

## การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

วรัญญา แก้วทิพย์ ศิริวัฒน์ รายนะสุข เอกษา ตนานนท์ชัย สุนีย์ คณาพิพัฒน์  
พยุงค์ศักดิ์ ภัคมี กัญฐิกา แสงสายัณห์ สายสุตา พุทไธสง

### บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM เตรียมตัวอย่างโดยการสกัดตัวอย่างด้วยเมทานอล จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิดร้อยละ 0.1 กรดฟอร์มิกในน้ำปราศจากไอออน และอะซิโตนไตริล ใช้คอลัมน์ชนิด  $C_{18}$  และสถานะของแมสสเปคโตรเมทรีแบบ ESI negative mode ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซน พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 30 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $r^2$ ) ของสารร็อกซาร์โซน เท่ากับ 0.9998 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เท่ากับ 10 และ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารร็อกซาร์โซน ที่ระดับ 30, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 98.74, 100.52 และ 102.86 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารร็อกซาร์โซน ที่ระดับ 30, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 2.65, 2.32 และ 1.12 ตามลำดับ และทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของสารร็อกซาร์โซนที่ระดับ 30, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 3.23, 4.24 และ 1.77 ตามลำดับ จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้น วิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ ที่ระดับความเข้มข้น 30 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

**คำสำคัญ :** สารร็อกซาร์โซน, การตรวจสอบความใช้ได้, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Warunya Kaewthip   Siriwat Rainasuk   Aekkacha tananonchai   Sunee Kanapipat  
Phayungsak Phakmee   Kantika Sangsayunh   Saisuda Phutthaisong

### Abstract

In-house method for the determination of roxarsone in animal feed with LC-MS/MS was validated according to EURACHEM Guide. The samples were extracted with methanol analyzed by LC-MS/MS. The analysis was carried out using the mobile phase of 0.1% formic acid in deionization (DI water) and acetonitrile on a C<sub>18</sub> column and ESI negative mode of mass spectrometry condition. The results of method validation of roxarsone were found that the calibration curve at the level 30 – 1,000 ug/kg were good linear; the correlation of determination ( $r^2$ ) of roxarsone were 0.9998. Limit of detection and limit of quantitation were 10 and 30 ug/kg, respectively. The mean %recovery of roxarsone at the level 30, 500 and 1,000 ug/kg were 98.74, 100.52 and 102.86 respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 30, 500 and 1,000 ug/kg of roxarsone were 2.65, 2.32 and 1.12 respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility at the level 30, 500 and 1,000 ug/kg of Florfenicol were 3.23, 4.24 and 1.77 respectively. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of roxarsone in animal feed at the level 30 – 1,000 ug/kg.

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

---

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

## การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

วรัญญา แก้วทิพย์ ศิริวัฒน์ รายนะสุข เอกชา ตนานนท์ชัย สุนีย์ คณาพิพัฒน์  
พยุงค์ศักดิ์ ภัคมี กัญธิกา แสงสายัณห์ สายสุตา พุทโรสง

### บทนำ

ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) มีคุณสมบัติในการฆ่าหรือหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย สามารถใช้ในการควบคุมโรคหรือป้องกันโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์ นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะบางชนิดยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ได้ด้วย (วรรณพร, 2557) ในการเลี้ยงสัตว์แบบอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นการเลี้ยงสัตว์จำนวนมากในพื้นที่จำกัดทำให้เกิดโรคระบาดได้ง่าย จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะเสริมลงไปในการเลี้ยงสัตว์เพื่อลดการเจริญของเชื้อก่อโรค และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต (ชัยวัฒน์ และ วรรณพร, 2557) หากมีการใช้ยาเหล่านี้อย่างไม่ถูกต้องอาจทำให้เกิดเชื้อดื้อยาในสัตว์และนำไปสู่การเกิดเชื้อดื้อยาที่ใช้ในคนได้ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการตกค้างของยาในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ได้แก่ เกิดอาการข้างเคียงของยา เกิดการแพ้ยา และอาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ ตลอดจนเกิดการปนเปื้อนของยาสู่สิ่งแวดล้อมด้วย (ใจพร, 2555)

ร็อกซาร์โซน (Roxarsone) หรือ 3-nitro-4-hydroxyarsonephenylarsonic acid เป็นสารประกอบอาร์เซนิกอินทรีย์ และได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) ในปี ค.ศ. 1944 ให้ใช้ในอาหารสัตว์ปีกเพื่อป้องกันโรคบิด กระตุ้นการเจริญเติบโต เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารสัตว์ และปรับปรุงสีของเนื้อสัตว์ (Fisher *et al.*, 2015) ร็อกซาร์โซนอยู่ในรูปสารประกอบอาร์เซนิกอินทรีย์ที่มีพิษต่ำ เมื่อสัตว์ได้รับสารร็อกซาร์โซนเข้าไปในร่างกายจะถูกขับออกมาทางอุจจาระและปัสสาวะโดยร็อกซาร์โซนจะไม่มีการเปลี่ยนรูปเมื่ออยู่ในร่างกายของสัตว์ แต่เมื่อร็อกซาร์โซนออกสู่สิ่งแวดล้อมหรือบนผิวดินจะถูกเปลี่ยนสภาพอย่างรวดเร็วโดยกระบวนการทางชีวภาพและกายภาพกลายเป็นสารประกอบของอาร์เซนิก โดยหากกลายเป็นสารประกอบของอาร์เซนิกอนินทรีย์ เช่น arsenite (AsIII) และ arsenate (AsV) จะทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ ซึ่งการได้รับสารอาร์เซนิกอนินทรีย์เป็นเวลานานทำให้เกิดมะเร็งปอด มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และมะเร็งผิวหนัง และยังส่งผลต่อสุขภาพอีกหลายประการ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวานประเภทที่ 2 ภาวะบกพร่องทางสติปัญญา รวมถึงมีผลกระทบต่อการทำงานของ (Nachman *et al.*, 2013)

ในปี ค.ศ. 2011 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) ได้เผยแพร่ผลการศึกษาที่พบว่ามียาอันตรายเกิดสารหนูอนินทรีย์ที่ก่อมะเร็งในตับของไก่ที่ได้รับสารร็อก

ซาร์โซน นอกจากนี้ความกังวลเกี่ยวกับมลพิษจากอาร์เซนิกหรือสารหนูในสิ่งแวดล้อมและสารตกค้างของอาร์เซนิกในไก่ทำให้สารเติมแต่งอาหารสัตว์ที่มีสารร็อกซาร์โซนถูกห้ามใช้ในประเทศจีน สหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา แต่ยังคงมีการใช้สารร็อกซาร์โซนในหลายประเทศ เช่น ออสเตรเลีย บราซิล และอินเดีย (Liu *et al.*, 2022)

ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค

LC-MS/MS และเพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล จึงต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ อ้างอิงวิธีทดสอบจาก Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol.404(8), September 2012 โดยดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014) เพื่อแสดงว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธี และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

### 2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

### 3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS
2. ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017
3. ใช้ในการเฝ้าระวังการใช้ยาปฏิชีวนะในการผลิตปศุสัตว์

### 4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

#### 4.1 การทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารร็อกซาร์โซนที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 30, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4.1.2 เตรียม fortified sample โดยเติมสารละลายมาตรฐานของสารร็อกซาร์โซน ที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 30, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4.1.3 เปรียบเทียบค่า response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับ matrix standard จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น และประเมิน matrix effect (ME) เกณฑ์การยอมรับต้องไม่เกิน  $\pm 20\%$  (Sante, 2021)

$$ME(\%) = \left( \frac{R_{\text{std in matrix extract}}}{R_{\text{std in solvent}}} - 1 \right) \times 100$$

โดยที่ R = detector response

4.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐาน และทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (working range) ดังนี้

4.2.1 ทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนจำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 30, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.2.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนและพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า correlation of determination ( $r^2$ ) ไม่น้อยกว่า 0.995

4.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantitation; LOQ) ดังนี้

4.3.1 ทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่ทดสอบได้ มาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของสารแต่ละชนิดจาก  $LOD = 3S'_0$  และ  $LOQ = 10S'_0$

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

เมื่อ  $S_0$  = standard deviation จากการทดสอบซ้ำ

$n$  = จำนวนทดสอบซ้ำในงาน routine

$S'_0$  = standard deviation สำหรับคำนวณค่า LOD และ LOQ

4.3.2 ทำการยืนยันค่า LOD โดยทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า signal to noise ratio (S/N)  $\geq 3$  และ Ion ratio ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่ทดสอบได้ มาประเมินความแม่นยำและความเที่ยงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2019) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.4 การทดสอบหาความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.4.1 ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) ของวิธีทดสอบ โดยทดสอบตัวอย่าง sample blank และ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 30 (LOQ), 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.4.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (with-in laboratory reproducibility) ของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน ทดสอบต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน แต่ละวันจะทำการทดสอบตัวอย่าง sample blank และ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 30 (LOQ), 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.4.3 ประเมินความแม่นยำ โดยการคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนได้ (%recovery) ของแต่ละความเข้มข้นว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2019)

4.4.4 ประเมินความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD<sub>r</sub>) ของความเข้มข้นสารที่ทดสอบได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD<sub>r</sub>)

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

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.4.5 ประเมินความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD<sub>R</sub>) ของความเข้มข้นสารที่ทดสอบได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD<sub>R</sub>)

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

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.5 การทดสอบ selectivity และ specificity

4.5.1 เตรียมตัวอย่าง sample blank จำนวน 3 ซ้ำ

4.5.2 เตรียมตัวอย่าง fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารร็อกซาร์โซน ความเข้มข้นที่ระดับ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

4.5.3 เตรียมตัวอย่าง fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารร็อกซาร์โซน ความเข้มข้นที่ระดับ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเติมสารละลายมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ ซึ่งสงสัยว่าจะรบกวนการทดสอบ ที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ขั้ว

4.5.4 นำตัวอย่างข้อ (4.4.1-4.4.3) ทำการทดสอบด้วยวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

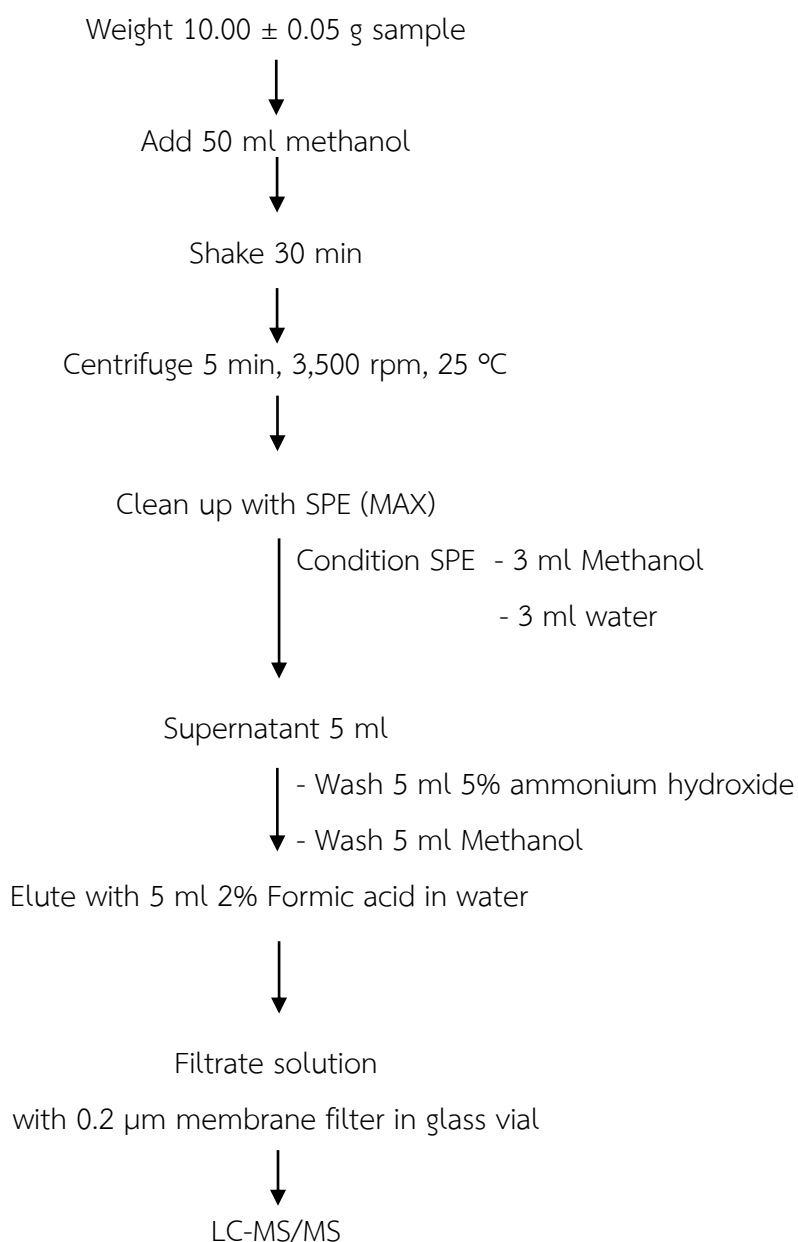
4.5.5 เปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank (ข้อ 4.4.1) และ fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารร็อกซาร์โซนว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใน matrix ของ sample blank

4.5.6 เปรียบเทียบผลการทดสอบ fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารร็อกซาร์โซน กับ spike sample (ข้อ 4.4.3) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารร็อกซาร์โซน และเติมสารละลายมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ ว่าพบ peak ของสารซัลโฟนาไมด์ ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับสารร็อกซาร์โซน หรือมี peak ของสารซัลโฟนาไมด์ รบกวน peak ของสารร็อกซาร์โซนหรือไม่

#### 4.6 ทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (ruggedness; major change)

ทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 30 (LOQ), 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ขั้ว โดยเปรียบเทียบว่าวิธีทดสอบสารกลุ่มร็อกซาร์โซนในตัวอย่างอาหารไก่ สามารถนำไปใช้ทดสอบในอาหารสุกรได้หรือไม่ ซึ่งเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนจากตัวอย่างอาหารสัตว์ที่แตกต่าง (F-test) โดยเปรียบเทียบความแปรปรวนที่คำนวณได้ ( $F_{cal}$ ) กับค่าแปรปรวนจากตาราง ( $F_{crit}$ ) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบจากตัวอย่างอาหารสัตว์ที่แตกต่าง (t-Test) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้ ( $t_{cal}$ ) กับค่าเฉลี่ยจากตาราง ( $t_{crit}$ )

## แผนผังขั้นตอนการทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS



### 5. ผลการทดลอง

#### 5.1 ผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับ Matrix standard จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น ดังตารางที่ 1 พบว่า %matrix effect ของสารร็อกซาร์โซนไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ไม่เกิน  $\pm 20\%$  (Sante, 2021) จึงเห็นควรใช้ standard calibration matrix curve

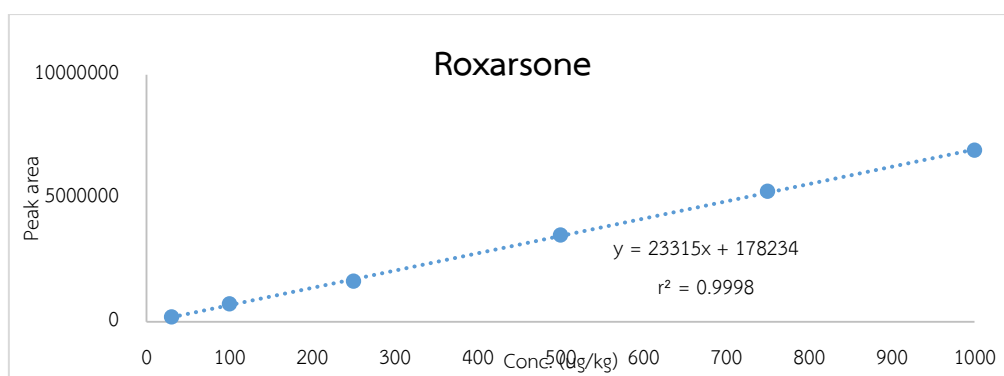


ตารางที่ 1 ผลการหา %matrix effect ของสารร็อกซาร์โซน

| ความเข้มข้น (ug/kg) | Peak area         |          |       |
|---------------------|-------------------|----------|-------|
|                     | Standard solution | Matrix   | %ME   |
| 30                  | 1488703           | 1941070  | 30.39 |
| 100                 | 5126808           | 7225687  | 40.94 |
| 250                 | 13127616          | 16417780 | 25.06 |
| 500                 | 27098910          | 35073483 | 29.43 |
| 750                 | 39005014          | 52842303 | 35.48 |
| 1,000               | 49648439          | 69439847 | 39.86 |

5.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (working range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนในช่วงความเข้มข้น 30 - 1,000 ไมโครกรัมกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารร็อกซาร์โซน เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation of determination ;  $r^2$ ) พบว่า มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ( $r^2 \geq 0.995$ ) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่า ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 30 - 1,000 ไมโครกรัมกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี เหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample ที่ 20-500 ไมโครกรัมกรัมต่อกิโลกรัม และ peak area ของสารร็อกซาร์โซน

5.3 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantitation; LOQ)

5.3.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารร็อกซาร์โซน โดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก  $LOD=3S'_0$  และ  $LOQ=10S'_0$  พบว่า มีค่าดังตารางที่ 2

5.3.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection; LOD) ของสารร็อกซาร์โซนที่ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ผลต่างร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European commission, 2021 จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน พบว่ามีค่าผลต่างร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European commission, 2021 จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน  $S/N \geq 3$  และมีค่าผลต่างร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European commission, 2021 ดังนั้นค่า LOD ของสารร็อกซาร์โซน มีค่าเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารร็อกซาร์โซน

| ลำดับ        | ความเข้มข้น (ug/kg) |
|--------------|---------------------|
| 1            | 17.85               |
| 2            | 19.77               |
| 3            | 18.28               |
| 4            | 19.30               |
| 5            | 19.36               |
| 6            | 18.26               |
| 7            | 18.26               |
| 8            | 19.77               |
| 9            | 18.42               |
| 10           | 18.64               |
| average      | 18.79               |
| %Recovery    | 93.96               |
| SD           | 0.697               |
| $\sqrt{n}$   | 1.414               |
| $S'_0$       | 0.49                |
| $LOD=3S'_0$  | 1.48                |
| $LOQ=10S'_0$ | 4.93                |

5.3.3 ผลการยืนยันความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantitation; LOQ) ของสารร็อกซาร์โซนที่ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่า %recovery ไม่อยู่ในช่วง 60 – 115 และ %RSD ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2019) จึงทำการปรับค่า LOQ ที่ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า %recovery ไม่อยู่ในช่วง 60 - 115 และ %RSD ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2019) จึงทำการปรับค่า LOQ ที่ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 60 - 115 และ %RSD เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2019) ดังนั้นค่า LOQ ของสารร็อกซาร์โซน มีค่าเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 3** ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารร็อกซาร์โซน ที่ระดับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

| ลำดับ | LOD (10 ug/kg) |       |
|-------|----------------|-------|
|       | S/N            | %IR   |
| 1     | 464.90         | 43.52 |
| 2     | 434.70         | 40.88 |
| 3     | 464.30         | 41.48 |
| 4     | 477.40         | 45.40 |
| 5     | 497.80         | 42.32 |
| 6     | 502.30         | 48.47 |
| 7     | 461.60         | 43.60 |
| 8     | 485.00         | 44.69 |
| 9     | 484.00         | 44.04 |
| 10    | 464.60         | 45.23 |

5.4 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ

5.4.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซน 3 ระดับ คือ 30 (LOQ), 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารร็อกซาร์โซน อยู่ในช่วงตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2019) แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 4** ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารร็อกซาร์โซน ที่ระดับ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

| ลำดับ                                  | LOQ (30 ug/kg) |           |
|----------------------------------------|----------------|-----------|
|                                        | Conc. (ug/kg)  | %Recovery |
| 1                                      | 31.872         | 106.07    |
| 2                                      | 30.86          | 107.20    |
| 3                                      | 30.746         | 105.80    |
| 4                                      | 28.85          | 99.37     |
| 5                                      | 31.806         | 109.63    |
| 6                                      | 31.215         | 106.60    |
| 7                                      | 31.039         | 105.77    |
| 8                                      | 31.584         | 109.50    |
| 9                                      | 29.246         | 100.17    |
| 10                                     | 32.067         | 109.20    |
| mean                                   | 30.93          | 105.93    |
| SD                                     | 1.089          |           |
| %RSD                                   | 3.52           |           |
| เกณฑ์ % Recovery 60-115, เกณฑ์ %RSD 21 |                |           |

**ตารางที่ 5** ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีทดสอบ

| ความเข้มข้น<br>(ug/kg) | เกณฑ์การยอมรับ<br>(AOAC, 2019) | ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร<br>(%Recovery) |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|
| 30                     | 60 - 115                       | 98.74                                             |
| 500                    | 80 - 110                       | 100.52                                            |
| 1,000                  | 80 - 110                       | 102.86                                            |

5.4.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซน 3 ระดับ คือ 30 (LOQ), 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD<sub>r</sub>) ดังตารางที่ 6 และจากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

| ความเข้มข้น<br>(ug/kg) | เกณฑ์การยอมรับ<br>%PRSD <sub>r</sub> | ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์<br>(Repeatability, n=10) |
|------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 30                     | 17.90                                | 2.65                                                           |
| 500                    | 11.72                                | 2.32                                                           |
| 1,000                  | 10.56                                | 1.12                                                           |

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ fortified sample ของ สารร็อกซาร์โซน 3 ระดับ คือ 30 (LOQ), 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD<sub>R</sub>) ดังตารางที่ 7 และจากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความเที่ยง (precision) แบบการทำซ้ำ

| ความเข้มข้น<br>(ug/kg) | เกณฑ์การยอมรับ<br>%PRSD <sub>R</sub> | ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์<br>(with-in laboratory reproducibility, n=20) |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 30                     | 27.12                                | 3.23                                                                                |
| 500                    | 17.76                                | 4.24                                                                                |
| 1,000                  | 16.00                                | 1.77                                                                                |

## 5.5 ผลการทดสอบ selectivity และ specificity

5.5.1 จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank พบว่า ไม่พบสัญญาณเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารร็อกซาร์โซน แสดงว่า ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน matrix ของ sample

5.5.2 จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานสารร็อกซาร์โซน กับตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานสารร็อกซาร์โซนและเติมสารละลายมาตรฐานที่สงสัยว่าจะรบกวน คือ สารซัลโฟนาไมด์ ที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง spike sample พบว่า ไม่พบ peak สารซัลโฟนาไมด์ ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกับสารร็อกซาร์โซน แสดงว่า สารชนิดนี้ไม่มีผลต่อวิธีทดสอบนี้

## 5.6 ผลการทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (ruggedness; major change)

จากการเปรียบเทียบความแปรปรวนจากการใช้วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $F_{cal} < F_{crit}$ ) จากนั้นนำผลของความ

แปรปรวนที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของวิธีวิเคราะห์จากตัวอย่างอาหารไก่และอาหารสุกร พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $t_{cal} < t_{crit}$ )

ดังนั้น วิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซน โดยเทคนิค LC-MS/MS สามารถใช้ในการทดสอบทั้ง ตัวอย่างอาหารไก่และอาหารสุกร ดังแสดงในตารางที่ 8

**ตารางที่ 8** แสดงรายละเอียดผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย F-Test และ t-Test

| ความเข้มข้น<br>(ug/kg) | SD           |               | %RSD         |               | Df of<br>F-test | $F_{cal}$ | $F_{crit}$ | Df of<br>T-test | $T_{cal}$ | $T_{crit}$ |
|------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|-----------------|-----------|------------|-----------------|-----------|------------|
|                        | อาหาร<br>ไก่ | อาหาร<br>สุกร | อาหาร<br>ไก่ | อาหาร<br>สุกร |                 |           |            |                 |           |            |
| 30                     | 0.899        | 0.512         | 2.933        | 1.696         | 9,9             | 3.079     | 4.026      | 18              | 1.325     | 2.101      |
| 500                    | 28.247       | 14.717        | 5.679        | 2.990         | 9,9             | 3.684     | 4.026      | 18              | 0.522     | 2.101      |
| 1,000                  | 13.547       | 15.488        | 1.351        | 1.543         | 9,9             | 1.307     | 4.026      | 18              | 0.181     | 2.101      |

## 6. สรุปผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารร็อกซาร์โซน ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่า ผลการทดสอบ linearity และ working range โดยการทดสอบ fortified sample ของสารร็อกซาร์โซนในช่วงความเข้มข้น 30 (LOQ), 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรง โดยค่า correlation of determination ( $r^2$ ) ไม่น้อยกว่า 0.995 มีค่า limit of detection (LOD) และค่า limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 10 และ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับมีค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2019)

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้น วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับทดสอบสารร็อกซาร์โซนในอาหารสัตว์ ที่ช่วงความเข้มข้น 30 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

## 7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (proficiency test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและเที่ยงยิ่งขึ้น และควรให้ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ทดสอบสารประกอบอาร์เซนิกอินทรีย์ตัวอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการใช้จ่ายปฏิชีวนะในระบบการผลิตสินค้าปศุสัตว์ต่อไป

## 8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณนายอุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และกลุ่มบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ ที่ดำเนินงานจัดหาวัสดุอุปกรณ์ ในการปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จ

## 9. เอกสารอ้างอิง

- ใจพร พุ่มคำ. 2555. อาหาร (ไม่)ปลอดภัย... ผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์. *วารสารอาหารและยา*. ฉบับเดือนกันยายน-ธันวาคม: 8-11.
- ชัยวัฒน์ อาจีน และ วรณพร ทะพิงค์แก. 2557. การใช้สารประกอบไพโรเจนิกเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์กระเพาะเดียว. *วารสารสัตวศาสตร์แห่งประเทศไทย*. 1 (1): 11-20.
- วรณพร ทะพิงค์แก. 2557. ทางเลือกในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตสำหรับปศุสัตว์. *วารสารเกษตร*. 30 (2): 201 – 212.
- AOAC International. 2019. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, 21<sup>st</sup> Ed.
- Chen, D., Zhang, H., Tao, Y., Wang, Y., Huang, L., Liu, Z., Pan, Y., Peng, D., Wang, X., Dai, M. and Yuan, Z. 2011. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of four organoarsenic compounds in the feeds of swine and chicken. *Journal of Chromatography B*. 879: 716-720.
- EURACHEM Guide, 2014. The fitness for purpose of analytical method A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
- European Commission. 2021. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical method for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. Official Journal of the European Union, L 180/84-109.

- European Commission Directorate General for Health and Food Safety. 2024. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11312/2021 v2. Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 01/01/2024
- Fisher, D.J., Yonkos, L.T. and Staver, K.W. 2015. Environmental Concerns of Roxarsone in Broiler Poultry Feed and Litter in Maryland, USA. *Environmental Science & Technology*.
- Liu, Y., Wen, M., Wu, L., Cao, S., and Li, Y. Environmental Behavior and Remediation Methods of Roxarsone. 2022. *Applied Sciences*. 12(7591): 1-16.
- Nachman, K.E., Baron, P.A., Raber, G., Francesconi, K.A., Navas-Acien, A. and Love, D.C. 2013. Roxarsone, Inorganic Arsenic, and Other Arsenic Species in Chicken: A U.S.-Based Market Basket Sample. *Environmental Health Perspectives*. 121(7): 818-824.