

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสาร Nitrovin ในอาหารสัตว์ โดยวิธี Screening Test

ธัญณี ปาณพิมพ์วัฒน์ ธงไชย ดิษฐประชา เกรียงไกร เกื้อกุล วารินทร์ อนมนวล ศิริวรรณ จันมี

บทคัดย่อ

ไนโตรวิน (Nitrovin; NIV) เป็นอนุพันธ์ของฟูแรน (furan) ซึ่งใช้เป็นยาสำหรับป้องกันและควบคุมโรคติดเชื้อในปศุสัตว์ อย่างไรก็ตามยากกลุ่มนี้เป็นสารก่อมะเร็ง และสามารถตกค้างในเนื้อสัตว์ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังถูกห้ามใช้ในหลายประเทศ รวมถึงสหภาพยุโรป (EU) และประเทศไทยด้วย จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์เพื่อตรวจหาไนโตรวินในอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์มีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้วิธี screening test สำหรับตรวจหาไนโตรวินในอาหารสัตว์เบื้องต้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้ สามารถตรวจวัดยาดังกล่าวได้ในระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือ 10 mg/kg การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจหาไนโตรวินในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลง และใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ผลการทดสอบไนโตรวินโดยวิธี screening test พบว่าวิธีทดสอบมีความจำเพาะต่อไนโตรวินโดยมีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) เท่ากับ 1 mg/kg และค่า cut-off limit เท่ากับ 8 mg/kg การวิเคราะห์เชิงปริมาณของอาหารสัตว์ที่ผสมไนโตรวินความเข้มข้น 8 mg/kg โดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่ามีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความคงตัวที่ดี และมี recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสามารถตรวจหา ยา ไนโตรวิน ในอาหารสัตว์โดยวิธี screening test ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลง ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนของยาในอาหารสัตว์ในปัจจุบัน

คำสำคัญ: ไนโตรวิน, อาหารสัตว์, screening test

Method Validation of Nitrovin Detection in Animal Feeds by Screening Test

Tayanee Panapimonlawat Thongchai Ditpracha Kriangkrai Kuakoon

Warin Anomnual Siriwan Chanmee

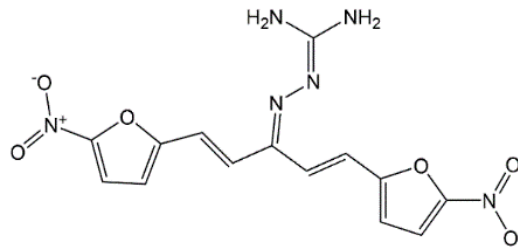
Abstract

Nitrovin (NIV) is a furan derivative used as a medication for preventing and controlling infectious diseases in livestock. However, this class of drugs is carcinogenic and can remain in the meat, posing a risk to consumers. Consequently, the use of such drugs is banned in many countries, including the European Union (EU) and Thailand. Therefore, it is necessary to analyze NIV in animal feed. Bureau of Quality Control of Livestock Products conducts qualitative analysis using screening tests to detect NIV in animal feed. Previous studies have shown that NIV can be detected at a minimum concentration of 10 mg/kg. This study aimed to enhance the detection capability of NIV at lower concentrations and as close as possible to the minimum concentration that can be quantitatively analyzed by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The screening test for NIV showed specificity for NIV with a limit of detection (LOD) of 1 mg/kg and a cut-off limit of 8 mg/kg. Quantitative analysis of animal feed spiked with 8 mg/kg of NIV using LC-MS/MS demonstrated homogeneity, good stability, and acceptable recovery. This validation study indicated that the laboratory could detect NIV in animal feed at lower concentrations using the screening test, which is suitable for the current detection of drug contamination in animal feed.

Keywords: nitrovin, animal feed, screening test

บทนำ

ไนโตรวิน (Nitrovin หรือ difurazone ; NIV) หรือ 1,5-bis(5-nitro-2-furanyl)-1,4-pentadien-3-one มีสูตรทางเคมี $C_{14}H_{12}N_6O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 360.28 กรัม/โมล เป็นหนึ่งในสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ โครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วยสองวงแหวนของไนโตรฟูแรนส์และหมู่ guanidine ดังรูปที่ 1 ไนโตรวินมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีเหลืองส้ม นิยมใช้ในการควบคุมโรคติดเชื้อในปศุสัตว์ ผสมในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในไก่เนื้อ ไก่วง สุกร และลูกโค ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 25 mg/kg



รูปที่ 1 โครงสร้างของไนโตรวินหรือไดฟูรเลน

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เหนียวนาให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ และยังสามารถตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ในหลายประเทศห้ามใช้สารดังกล่าวในสัตว์ที่เลี้ยงไว้เพื่อเป็นอาหารตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 สำหรับประเทศไทยมีการห้ามใช้สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559

เพื่อเป็นการกำกับ ดูแล การใช้ไนโตรวินในอาหารสัตว์ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ของประเทศไทย จึงมีความจำเป็นในการวิเคราะห์หาไนโตรวินที่อาจปนเปื้อนมาในอาหารสัตว์ที่เลี้ยงไว้เพื่อเป็นอาหาร การวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยวิธี screening test เป็นวิธีการตรวจหาไนโตรวินเบื้องต้นที่รวดเร็ว ราคาถูก และสามารถวิเคราะห์ได้ค่อนข้างแม่นยำ โดยอาศัยหลักการเกิดสี (colorimetry) จากปฏิกิริยาระหว่างน้ำยาทดสอบกับสารที่มีหมู่โครโมฟอร์ (chromophore) ซึ่งให้สีที่จำเพาะกับสารนั้นๆ และสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของไนโตรวินได้ในระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือ 10 mg/kg

สารไนโตรวิน เป็นสารที่ห้ามใช้ในปศุสัตว์ ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจหาไนโตรวินในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลงด้วยวิธี screening test เพื่อให้ใกล้เคียงกับ working range ของวิธีเชิงปริมาณด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่ระดับ 1 mg/kg โดยใช้อาหารไก่เป็นตัวแทนอาหารสัตว์ ทำการวิเคราะห์หาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) ค่า cut-off limit ความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และความคงตัว (stability) ของอาหารไก่ผสมไนโตรวินที่เตรียมขึ้น

และยืนยันผลการทดสอบด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อยืนยันว่าผลการทดสอบมีความถูกต้อง เชื่อถือได้ เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ไนโตรวินเบื้องต้นในอาหารสัตว์ ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการทดสอบประสิทธิภาพ (ring test) การตรวจวิเคราะห์ชนิดยาในอาหารสัตว์เบื้องต้นของห้องปฏิบัติการภูมิภาค

1. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีและเพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจหาไนโตรวินในอาหารสัตว์ โดยวิธี screening test ให้เกิดความเชื่อมั่นและมีผลการวิเคราะห์ที่สามารถยอมรับได้

2. ขอบข่าย

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบไนโตรวินในอาหารสัตว์ด้วยวิธี screening test โดยมีอาหารไก่เป็นตัวแทนและตรวจหาปริมาณไนโตรวินโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบไนโตรวินในอาหารไก่โดยวิธี screening test ว่ามีความเหมาะสมสำหรับการคัดกรองยาในอาหารสัตว์ และทราบระดับความเข้มข้นต่ำสุด และค่า cut-off limit ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ เพื่อให้มีค่าใกล้เคียงกับค่าขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification: LOQ) และเกิดความน่าเชื่อถือของวิธี screening test มากขึ้น

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

4.1.1 วิธี screening Test

- 4.1.1.1 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Stereomicroscope)
- 4.1.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic balance)
- 4.1.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Electronic balance)
- 4.1.1.4 เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (3D mixer)
- 4.1.1.5 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 4.1.1.6 ถุงมือ (Gloves)
- 4.1.1.7 จานหลุม (Spot plate)

- 4.1.1.8 จานแก้วเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 4.1.1.9 ซองลามิเนตฟอยล์
- 4.1.1.10 ซองลามิเนตใส
- 4.1.2 วิธี Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)
 - 4.1.2.1 เครื่อง LC-MS/MS
 - 4.1.2.2 เครื่องไฟฟ้าชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Electronic balance)
 - 4.1.2.3 เครื่องเขย่าตัวอย่าง (Shaker)
 - 4.1.2.4 เครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic bath)
 - 4.1.2.5 เครื่องระเหยสารแบบไนโตรเจน (Nitrogen evaporator)
 - 4.1.2.6 ตู้ดูดควัน (Fume hood)
 - 4.1.2.7 ชุดกรองเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase filtration kit)
 - 4.1.2.8 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10-100, 100-1000 ไมโครลิตร และ 1-10 มิลลิลิตร
 - 4.1.2.9 เครื่องจ่ายสารละลาย (Dispenser) ขนาด 50 มิลลิลิตร
 - 4.1.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
 - 4.1.2.11 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
 - 4.1.2.12 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
 - 4.1.2.13 คอลัมน์ (Column) C18 ขนาด 100 × 3.1 มิลลิเมตร, 2.6 ไมโครเมตร
 - 4.1.2.14 กระบอกฉีดยา (Disposable syringe) ขนาด 3 มิลลิลิตร
 - 4.1.2.15 Syringe membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร
 - 4.1.2.16 ขวดแก้วใส่สารตัวอย่าง (Glass vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร
 - 4.1.2.17 ปิเปตทิป (Pipette tip) ขนาด 10-100 และ 100-1000 ไมโครลิตร
 - 4.1.2.18 พาราฟิล์ม (Parafilm)
 - 4.1.2.19 แผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
- 4.2 สารมาตรฐาน/สารเคมี
 - 4.2.1 สารมาตรฐานไนโตรวิน (Nitrovin hydrochloride; NIV) ความบริสุทธิ์ 98.32% (g/g)
 - 4.2.2 น้ำยา Nitro 1
 - 4.2.3 น้ำยา Nitro 2
 - 4.2.4 กรดฟอร์มิก (Formic acid)
 - 4.2.5 อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile)

4.2.6 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water; DI)

5. วิธีดำเนินการ

5.1 ศึกษาข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงและวางแผนการทดลอง

จากข้อมูลเดิมระบุว่า วิธี screening test สามารถใช้ตรวจสอบสารไนโตรวินในอาหารสัตว์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10 mg/kg จึงใช้กำหนดความเข้มข้นในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยเพิ่มสารมาตรฐาน 5 ระดับความเข้มข้น คือ 10 8 5 3 และ 1 mg/kg จากนั้นทดสอบคุณลักษณะแสดงสมรรถนะของวิธีทดสอบ (performance characteristics) ของวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ ซึ่งประกอบด้วย ค่าความจำเพาะ (specificity) และ ค่าความไว (sensitivity) ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และค่า limit of detection (LOD) และ cut-off limit ของสารไนโตรวินตาม B.Magnusson และ U.Ornemark (2014)

5.2 การเตรียมอาหารสัตว์ผสมสารไนโตรวิน

ตัวอย่างสัตว์ที่ใช้การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในครั้งนี้ใช้อาหารไก่ เป็นตัวแทนของอาหารสัตว์ โดยนำตัวอย่างอาหารไก่ที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี screening test และเทคนิค LC-MS/MS แล้วว่าไม่พบสารไนโตรวิน มาผสมกับสารไนโตรวิน ที่ความเข้มข้น 50 mg/kg จำนวน 1,000 กรัม โดยปริมาณสารไนโตรวินที่ใช้เริ่มต้นมีวิธีการคำนวณดังนี้

เตรียมอาหารไก่ผสมสารไนโตรวิน 50 mg/kg จำนวน 1,000 กรัม ต้องใช้สารมาตรฐานไนโตรวินจำนวน 0.05 กรัม แต่เนื่องจากสารมาตรฐานอยู่ในรูปของ $C_{14}H_{12}N_6O_6 \cdot HCl$ (MW 396.74) และมีความบริสุทธิ์ 98.32% (w/w) ดังนั้น

ถ้ามีเนื้อสาร $C_{14}H_{12}N_6O_6$ 360.28 กรัม ใน $C_{14}H_{12}N_6O_6 \cdot HCl$ 396.74 กรัม

ต้องการเตรียมเนื้อสาร $C_{14}H_{12}N_6O_6$ 0.05 กรัม ต้องใช้ $C_{14}H_{12}N_6O_6 \cdot HCl$ 0.05506 กรัม

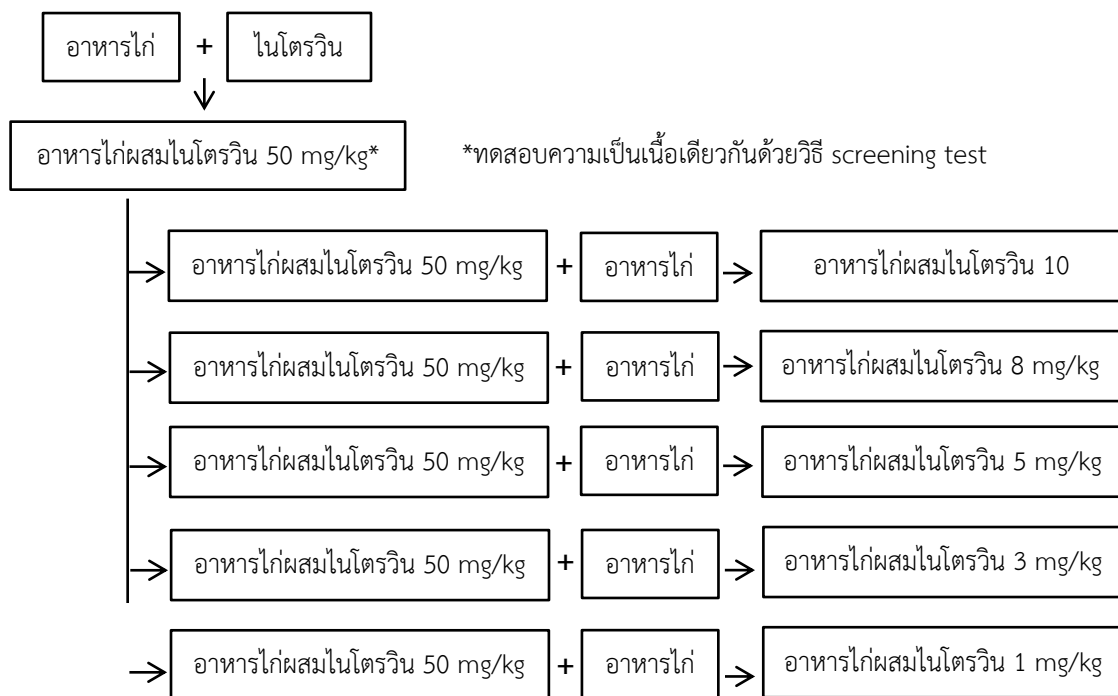
ความบริสุทธิ์ (Purity) 98.32%

ถ้ามีเนื้อสาร $C_{14}H_{12}N_6O_6 \cdot HCl$ 98.32 กรัม ในสาร 100 กรัม

ต้องการเนื้อสาร $C_{14}H_{12}N_6O_6$ 0.05506 กรัม ต้องใช้สาร 0.0560 กรัม

ดังนั้น การเตรียมตัวอย่างอาหารไก่ผสมไนโตรวิน 50 mg/kg จำนวน 1,000 กรัม ต้องชั่งสารมาตรฐานไนโตรวินน้ำหนัก 0.0560 กรัม ผสมกับอาหารไก่ด้วยวิธี gradual mixing 2-fold trituration

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสารไนโตรวิน 50 mg/kg ที่เตรียมได้ ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยวิธี screening test เพื่อนำอาหารสัตว์ดังกล่าว ไปเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 10 8 5 3 และ 1 mg/kg ต่อไป ดังรูปที่ 1 และ ตารางที่ 5



รูปที่ 2 การเตรียมอาหารไก่ผสมสารไนโตรวิน

ตารางที่ 1 วิธีเตรียมตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินแต่ละระดับความเข้มข้น

น้ำหนักสารตั้งต้น	น้ำหนักอาหารไก่ที่ผสม	ตัวอย่างที่เตรียมได้
สารไนโตรวิน 0.056 กรัม	999.944 กรัม	อาหารไก่ผสม NIV 50 mg/kg จำนวน 1,000 กรัม
อาหารไก่ผสม NIV 50 mg/kg จำนวน 50 กรัม	200 กรัม	อาหารไก่ผสม NIV 10 mg/kg จำนวน 250 กรัม
อาหารไก่ผสม NIV 50 mg/kg จำนวน 240 กรัม	1,260 กรัม	อาหารไก่ผสม NIV 8 mg/kg จำนวน 1500 กรัม
อาหารไก่ผสม NIV 50 mg/kg จำนวน 25 กรัม	225 กรัม	อาหารไก่ผสม NIV 5 mg/kg จำนวน 250 กรัม
อาหารไก่ผสม NIV 50 mg/kg จำนวน 15 กรัม	235 กรัม	อาหารไก่ผสม NIV 3 mg/kg จำนวน 250 กรัม
อาหารสัตว์ผสม CBX 25 mg/kg จำนวน 12 กรัม	588 กรัม	อาหารไก่ผสม NIV 1 mg/kg จำนวน 600 กรัม

ตรวจตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินความเข้มข้น 1 3 5 8 และ 10 mg/kg เพื่อวิเคราะห์หาค่า cut-off limit และระดับความเข้มข้นต่ำสุด (limit of detection: LOD) ด้วยวิธี screening test โดยเจ้าหน้าที่งานกายภาพ จำนวน 10 คน ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

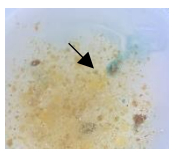
5.3 ขั้นตอนการทดสอบสารไนโตรวินด้วยวิธี screening test

5.3.1 หยดสารละลาย Nitro 1 และ Nitro 2 ในอัตราส่วน 9:1 ลงในจานหลุม

5.3.2 ใช้ซ็อนตักสาร ตักตัวอย่างอาหารไก่โรยกระจายลงในจานหลุมลงในสารละลาย Nitro 1 และ Nitro 2

5.3.3 สังเกตสีของตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

5.3.4 กรณีที่มีสารไนโตรวิน จะเกิดสีจุดสีฟ้าขึ้นทันที (+NIV) ดังรูปที่ 2 หากไม่มีสารไนโตรวินจะไม่มี การเปลี่ยนแปลง (-NIV)



รูปที่ 2 ผลบวกของไนโตรวิน (+NIV) เกิดสีฟ้าทันที

5.4 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารไนโตรวินในตัวอย่างอาหารไก่ด้วยวิธี LC-MS/MS

5.4.1 ชั่งตัวอย่างอาหารไก่ผสมไนโตรวินและ sample blank ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาณ 10.00 ± 0.05 g

5.4.2 เติม acetonitrile ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และพาราฟิล์มให้สนิท นำไปแช่เย็นเป็นเวลา 30 นาที

5.4.3 เทสารละลายลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที

5.4.4 กรองสารละลายส่วนบนผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ลงใน glass vial

5.4.5 เจือจางด้วยกรดฟอร์มิก 0.1% ในน้ำ DI ให้มีความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงการใช้งาน (working range) ระหว่าง 0.05 – 1.00 mg/kg

5.4.6 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้กรดฟอร์มิก 0.1% ในน้ำ DI และอะซิโตนไนไตรล์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และคอลัมน์ C18 เป็นเฟสคงที่ (stationary phase)

5.5 การคำนวณคุณลักษณะเฉพาะแสดงสมรรถนะของวิธีทดสอบ (performance characteristics)

5.5.1 ค่า Limit of detection (LOD) ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ คือ ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ผู้ทดสอบสามารถตรวจพบได้ โดยประเมินผ่านการมองเห็นของผู้ทดสอบ ซึ่งสามารถหาได้โดยการสร้างกราฟ

ระหว่างร้อยละของการให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง (Positive response rate) และค่าความเข้มข้นของสารที่ระดับต่างๆ

5.5.2 ค่า Cut-of limit หรือ Cut-off concentration คือระดับความเข้มข้นของสารที่ผู้ทดสอบสามารถให้ผลทดสอบถูกต้อง 100% และมีค่า False positive ต่ำ เช่น 5% หรือกล่าวได้ว่าเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ผู้ทดสอบสามารถให้ผลการทดสอบถูกต้องที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสามารถหาได้จากการสร้างกราฟระหว่าง ร้อยละของการให้ผลทดสอบที่ถูกต้อง (Positive response rate) และค่าความเข้มข้นของสารที่ระดับต่างๆ

5.5.3 คำนวณหา False positive rate และ False negative rate ตามสมการดังนี้

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

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

5.5.4 คำนวณค่า Sensitivity rate และ Specificity rate ตามสมการดังนี้

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

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

False positive (fp) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวกปลอม

False negative (fn) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นลบปลอม

True positive (tp) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวกจริง

True negative (tn) คือ จำนวนตัวอย่างที่เป็นลบจริง

5.6 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวิน

5.6.1 นำตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินแบ่งใส่ถุง ถุงละ 25 กรัม จำนวน 50 ถุง

5.6.2 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยทำการสุ่มตัวอย่างออกมา 20 ถุง ทดสอบด้วยวิธี screening test 10 ถุง จำนวน 3 ซ้ำและทดสอบด้วยเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 10 ถุง

5.6.3 ทดสอบความคงตัว โดยทดสอบทั้งหมด 5 ครั้ง ที่ระยะเวลา 7 14 30 45 และ 60 วัน เมื่อครบระยะเวลา สุ่มตัวอย่างจำนวน 6 ถุง ทดสอบด้วยวิธี screening test จำนวน 3 ซ้ำ และอีก 3 ถุง ทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS จำนวน 2 ซ้ำ

6. ผลการทดลอง

6.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารไก่ สำหรับเตรียมเป็นตัวอย่างตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ผลการตรวจวิเคราะห์สารไนโตรวินในอาหารไก่ ที่ใช้เป็นตัวแทนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในครั้งนี้ ด้วยวิธี screening test และวิธี LC-MS/MS ไม่พบสารไนโตรวินในตัวอย่างอาหารไก่ สามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างแบบลงคี่ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในครั้งนี้ได้

6.2 ผลการเตรียมตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินความเข้มข้น 50 mg/kg

ความเข้มข้นของสารไนโตรวินที่ใช้เตรียมในครั้งนี้อยู่ที่ 50 mg/kg ซึ่งสูงกว่าช่วงการใช้งาน (working range) ของวิธี confirmation ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่อยู่ระหว่าง 0.05 – 1.00 mg/kg ถึง 50 เท่า หากใช้วิธี LC/MS-MS ทดสอบอาจส่งผลกับประสิทธิภาพของเครื่องมือ จึงใช้วิธี screening test ในการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของอาหารไก่ที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้ โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 10 คน ผลที่ได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของอาหารไก่ที่ผสมสารไนโตรวิน 50 mg/kg ด้วยวิธี screening Test

จำนวน	ผู้ทดสอบ										รวม
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ผลบวก/ซ้ำ	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	100/100

หมายเหตุ ผลบวก หมายถึง เกิดสีฟ้า

จากตารางที่ 3 อาหารไก่ที่ผสมสารไนโตรวิน 50 mg/kg มีความเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อทดสอบด้วยวิธี screening test จึงใช้ตัวอย่างดังกล่าวสำหรับเตรียมให้มีความเข้มข้นของไนโตรวินที่ระดับ 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg ต่อไป

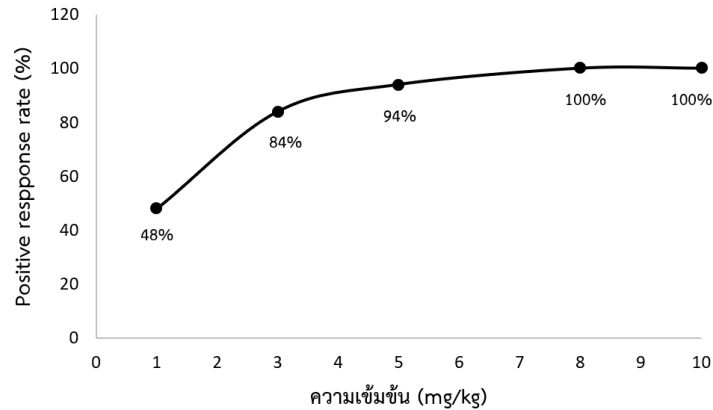
6.3 ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg

ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารไก่สารไนโตรวินความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg ให้ผลทดสอบและข้อมูลคุณลักษณะเฉพาะแสดงสมรรถนะของวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบและค่า Performance characteristics ที่วิเคราะห์ได้ของอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี screening test

Performance characteristics	อาหารไก่ผสมสารไนโตรวินความเข้มข้น (mg/kg)					
	0	1	3	5	8	10
Positive/Negative	0/100	48/52	84/16	94/6	100/0	100/0
True positive (t_p)	0	48	84	94	100	100
True negative (t_n)	100	0	0	0	0	0
False positive (f_p)	0	0	0	0	0	0
False negative (f_n)	0	52	16	6	0	0
Positive response rate (%)	0	48	84	94	100	100
False positive rate (%)	0	-	-	-	-	-
False negative rate (%)	-	52	16	6	0	0
Sensitivity rate (%)	-	48	84	94	100	100
Specificity rate (%)	100	-	-	-	-	-

จากตารางที่ 4 พบว่าอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินที่ระดับความเข้มข้น 8 และ 10 mg/kg ผู้ทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ผลได้ถูกต้องทั้งหมดคิดเป็น 100% และที่ระดับความเข้มข้น 1, 3 และ 5 mg/kg ผู้ทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง 48, 84 และ 94% ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากตาราง 4 มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Positive response rate เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารไนโตรวิน (mg/kg) ที่ระดับต่างๆ ดังรูปที่ 3 จะพบว่าระดับความเข้มข้นของสาร ไนโตรวิน ในอาหารไก่ที่ต่ำที่สุดที่ผู้ทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ได้คือ 1 mg/kg ดังนั้น ค่า LOD จึงเท่ากับ 1 mg/kg และระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ผู้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างถูกต้อง และมีค่า false negative rate ต่ำกว่า 5% คือ 8 mg/kg จึงกล่าวได้ว่า ค่า cut-off limit ของวิธีตรวจสอบความใช้ได้ครั้งนี้ เท่ากับ 8 mg/kg



รูปที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Positive response rate เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสาร ไนโตรวิน (mg/kg) ในอาหารไก่ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg

จากการคำนวณคุณลักษณะเฉพาะแสดงสมรรถนะของวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ พบว่าอาหารไก่ที่ผสมยาไนโตรวิน ความเข้มข้น 8 และ 10 mg/kg มี %sensitivity rate เท่ากับ 100% นั่นคือผู้ทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ผลได้ถูกต้องทั้งหมด 100% โดยไม่มี false negative rate สำหรับความเข้มข้น 1, 3 และ 5 mg/kg พบว่ามี %sensitivity rate เท่ากับ 48, 84 และ 94% ตามลำดับ และมี false negative rate เท่ากับ 52, 16 และ 6% ตามลำดับ แสดงถึงผู้ทดสอบส่วนใหญ่สามารถวิเคราะห์ผลได้แต่ยังไม่ถูกต้องทั้งหมด สำหรับ %Specificity rate ในการทดสอบครั้งนี้ไม่สามารถหาค่าได้ตามสมการ 4 เนื่องจากไม่มี true negative และ false positive

6.4 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

6.4.1 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

จากการทดสอบตัวอย่างอาหารไก่สารไนโตรวินความเข้มข้น 8 mg/kg ด้วยวิธี screening test จำนวน 10 ถุง ถุงละ 3 ซ้ำ พบว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อนำตัวอย่างอาหารไก่ชุดเดียวกัน ทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 8 mg/kg จำนวนความเข้มข้นละ 10 ถุง ถุงละ 2 ซ้ำ ผลที่ได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ตัวอย่าง ที่	ค่าเฉลี่ย mg/kg (%Recovery rep.1, rep.2)	
	1 mg/kg	8 mg/kg
1	0.869 (85, 89)	6.93 (86, 87)
2	0.894 (89, 80)	6.73 (84, 85)
3	0.930 (93, 93)	6.40 (83, 86)
4	0.818 (81, 83)	6.53 (82, 82)
5	0.836 (88, 85)	6.68 (82, 85)
6	0.980 (93, 103)	6.81 (83, 87)
7	0.973 (90, 104)	6.77 (83, 86)
8	0.958 (90, 101)	6.82 (85, 86)
9	0.970 (94, 100)	6.66 (83, 84)
10	0.862 (85, 88)	6.71 (82, 86)
Avg	0.909	6.74
SD	0.06	0.11

จากตารางที่ 5 ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ทั้งสองระดับความเข้มข้น คือ 1 และ 8 mg/kg มี %Recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ในช่วง 80–110% (AOAC, 2019) เมื่อนำค่าเฉลี่ยของข้อมูลแต่ละความเข้มข้นทดสอบด้วย Grubb's test เพื่อหา outlier พบว่า ค่า G ที่คำนวณได้ (G_{exp}) น้อยกว่าค่า G วิฤต (G_{crit}) แสดงว่าการทดสอบไม่มีนัยสำคัญ ไม่มีข้อมูลที่เป็น outlier ดังนั้นสามารถนำผลการวิเคราะห์ทั้งหมดมาคำนวณค่าทางสถิติได้ โดย one-way ANOVA ให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย one-way ANOVA ของตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวิน ความเข้มข้น 1 และ 8 mg/kg โดยวิธี LC-MS/MS

Source of Variation	Result of ANOVA for homogeneity test	
	1 mg/kg	8 mg/kg
F_{exp}	2.948534	1.021497
p-value	0.536404	0.482673
F_{crit}	3.020383	3.020383
Result ($F_{exp} < F_{crit}$)	Pass	pass

จากตารางที่ 6 พบว่าค่า F ที่คำนวณได้ $F_{exp} < F_{crit}$ แสดงว่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารไนโตรวินทั้ง 10 ตัวอย่างทั้งระดับความเข้มข้น 1 และ 8 mg/kg ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้น ตัวอย่างอาหารไก่สารไนโตรวินความเข้มข้น 1 และ 8 mg/kg ที่เตรียมได้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน

6.4.2 ผลการทดสอบความคงตัว

การทดสอบความคงตัวของตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินความเข้มข้น 8 mg/kg ช่วงเวลา 7, 14, 30, 45 และ 60 วัน เปรียบเทียบกับวันแรกที่เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี screening test ครั้งละ 3 ถูง จำนวน 3 ซ้ำ จากการทดสอบความคงตัวของตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินความเข้มข้น 8 mg/kg ที่ตรวจวัดด้วยวิธี LC-MS/MS ในช่วง 7, 14, 30, 45 และ 60 วัน ครั้งละ 3 ถูง จำนวน 2 ซ้ำ ข้อมูลปริมาณที่ตรวจวัดได้สามารถนำมาคำนวณค่าทางสถิติ ให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของตัวอย่างอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินความเข้มข้น 8 mg/kg ระยะเวลา 7, 14, 30, 45 และ 60 วัน

ระยะเวลา (วัน)	Mean (mg/kg)	variance	F-test			t-test		
			d _f	F _{crit}	F _{exp}	d _f	t _{crit}	t _{exp}
7	6.721	0.031	2,9	5.715	2.788	11	2.201	-0.192
14	6.752	0.032	2,9	5.715	2.890	11	2.201	0.200
30	6.883	0.059	2,9	5.715	5.247	11	2.201	1.574
45	6.802	0.016	2,9	5.715	1.432	11	2.201	0.908
60	6.800	0.049	2,9	5.715	4.311	11	2.201	0.721

จากการทดสอบด้วยเทคนิค LC-MS/MS และวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA ให้ผลการทดสอบความแปรปรวนของตัวอย่างในระยะเวลา 7, 14, 30, 45 และ 60 วัน เปรียบเทียบกับวันแรก (Day 0) ที่เตรียมตัวอย่าง โดยการทดสอบแบบเอฟ (F-test) พบว่าค่า $F_{exp} < F_{crit}$ แสดงว่าความแปรปรวนของความเข้มข้นสารไนโตรวินที่ระยะเวลา 7, 14, 30, 45 และ 60 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับความแปรปรวนของความเข้มข้นสารไนโตรวินในอาหารไก่ที่เตรียมได้ในวันแรก (Day 0) จากนั้นนำไปทดสอบแบบที (t-test) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นสารไนโตรวินในตัวอย่าง ที่ระยะเวลา 7, 14, 30, 45 และ 60 วัน กับวันแรกที่เตรียมตัวอย่าง พบว่าค่า $t_{exp} < t_{crit}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นสารไนโตรวินในอาหารไก่ แต่ละช่วงเวลาเปรียบเทียบกับวันแรกที่เตรียม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหารไก่ผสมสารไนโตรวินความเข้มข้น 8 mg/kg มีความคงตัวตลอดระยะเวลา 60 วัน

7. สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารไนโตรวินในอาหารสัตว์ โดยวิธี screening test ซึ่งใช้อาหารไก่เป็นตัวแทนของตัวอย่างอาหารสัตว์ และมีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี gradual mixing with 2-fold trituration โดยใช้เครื่องผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อทดสอบตัวอย่างอาหารไก่ผสมไนโตรวินความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 mg/kg โดยผู้ทดสอบงานกายภาพ 10 คน พบว่า มีค่า LOD เท่ากับ 1 mg/kg และค่า cut-off limit เท่ากับ 8 mg/kg จากนั้นนำตัวอย่างที่ความเข้มข้น 8 mg/kg ซึ่งเป็นค่า cut-off limit ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีครั้งนี้ และความเข้มข้นที่ 1 mg/kg มาทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS เพื่อวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรวินในอาหารสัตว์ พบว่า ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้มี %Recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับช่วง 80-100 % เมื่อนำมาทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันด้วยวิธี screening test และ LC-MS/MS พบว่าตัวอย่างอาหารไก่ผสมไนโตรวินความเข้มข้น 1 และ 8 mg/kg ที่เตรียมได้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน การทดสอบความคงตัวของตัวอย่างด้วยวิธี LC-MS/MS พบว่าสารไนโตรวินในอาหารไก่มีความคงตัวตลอดระยะเวลา 60 วัน

8. ข้อเสนอแนะ

วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี gradual mixing with 2-fold trituration สามารถเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยาให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งเหมาะสมที่จะใช้ในการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยาในการทดสอบประสิทธิภาพห้องปฏิบัติการ (ring test) ต่อไป

9. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และนางสาวรยรินทร์ นาคประดิษฐ์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวก และดำเนินการเตรียมตัวอย่างสำหรับนำมาทดสอบ ขอขอบคุณนายศิริวัฒน์ رایณะสุข นางสาวพรเพ็ญ เจียมประสูตร์ และนางสาวกัญฐิกา แสงสายัณห์ รวมถึงบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (งานสารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ให้คำแนะนำ เอื้อเพื่ออุปกรณ์การเตรียมตัวอย่าง และดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค LC-MS/MS และขอขอบคุณ

บุคลากรงานกายภาพ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่คอยให้คำแนะนำช่วยเหลือ และดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในครั้งนี้ ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเสมอมา

10. เอกสารอ้างอิง

- แพรวพรรณ ห่องทองแดง, ตรุณี กอเซาะ และมนวิภา จารุตามระ. (2548). *การพัฒนาชุดตรวจสอบชนิดยาในอาหารสัตว์: Nitro Test kit*. เลขทะเบียนผลงาน 48(2)–0715–088.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559. (2559). *ราชกิจจานุเบกษา*. เล่ม 133 ตอนพิเศษ 18. หน้า 27.
- ศิริวัฒน์ رایณะสุข, วรัญญา แก้วทิพย์, เอกชา ตนานนท์ชัย, สุนีย์ คณาพิพัฒน์, พรเพ็ญ เจียมประสุตร์, กัญธิกา แสงสายัณห์ และนารีนารถ เฒ่าอุตม. (2566). *การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารไนโตรวินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS*. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. <https://qcontrol.dld.go.th/index.php/th/2023-06-12-02-47-06/2023-06-26-06-24-11/398-2566>.
- Zhang, Y. *et al.* (2016). Determination of nitrofurans metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 192, 612–617.
- Tao, Y. *et al.* (2010). Determination of sodium nifurstyrenate and Nitrovin residues in edible food by liquid chromatography–tandem mass spectrometry after ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography B*, 878(32), 3415–3420.
- Valera-Tarifa, N.M. *et al.* (2013). Determination of nitrofurans metabolites in seafood by ultra high performance liquid chromatography coupled to Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), 86–93.
- Wang, Jinrong, Fu, Z. and Wang, Jinjin (2009). Improving the determination of Nitrovin in feeds by reversed–phase LC with SPE. *Chromatographia*, 70(7–8), 1259–1263.
- Wang, J.R. and Zhang, L.Y. (2006). Simultaneous determination and identification of Furazolidone, Furaltadone, nitrofurazone, and Nitrovin in feeds by HPLC and LC–MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29(3), 377–390.
- Magnusson, B. and Ornemark, U. (eds.). (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed.). Eurachem.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., Barceló, D. *et al.* (2002). *Metrology of qualitative chemical analysis: Project report EUR 20605* (BCR Information ed.) European Commission.

- Trullols, E., Ruisánchez, I., and Rius, F. X. (2004). Validation of qualitative analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(2), 137–145.
- Pum, J. (2019). A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Advances in Clinical Chemistry*, 215–281.
- AOAC Official Methods of Analysis. (2019). *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. Appendix F, 9
- Boddy, R., and Smith, G. (2010). *Effective experimentation: For scientists and Technologists*. John Wiley.