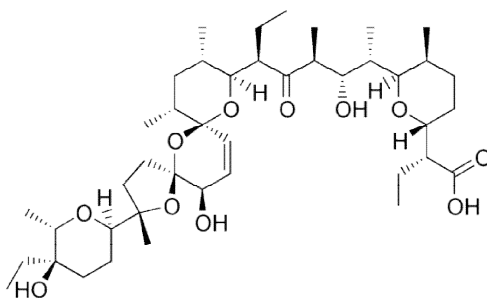
Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development.

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบซาลิโนมายซิน ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยวิธี microbiological assay

สุนันท์ กิตติจารุวัฒนา ชุศักดิ์ อางสูงเนิน รังษิยา คติการ

บทนำ

ซาลิโนมายซิน (salinomycin) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม ionophore ที่แยกได้จาก *Streptomyces albus* มีลักษณะเป็นผงสีขาวถึงเหลืองอ่อน สามารถละลายได้ใน ethyl acetate, acetone, ethyl ether, chloroform และ methanol แต่ละลายได้น้อยในน้ำ (FAMIC, 2023) ใช้สำหรับเติมลงในอาหารสัตว์เพื่อรักษา ควบคุมและยับยั้งโรคบิดในสัตว์ปีก (coccidiosis) ยาพวก ionophores มีผลต่อสมดุลโซเดียม (Na) – โพแทสเซียม (K) ภายในเซลล์ โดยตัวสัว์เองมีกลไกในการปรับสมดุลดังกล่าว แต่เชื้อบิดไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงนี้ได้ ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (McDougald, 1990)



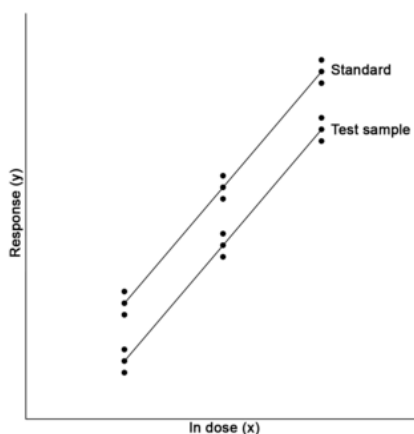
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมี Salinomycin (C₄₂H₇₀O₁₁)

ที่มา FAMIC (http://www.famic.go.jp/ffis/oie/sub2/method/sub2_antibiotic.html)

ตามประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการควบคุมการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยา พ.ศ. 2563 ผู้ผลิตอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของยาต้านจุลชีพ ต้องทดสอบการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน โดยหาปริมาณยาตามที่กำหนดในสูตรหรือสารทดสอบ (tracer) โดยจะต้องเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์หลังการผสม เพื่อทดสอบหาปริมาณยาตามที่กำหนดในสูตรอาหารสัตว์ที่ผสมยา ยาที่ใช้ผสมในอาหารสัตว์ เช่น amoxicillin และ salinomycin เป็นต้น ซึ่งตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้าหรือขายอาหารสัตว์ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2561 กำหนดให้ทะเบียนตำรับยาที่มีตัวยามีปริมาณ salinomycin ที่ใช้ผสมในอาหารสัตว์สำเร็จรูป ต้องอยู่ในช่วงระดับความเข้มข้น 50-70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดสอบหาปริมาณ salinomycin ตามวิธีของ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) จะสกัดตัวอย่างโดยใช้สารละลาย MeOH : water และใช้วิธีทดสอบแบบ 2-doses คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 2 ความเข้มข้น (ความเข้มข้นสูง และต่ำ)

เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานจำนวน 2 ความเข้มข้นเช่นกัน โดยแต่ละความเข้มข้นของตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องเท่ากัน โดยการวิเคราะห์แบบ 2-doses จะเป็นการหา regression และการหาความเป็นเส้นขนานของสารมาตรฐานและตัวอย่าง ส่วนในการพัฒนาวิธีครั้งนี้ได้ใช้วิธีทดสอบแบบ 3-doses คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างและสารมาตรฐานจำนวน 3 ความเข้มข้น (ความเข้มข้นสูง กลาง และต่ำ) (BP, 2023) ซึ่งวิธีทดสอบจะได้ลักษณะ curve ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง 2 เส้นขนานกัน และสามารถแสดงความเป็นเส้นตรง ซึ่งจะทำให้เกิดความแม่นยำในการวิเคราะห์มากขึ้น



รูปที่ 2 The parallel-line model for a 3 + 3 assay (ที่มา BP 2023)

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบปริมาณ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา ด้วยวิธี microbiological assay โดยปรับเปลี่ยนวิธีมาตรฐานของ FAMIC แบบ 2-doses เป็นแบบ 3-doses

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับทดสอบปริมาณ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาด้วยวิธี microbiological assay ซึ่งมีปริมาณตัวยาสำคัญ salinomycin ที่ช่วงระดับความเข้มข้น 50-70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีทดสอบหาปริมาณ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาด้วยวิธี microbiological assay ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแล้ว เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดสอบหาปริมาณ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา ในช่วงความเข้มข้น 50-70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 เครื่องอ่านโซน ยี่ห้อ Giles Scientific
- 4.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet) ยี่ห้อ Astec Microflow รุ่น 51424/2
- 4.1.3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยระบบแรงดันไอน้ำ ยี่ห้อ Hirayama
- 4.1.4 ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Binder

- 4.1.5 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XP 205 DR และรุ่น AX 205 DR
- 4.1.6 ชุดผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง พร้อมอุปกรณ์ ยี่ห้อ Thermo
- 4.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด – เบส (pH Meter) ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น SevenExcellence
- 4.1.8 ตู้ดูดควัน ยี่ห้อ NEWLAB รุ่น 252N
- 4.1.9 อ่างน้ำอัลตราโซนิก ยี่ห้อ CREST รุ่น 575D
- 4.1.10 ตู้อบระบบสุญญากาศ (vacuum oven) ยี่ห้อ Binder รุ่น VD23
- 4.1.11 ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven) ยี่ห้อ Binder รุ่น FED 720
- 4.1.12 เครื่องผสมสารละลาย ยี่ห้อ IKA รุ่น C-MAG HS7
- 4.1.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB7
- 4.1.14 ชุดดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (micropipette) ยี่ห้อ Eppendorf
- 4.1.15 เครื่องบดปั่น (Blender) ยี่ห้อ Waring
- 4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์
 - 4.2.1 Methanol, AR grade
 - 4.2.2 Peptone
 - 4.2.3 Yeast extract
 - 4.2.4 Glucose
 - 4.2.5 Bacteriological agar
 - 4.2.6 Brain heart infusion agar
 - 4.2.7 Brain heart infusion broth
 - 4.2.8 Sodium chloride
 - 4.2.9 Test tube
 - 4.2.10 Petri dish ขนาด 20x100 mm
 - 4.2.10 Volumetric pipette
 - 4.2.11 Graduate pipette
 - 4.2.11 Cylinder cup
 - 4.2.12 Solution bottle
 - 4.2.13 Pipette tip ขนาด 200-1,000 μL
 - 4.1.14 Water หรือ sterile RO water (น้ำ RO ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)
- 4.3 สารมาตรฐานและเชื้อมาตรฐาน
 - 4.3.1 สารมาตรฐาน Salinomycin monosodium salt hydrate, Honeywell Fluka, reference standard, purity 91.7 %
 - 4.3.2 เชื้อมาตรฐาน *Bacillus subtilis* ATCC 6633, ATCC
- 4.4 ตัวอย่าง
 - ตัวอย่างอาหารไก่สำเร็จรูป

- 4.5 ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย สารละลายมาตรฐาน อาหารเลี้ยงเชื้อ และ spore suspension ของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- 4.5.1 การเตรียมสารละลาย
- 4.5.1.1 สารละลาย water: MeOH (7: 3)
ตวง water ด้วย cylinder ปริมาตร 70 mL และตวง MeOH ปริมาตร 30 mL ใส่ใน solution bottle ปิดฝาและเขย่าผสมให้เข้ากัน
- 4.5.1.2 สารละลาย MeOH: water (9: 1)
ตวง MeOH ด้วย cylinder ปริมาตร 90 mL และตวง water ปริมาตร 10 mL ใส่ใน solution bottle ปิดฝาและเขย่าผสมให้เข้ากัน
- 4.5.1.3 สารละลาย isotonic sodium chloride solution (0.9% NaCl หรือ NS)
ชั่ง Sodium chloride ปริมาณ 0.9 กรัม ละลายด้วยน้ำปริมาตร 100 mL ละลายให้เข้ากัน ปิดฝา test tube ละ 9 mL ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- 4.5.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 4.5.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar
ชั่ง brain heart infusion agar ปริมาณ 47 กรัม ละลายด้วยน้ำ ปริมาตร 1,000 mL ละลายให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- 4.5.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth
ชั่ง brain heart infusion broth ปริมาณ 37 กรัม ละลายด้วยน้ำ ปริมาตร 1,000 mL ละลายให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- 4.5.2.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium F-16 ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้ Peptone 2 g, Yeast extract 2.5 g, Glucose 1 g, Agar 13-20 และ water 1000 L pH after sterilization 5.9 - 6.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- 4.5.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน salinomycin
- 4.5.3.1 ออบสารมาตรฐาน salinomycin ด้วย vacuum oven ที่อุณหภูมิ 60 °C ภายใต้อุณหภูมิ 0.67 kPa เวลา 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน desiccator
- 4.5.3.2 ชั่งสารมาตรฐาน salinomycin น้ำหนักประมาณ 20 mg ละลายด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/mL (stock standard)
- 4.5.3.3 เจือจางต่อด้วย water: MeOH (7: 3) ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ระบุในแต่ละ
- 4.5.4 การเตรียม spore suspension เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่เหมาะสม สำหรับการทดสอบ ตามข้อมูลจากการพัฒนาวิธี

4.5.5 การเตรียมตัวอย่าง

4.5.5.1 ชั่งตัวอย่างที่มีปริมาณ salinomycin 60 ppm หรือ 60 mg/kg ประมาณ 10 กรัม จะมีปริมาณ salinomycin 0.6 mg ใส่ใน stoppered erlenmeyer flask ขนาด 250 mL

4.5.5.2 เติม MeOH: water (9: 1) ปริมาตร 60 mL กวนผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่องผสมสารละลาย

4.5.5.3 กรองด้วย filter paper No. 5A

4.5.5.4 กรองผ่าน column tube ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 mm ที่ dry-packed ด้วย basic alumina 12 g (aluminum oxide) ที่ 5 mL แรก ที่กรองได้ และเก็บสารละลายที่เหลือ ได้ความเข้มข้น 10 µg/mL

4.5.5.5 เจือจางสารละลายที่กรองได้ ด้วย water: MeOH (7:3) ให้ได้ความเข้มข้น ตามที่กำหนดไว้ในแต่ละหัวข้อ

4.6 การทดสอบด้วยวิธี microbiological assay

4.6.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน salinomycin ตามข้อ 4.5.3

4.6.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง ตามข้อ 4.5.5

4.6.3 ปลูก spore suspension ของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium F-16 ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.5.2.3 ผสมให้เข้ากันเบาๆ

4.6.4 ปลูกอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium F-16 ที่ใส่เชื้อแล้ว ในข้อ 4.6.3 ปริมาตร 10 mL ลงใน petri dish ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

4.6.5 วาง cylinder cups ลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 4.6.4 จำนวน 6 อัน/ 1 plate

4.6.6 ปลูกสารละลายมาตรฐาน salinomycin ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.6.1 และเตรียมสารละลายตัวอย่าง ที่เตรียมไว้ในแต่ละหัวข้อ ปริมาตร 300 µL/ 1 cylinder cup (การวิเคราะห์ 1 ซ้ำ/ 6 plate)

4.6.7 หลังจากหยอดสารละลายมาตรฐานลงในแต่ละ cylinder cups เรียบร้อยแล้วให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10-20 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 16 - 24 ชั่วโมง

4.6.8 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone และคำนวณผล

4.7 ขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยวิธี microbiological assay ตามแนวทางของ FDA, 2020

4.7.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

ทำการทดสอบสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.375, 0.75, 1.5, 3.0 และ 6.0 µg/mL ความเข้มข้นละ 18 ซ้ำ ทดสอบเป็นเวลา 3 วัน นำค่าขนาดโซนที่วัดได้ (mm) มาสร้างกราฟระหว่างระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับขนาดของโซนที่วัดได้ และตรวจสอบความเป็นเส้นตรง

โดยใช้โปรแกรม Excel ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ที่ได้ ต้องมากกว่า 0.95

4.7.2 การทดสอบความเที่ยงของวิธี (Precision)

การทดสอบ repeatability (intraday precision) ทำการทดสอบ เป็นเวลา 3 วัน นำค่าที่ได้จากการทดสอบ มาคำนวณ %RSD

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน salinomycin ที่ระดับความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3.0 $\mu\text{g/mL}$ ตามข้อ 4.5.3
- เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3.0 $\mu\text{g/mL}$ ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ ตามข้อ 4.5.5
- การทดสอบด้วยวิธี microbiological assay ตามข้อ 4.6 รวม 3 วัน นำค่าที่ได้จากการทดสอบ มาคำนวณ %RSD

4.7.3 การทดสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

ทำการทดสอบสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 66%, 100% และ 133% (อ้างอิงตาม FDA, 2020 คือ 80-120%) ระดับความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

- blank sample (3.0, 1.5 และ 0.75 $\mu\text{g/mL}$)
- ระดับความเข้มข้น 66% (2.0, 1.0 และ 0.5 $\mu\text{g/mL}$)
- ระดับความเข้มข้น 100% (3.0, 1.5 และ 0.75 $\mu\text{g/mL}$)
- ระดับความเข้มข้น 133% (4.0, 2.0 และ 1.0 $\mu\text{g/mL}$)

ทดสอบเป็นเวลา 1 วัน นำค่าที่ได้จากการทดสอบ มาคำนวณ %RSD ของแต่ละระดับความเข้มข้น นำค่าที่ได้จากการทดสอบ มาคำนวณ % recovery และ %RSD

- #### 4.7.3.1 การเตรียมตัวอย่าง blank sample (ตัวอย่างอาหารไก่เนื้อ ที่ไม่มียา salinomycin) บดตัวอย่างอาหารไก่เนื้อ ที่ไม่มียา salinomycin ด้วยเครื่องบดปั่น (Blender) สำหรับเตรียม matrix-fortified solid reference standard ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยบดครั้งละประมาณ 100 กรัม ความเร็วระดับ LOW ใช้เวลาครั้งละประมาณ 5 นาที รวมตัวอย่างประมาณ 200 กรัม

- #### 4.7.3.2 การเตรียม matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเทคนิค trituration

ขั้นตอนที่ 1 ชั่งตัวอย่าง blank sample (ตัวอย่างอาหารไก่เนื้อ ที่ไม่มียา salinomycin) ที่บดแล้วจากข้อ 4.7.3.1 ปริมาณ 19.98 กรัม \pm 0.010 กรัม

ขั้นตอนที่ 2 ตักแบ่งลงใน mortar ประมาณ 4 เท่าของสารมาตรฐาน salinomycin 0.02 กรัม

ขั้นตอนที่ 3 ชั่งสารมาตรฐาน salinomycin monosodium salt ให้ได้ salinomycin ประมาณ 20.00 มิลลิกรัม (น้ำหนักที่ชั่งต้องไม่ต่ำกว่า minimum weight และบันทึกน้ำหนักจริง) ค่อยๆ เเทลงไปผสมกับอาหารสัตว์ที่บดแล้วใน mortar เป็นเวลา 5 นาที

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

ขั้นตอนที่ 5 แบ่งตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 1 ใส่ในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ประมาณ 10 กรัม และนำตัวอย่างที่บดผสมแล้วจากขั้นตอนที่ 4 ค่อยๆ เทใส่ในถุงพลาสติกให้หมด รัดถุงพลาสติกให้สนิทโดยให้มี อากาศอยู่ด้านใน ค่อยๆ ผสมตัวอย่างในถุงพลาสติกและหมุนทุกทิศทาง ให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 6 นำตัวอย่างที่เหลืออยู่ในขั้นตอนที่ 1 มา rinse ตัวอย่างภายใน mortar โดยแบ่งตัวอย่างสำหรับ rinse 3 รอบ ใส่ใน mortar บดผสมให้ทั่ว ภายใน mortar แล้วเทใส่ในถุงพลาสติกรวมกัน หมุนทุกทิศทางให้เข้า กันเป็นเวลา 5 นาที ทำการ rinse mortar อีก 2 รอบ จากนั้นผสม ตัวอย่างทั้งหมด หมุนทุกทิศทางเป็นครั้งสุดท้ายให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที (20 กรัม)

4.7.3.3 ผสมตัวอย่าง blank sample จากข้อ 4.7.3.1 และ matrix-fortified solid reference standard ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ความเข้มข้น 3 ระดับๆ ละ 10 กรัม ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเตรียม matrix-fortified sample สำหรับทดสอบ accuracy

Level	blank sample (g)	1,000 mg/kg salinomycin addition (g)	final concentration (mg/kg)
1 (66%)	9.6	0.4	40
2 (100%)	9.4	0.6	60
3 (133%)	9.2	0.8	80

4.7.3.4 นำตัวอย่างที่ spike สารมาตรฐาน salinomycin จากข้อ 4.7.3.3 ไปสกัดตามขั้นตอน การเตรียมตัวอย่าง ข้อ 4.5.5

4.7.3.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน salinomycin ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามข้อ 4.5.3

4.7.3.6 นำสารละลายมาตรฐาน salinomycin ที่ได้จากข้อ 4.7.3.5 และสารละลายตัวอย่าง ที่ได้จากข้อ 4.7.3.4 ไปทดสอบด้วยวิธี microbiological assay ตามข้อ 4.6

4.7.4 การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

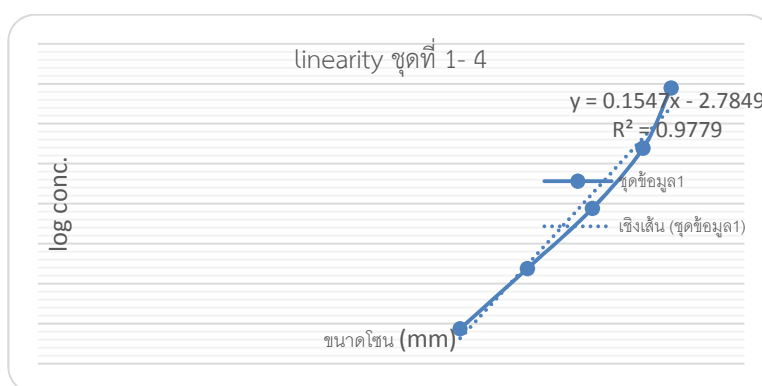
โดยใช้ตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่มีปริมาณตัวยาคัญ salinomycin ที่ช่วง ระดับความเข้มข้น 50-70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเตรียมสารละลายมาตรฐาน ตามข้อ 4.5.3 และนำไปทดสอบ ดังนี้

- แบบปกติ ทดสอบตามวิธี (FAMIC)
- แบบเปลี่ยนแปลง ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากเดิม 10 mL เป็น 9 mL และ 11 mL
- แบบเปลี่ยนแปลง ปริมาณ dry-packed ด้วย basic alumina (aluminum oxide) จากเดิม 12 g เป็น 11 g และ 13 g
- แบบเปลี่ยนแปลง เวลาการบ่ม plate จากเดิม 16 - 24 ชั่วโมง เป็น 25 ชั่วโมง
ทดสอบแบบละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดสอบ มาคำนวณ % LA และ
เปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละแบบ โดยการคำนวณ %RSD

5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

จากผลการศึกษา linearity ของการทดสอบ พบว่ามีค่า r เท่ากับ 0.9888 (รูปที่ 3) ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.95$ (FDA, 2020) ตามตารางที่ 2



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) รวม 4 ชุดการทดสอบ

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

Parameter	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	รวมครั้งที่ 1-4
Slope	0.1442	0.1534	0.1613	0.1577	0.1547
Intercept	-2.5592	-2.8133	-3.0692	-2.6651	-2.7849
r	0.9962	0.9910	0.9779	0.9860	0.9888

5.2 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธี (Precision)

Repeatability มีค่าอยู่ในช่วง 0.88 – 2.26 %RSD_r และ intermediate precision มีค่า 1.76 %RSD_R ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ $\leq 5.3\%$ RSD (AOAC, 2023) ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธี (Precision)

Repeatability (RSD _r , n=6)				Intermediate precision (RSD _R , n=24)
Analyst 1		Analyst 2		
วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	
1.54	2.26	1.47	0.88	-
-	-	-	-	1.76

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

5.3 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

ผลศึกษา accuracy โดยการเตรียม matrix-fortified sample ด้วยเทคนิค trituration ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม % Recovery อยู่ในช่วง 95.1 – 102.5% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ 90-107 % (AOAC, 2023) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 accuracy of salinomycin (homogeneity)

No.	40 mg/kg		60 mg/kg		80 mg/kg	
	Conc. Found (mg/kg)	% recovery	Conc. Found (mg/kg)	% recovery	Conc. Found (mg/kg)	% recovery
1	40.9	102.4	57.1	95.1	81.5	101.9
2	39.2	98.0	57.7	96.1	79.8	99.8
3	39.0	97.6	61.5	102.5	77.5	96.8
Mean	39.70	99.35	58.74	97.90	79.58	99.50
SD	1.06	2.65	2.41	4.01	2.02	2.52
RSD	2.67	2.67	4.10	4.10	2.54	2.54

5.4 การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

ทดสอบความคงทนของวิธีทดสอบหาปริมาณ salinomycin โดยเปลี่ยน ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากเดิม 10 mL เป็น 9 mL และ 11 mL เปลี่ยนปริมาณ dry-packed ด้วย basic alumina (aluminum oxide) จากเดิม 12 g เป็น 11 g และ 13 g และเปลี่ยนเวลาการบ่ม plate จากเดิม 16 - 24 ชั่วโมง เป็น 25 ชั่วโมง พบว่าให้ผลการทดสอบทางสถิติไม่แตกต่างกัน ($F_{cal} < F_{crit}$ และ $t_{cal} < t_{crit}$) ดังตารางที่ 5 แสดงว่าวิธีทดสอบมีความคงทน แม้เปลี่ยนสภาวะทดสอบเล็กน้อย ก็ยังสามารถให้ผลทดสอบไม่แตกต่างจากสภาวะเดิม

ตารางที่ 5 การทดสอบความคงทนของวิธี

สภาวะทดสอบ		%LA				RSD (%)	ค่าทางสถิติ	
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย		F _{cal}	F _{crit}
ความหนาของอาหาร เลี้ยงเชื้อ	9 mL	87.7	86	92.1	88.60	3.55		
	10 mL	93.5	90.7	90.7	91.63	1.76	1.99	5.14
	11 mL	91.9	90.8	91.5	91.40	0.61		
ปริมาณ dry-packed ด้วย basic alumina	11 g	72.3	73.9	71.3	72.50	1.81		
	12 g	73.2	72.7	74.2	73.37	1.04	0.62	5.14
	13 g	70.4	74.8	70.1	71.77	3.67		
เวลาการบ่ม	16 ชม.	99.0	94.0	101.4	98.13	3.85		
	25 ชม.	95.3	101.6	101.5	99.47	3.63	0.44	2.78

เกณฑ์การยอมรับ: $F_{cal} < F_{crit}$ และ $t_{cal} < t_{crit}$

ตารางที่ 6 สรุปผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยวิธี microbiological assay

Parameter ที่ทดสอบ	เกณฑ์การทดสอบ	เอกสารอ้างอิง	ผลการทดสอบ
Linearity (r)	≥ 0.95	FDA 2020	0.9888
Accuracy (%recovery)	90 - 107 %	AOAC 2023	95.1–102.5%
Repeatability (%RSD_r)	$\leq 5.3\%$ RSD	AOAC 2023	0.88-2.26 %RSD _r
Intermediate precision (%RSD_R)	$\leq 5.3\%$ RSD	AOAC 2023	1.76 %RSD _R

6. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยวิธี microbiological assay โดยปรับเปลี่ยนวิธีมาตรฐานของ FAMIC แบบ 2-doses เป็นแบบ 3-doses ซึ่งมีปริมาณตัวอย่างสำคัญ salinomycin ที่ช่วงระดับความเข้มข้น 50-70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถตรวจวิเคราะห์ salinomycin ได้ในช่วง 40-80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่ามีความเป็นเชิงเส้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ≥ 0.95 และพิสัยตั้งแต่ 40-80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิธีมีความแม่นยำจากการศึกษา % recovery อยู่ในช่วง 95.1–102.5% มี repeatability อยู่ในช่วง 0.88-2.26 %RSD_r และ intermediate precision 1.76 %RSD_R ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปัจจัยการทดสอบเพียงเล็กน้อย คือ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ dry-packed และเปลี่ยนเวลาการบ่ม plate พบว่าไม่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบ

ดังนั้นผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบค่าตัวแปรต่างๆ เป็นไปตามค่ามาตรฐานตามตารางที่ 6 ซึ่งดำเนินการภายใต้กรอบการปฏิบัติงานของบุคลากร เครื่องมือ สภาวะแวดล้อม ของห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบทรายด้านการปศุสัตว์ การทดสอบความ

ใช้ได้ของวิธีทดสอบ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยวิธี microbiological assay เป็นไปตามวัตถุประสงค์การใช้งาน สามารถนำมาใช้ในการทดสอบตัวอย่างของห้องปฏิบัติการฯ ต่อไปได้

7. ข้อเสนอแนะ

-

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2567 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2023. Appendix F: Guideline for Standard Method Performance Requirements. In: Official Methods of Analysis. 25st ed. G.W. Latimer (ed.). Maryland, AOAC International. 1-10.

BP. 2023. British Pharmacopoeia 2023. Biological Assays and Tests. In : British Pharmacopoeia vol.V. Appendix XIV. The Stationery Office, London. p. V-A434– V-A441.

Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC). Feed Analysis Standards, Japan. Chapter 9, Section 3,1.2. Salinomycin Sodium. Available from: http://www.famic.go.jp/ffis/oie/sub2/method/sub2_antibiotic.html

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OFFICE OF REGULATORY AFFAIRS Quality (FDA), 2020. ORA Lab Manual Vol. II - Methods, Method Verification and Validation (ORALAB.5.4.5).

McDougald, L.R. 1990. Control of coccidiosis in chickens: Chemotherapy. Pages 307-320 in Coccidiosis of Man and Domestic Animals. P.L. Long, ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.

ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการควบคุมการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยา พ.ศ. 2563. Available from: http://eservice.afvc.dld.go.th/dld-streaming/access.do?p=document%2FdocLocation_20200918_085734_1600394254440.PDF&m=img

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้าหรือขายอาหารสัตว์ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2561. Available from: <http://afvc.dld.go.th/webnew/images/All-Law/all-moac/61-11-30-announce-moac.pdf>