

การพัฒนาวิธีทดสอบ ionophores ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

ชูศักดิ์ อางสูงเนิน งามงาม บุญบรรลุ ธนธรรณม์ ดั่งทอง ปันดดา เต้าชัยภูมิ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม ionophores ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยใช้เทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อตรวจสอบความสม่ำเสมอของการผสมยา (homogeneity) และการปนเปื้อนข้าม (drug carryover) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า 40% methanol เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสาร โดยให้ค่า theoretical plates และ asymmetry factor อยู่ในเกณฑ์ที่ดีที่สุด ขณะที่ 60% methanol อาจใช้เป็นทางเลือกสำรองได้ การเปรียบเทียบตัวทำละลายสกัดพบว่า 90% methanol และ 90% acetonitrile ให้สมรรถนะที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้น salinomycin ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) สำหรับ matrix effect พบว่ามีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์อย่างชัดเจน โดยการใช้ matrix-fortified calibration curve สามารถแก้ไขผลกระทบดังกล่าวและให้ค่าที่ใกล้เคียงสภาพจริงมากกว่า นอกจากนี้ การศึกษาระยะเวลาการสกัดพบว่า lasalocid, maduramicin และ narasin เหมาะสมที่สุดที่ 60 นาที ขณะที่ monensin และ salinomycin ให้ผลดีที่สุดที่ 15 นาที ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ได้ต่อไป

คำสำคัญ : ionophores อาหารสัตว์ที่ผสมยา กระจายตัวของยาเป็นเนื้อเดียวกัน การปนเปื้อนข้าม liquid chromatography-mass spectrometry

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Development of a method for the determination of ionophores in medicated feed using liquid chromatography-mass spectrometry

Chusak Ardsoongnearn, Ongart Boonbanlu, Thanathorn Duangthong,
Panadda Taochaiyaphum

Abstract

This study aimed to develop an analytical method for ionophore compounds, including lasalocid, maduramicin, monensin, narasin, and salinomycin, in medicated feed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method was designed to evaluate mixing homogeneity and drug carryover. The experimental results indicated that 40% methanol provided the most suitable chromatographic conditions, yielding the best theoretical plates and asymmetry factors, while 60% methanol could be considered as an alternative. Comparison of extraction solvents revealed that 90% methanol and 90% acetonitrile demonstrated comparable performance, except for salinomycin, which showed a significant difference ($p \leq 0.05$). Matrix effects were found to have a pronounced influence on the analysis; however, the use of a matrix-fortified calibration curve effectively minimized such effects and provided values more representative of real conditions. Furthermore, extraction time studies showed that lasalocid, maduramicin, and narasin achieved optimal results at 60 minutes, whereas monensin and salinomycin performed best at 15 minutes. Therefore, the developed method can be applied for validating the analytical performance of LC-MS/MS in medicated feed testing.

Keywords: ionophores, 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

ยาในกลุ่ม ionophores (lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin) เป็นสารปฏิชีวนะที่มีกลไกการออกฤทธิ์เฉพาะในการรบกวนสมดุลของไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยทำหน้าที่เป็นตัวพาไอออนบวก เช่น Na^+ , K^+ , Ca^{2+} และ Mg^{2+} ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์ต้องใช้พลังงานมากขึ้นในการรักษาสมดุลจนกระทั่งพลังงานหมดและตายในที่สุด ยากลุ่มนี้นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์ปีกและโคเนื้อ เพื่อควบคุมโรค coccidiosis เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร และป้องกันโรค bloat ในโค ตัวยาที่นิยมใช้ได้แก่ monensin สำหรับโคเนื้อและโคนม salinomycin สำหรับสัตว์ปีกและสุกร narasin สำหรับไก่เนื้อ และ lasalocid สำหรับโคเนื้อและสัตว์ปีก การใช้ยาเหล่านี้ต้องอยู่ภายใต้การดูแลของสัตวแพทย์ ต้องระวังการใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม macrolides และต้องคำนึงถึงระยะหยุดยาก่อนส่งโรงฆ่า รวมถึงต้องมีการผสมยาในอาหารสัตว์อย่างทั่วถึงด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ที่มีประสิทธิภาพ มีการตรวจสอบความเข้มข้นของยาเป็นระยะ และปฏิบัติตามข้อกำหนดทางกฎหมายเรื่องปริมาณยาตกค้างสูงสุดเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ทั้งนี้แนวโน้มในอนาคตมีการพัฒนาสูตรยาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ควบคู่กับการวิจัยหาทางเลือกอื่นเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะและการพัฒนาระบบตรวจสอบยาตกค้างให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

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

Vincent Ursula et al. (2008) นำเสนอวิธีการวิเคราะห์ใหม่ที่เหมาะสมกับวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่ม coccidiostats ในอาหารสัตว์ เช่น อาหารไก่และวัว สามารถทำได้โดยใช้เทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งได้รับการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องในห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มต้นด้วยการสกัด coccidiostats จากตัวอย่างอาหารด้วยวิธีที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารที่ต้องการในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ จากนั้นใช้ solid-phase extraction (SPE) เพื่อทำความสะอาดตัวอย่างก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟี LC-MS/MS ซึ่งช่วยในการแยกและระบุชนิดของ coccidiostats ได้อย่างแม่นยำ ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า precision อยู่ในช่วง 4 - 10% ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและตัวอย่างอาหารที่ใช้ ในขณะที่ recovery อยู่ในช่วง 86 - 120 % นอกจากนี้ ค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.014 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Limit of Quantification (LOQ) เท่ากับ 0.046 มิลลิกรัมต่อ

กิโลกรัม วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ถือว่ามีความเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบ coccidiostats ตามกฎหมายของยุโรป ซึ่งมุ่งเน้นไปที่การควบคุมระดับสารที่ได้รับอนุญาตและระดับต่ำในช่วงเวลาที่ไม่อนุญาตให้ใช้สารเหล่านี้ในอาหารสัตว์ก่อนการฆ่า โดยรวมแล้ววิธีนี้ถือว่าเป็นวิธียืนยันที่เหมาะสมสำหรับการติดตาม coccidiostats ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ monensin A, salinomycin, narasin A, narasin I, lasalocid, semduramicin และ maduramicin และสามารถใช้เป็นทางเลือกเสริมกับวิธี HPLC-UV ที่เป็นทางการได้

Vincent Ursula et al. (2011) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดสารกลุ่ม coccidiostats 6 ชนิด ได้แก่ monensin sodium, salinomycin sodium, narasin, lasalocid sodium, semduramicin sodium และ maduramicin ammonium alpha ในอาหารสัตว์ผสมสำหรับสัตว์ปีก วัว หมู และลูกวัว โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนข้ามของสารเหล่านี้ตามข้อกำหนดล่าสุดของสหภาพยุโรป วิธีการนี้เริ่มจากการสกัดสาร coccidiostats จากตัวอย่างอาหารสัตว์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและกรองเพื่อแยกส่วนใส โดยเฉพาะในตัวอย่างอาหารลูกวัวต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติมคือการกำจัดไขมันด้วย n-hexane จากนั้นใช้เทคนิค standard additions ที่ดัดแปลงในการวิเคราะห์ปริมาณ ซึ่งทำให้การทำงานง่ายขึ้นเทียบเท่ากับการใช้ matrix-matched standard calibration curves โดยสามารถใช้ความเข้มข้นเดียวกันในการวิเคราะห์ตั้งแต่ 0.5 - 2.5 เท่าของค่าสูงสุดที่กฎหมายกำหนด ผลการทดสอบพบว่าวิธีนี้มีความแม่นยำสูง โดยมีค่าความคลาดเคลื่อน 3 - 12% (ยกเว้น maduramicin ammonium alpha และ semduramicin sodium ที่มีค่าสูงถึง 21%) และมี recovery 80 - 111% ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและตัวอย่าง นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดสารได้ที่มีความเข้มข้นต่ำมาก คือ 0.01 - 0.65 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ต้องการวัดจริงมาก จึงสรุปได้ว่าวิธีการนี้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์

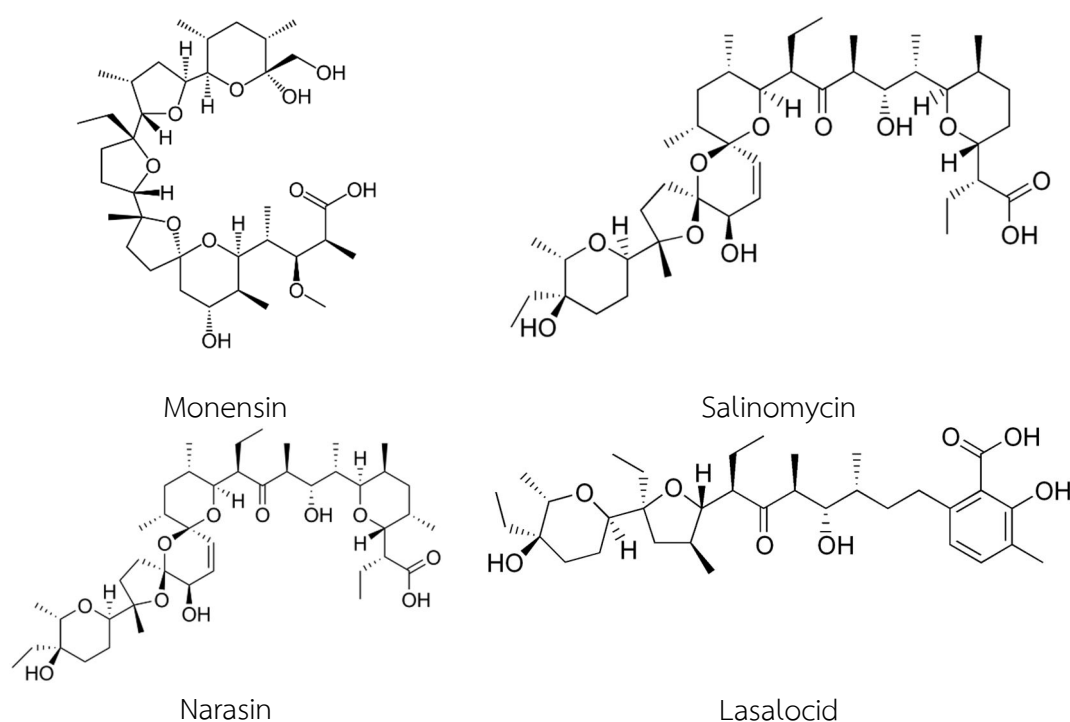


Fig. 1 Structure of ionophores

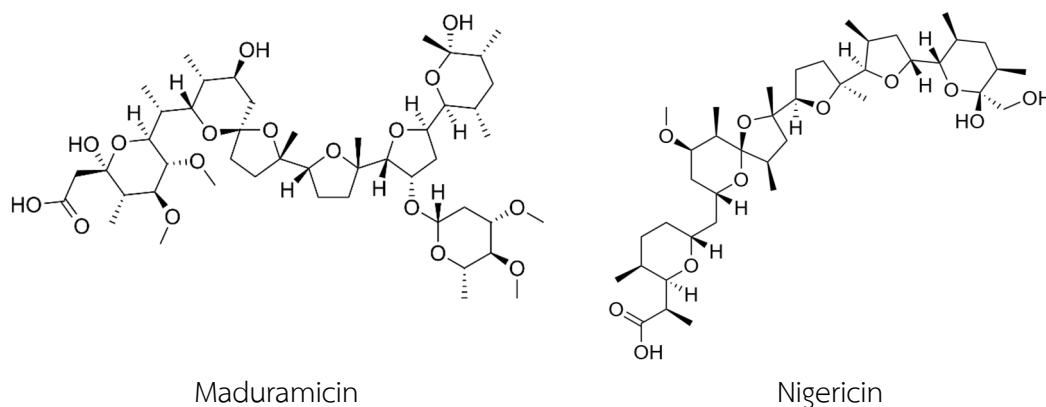


Fig. 1 Structure of ionophores (ต่อ)

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบยาในกลุ่ม ionophores (lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin) ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับทดสอบปริมาณยาในกลุ่ม ionophores ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา และการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ที่ช่วงระดับความเข้มข้น 10 - 120 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) ในช่วงระดับ 0.25 - 5 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการพัฒนาวิธีทดสอบยาในกลุ่ม ionophores ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry และนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

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 ตู้ดูดควัน (fume hood)
- 4.1.5 Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 4.1.6 Volumetric flask ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร
- 4.1.7 Micropipette ขนาด 200 – 1000 ไมโครลิตร

4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.2.1 Acetonitrile, HPLC grade
- 4.2.2 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ.cm (น้ำ DI)

4.3 สารมาตรฐาน

- 4.3.1 สารมาตรฐาน lasalocid sodium ยี่ห้อ Dr.ehrenstorfer
- 4.3.2 สารมาตรฐาน maduramicin ammonium ยี่ห้อ Dr.ehrenstorfer
- 4.3.3 สารมาตรฐาน monensin ยี่ห้อ Dr.ehrenstorfer
- 4.3.4 สารมาตรฐาน narasin ยี่ห้อ TRC
- 4.3.5 สารมาตรฐาน salinomycin ยี่ห้อ HPC
- 4.3.6 สารมาตรฐาน nigericin ยี่ห้อ TRC

4.4 ขั้นตอนการทดลอง

- 4.4.1 ศึกษา condition ของ Liquid Chromatography (LC) และ m/z การพัฒนา condition ของ LC จะพิจารณาการเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม การไหลของ mobile phase และอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ได้การแยกที่มีประสิทธิภาพ ส่วนการกำหนดค่า m/z ต้องเลือก ionization mode ที่เหมาะกับลักษณะของสารหา precursor ion และ product ion ที่เฉพาะเจาะจง และปรับแต่งพารามิเตอร์ของ mass spectrometry เช่น collision energy และ Dwell time เพื่อให้ได้ sensitivity ที่ดีที่สุด

- 4.4.2 ศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นของตัวอย่างจริง ของการทดสอบปริมาณตัวอย่างสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) การประเมินผลด้วย correlation coefficient (r) ที่ต้องมีค่า $r \geq 0.995$ เพื่อยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณตอบสนอง ซึ่งจะเพิ่มความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

4.4.2.1 การเตรียม mobile phase

- 4.4.2.1.1 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 ปิดฝิต 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

4.4.2.1.2 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 ลงไปผสมกับ acetonitrile ด้วย กรองผ่าน PTFE filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารละลายใส่ใน laboratory bottle ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไป degas

4.4.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.4.2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานยาากลุ่ม ionophores (lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร: ชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดประมาณ 25 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol

4.4.2.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน nigericin (internal standard (IS)) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร: ชั่งสารมาตรฐานประมาณ 25 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol

4.4.2.2.3 การเตรียม standard calibration curve solution ละลายใน 40% acetonitrile สำหรับทดสอบปริมาณตัวอย่างสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity)

a) ความเข้มข้นที่ 1: ปิเปตจาก stock solution 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.1 มิลลิลิตร และ IS 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร (0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

b) ความเข้มข้นที่ 2: ปิเปตจาก stock solution 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.3 มิลลิลิตร และ IS 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร (1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร (0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

- c) ความเข้มข้นที่ 3: ปิเปตจาก stock solution 500 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม 0.6 มิลลิลิตร และ IS 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร (3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร (0.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
- d) ความเข้มข้นที่ 4: ปิเปตจาก stock solution 500 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม 0.9 มิลลิลิตร และ IS 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร (4.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร (0.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
- e) ความเข้มข้นที่ 5: ปิเปตจาก stock solution 500 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม 1.2 มิลลิลิตร และ IS 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร (6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร (0.24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

4.4.2.2.4 การเตรียม standard calibration curve solution ละลายใน 40% acetonitrile สำหรับทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover)

- a) ความเข้มข้นที่ 1: ปิเปตจาก stock solution 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.05 มิลลิลิตร และ IS 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร (0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
- b) ความเข้มข้นที่ 2: ปิเปตจาก stock solution 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.1 มิลลิลิตร และ IS 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร (0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
- c) ความเข้มข้นที่ 3: ปิเปตจาก stock solution 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.2 มิลลิลิตร และ IS 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร (0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
- d) ความเข้มข้นที่ 4: ปิเปตจาก stock solution 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.4 มิลลิลิตร และ IS 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร
(0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

- e) ความเข้มข้นที่ 5: ปิเปตจาก stock solution 25 มิลลิกรัม
ต่อกิโลกรัม 1 มิลลิลิตร และ IS 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
0.4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร
(0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

4.4.2.2.5 การเตรียมอาหารสัตว์สำหรับทดสอบ matrix-fortified calibration curve

- a) ชั่งตัวอย่างอาหารไก่ที่ทำการตรวจสอบแล้วไม่พบ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin (blank sample) ประมาณ 200 กรัม
- b) บดตัวอย่างด้วยเครื่องบดยี่ห้อ FRITSCH สำหรับเตรียม matrix-fortified calibration curve โดยบดครั้งละ ประมาณ 100 กรัม ความเร็วของจานหมุน 400 รอบต่อ นาที ใช้เวลาครั้งละ 5 นาที รวมตัวอย่างประมาณ 200 กรัม

4.4.2.2.6 การเตรียม matrix-fortified calibration curve สำหรับ ทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็น เนื้อเดียวกัน (homogeneity) เตรียมตาม Table 1 นำไปสกัด ตัวอย่างตามข้อ 4.4.2.2.8

Table 1. Matrix-fortified calibration curve for homogeneity.

Compounds	Stock (mg/L)	ปริมาตรที่เติม (mL)					Blank sample (g)
		10 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	90 mg/kg	120 mg/kg	
Lasalocid	500	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2	5
Maduramicin	500	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2	5
Monensin	500	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2	5
Narasin	500	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2	5
Salinomycin	500	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2	5

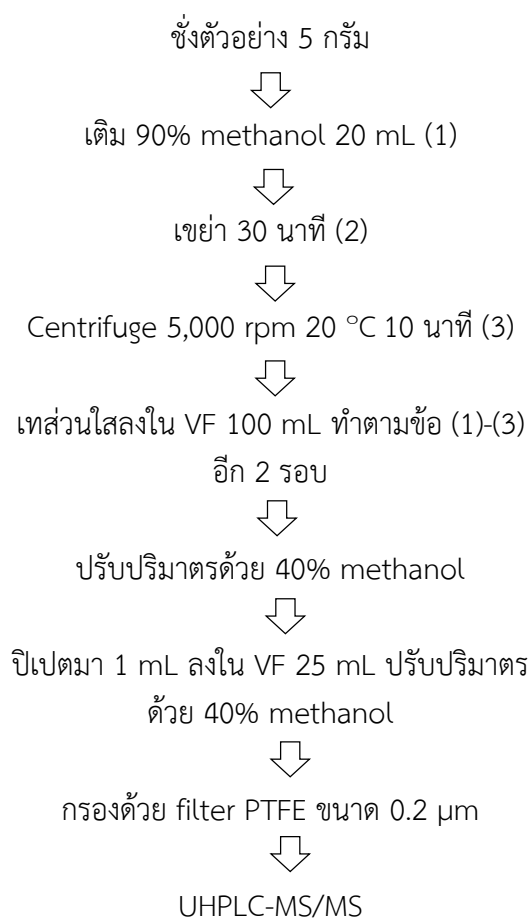
4.4.2.2.7 การเตรียม matrix-fortified calibration curve สำหรับ ทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) เตรียมตาม Table 2 นำไปสกัดตัวอย่างตามข้อ 4.4.2.2.8

Table 2. Matrix-fortified calibration curve for drug carryover.

Compounds	Stock (mg/L)	ปริมาตรที่เติม (mL)					Blank sample (g)
		0.25 mg/kg	0.5 mg/kg	1 mg/kg	2 mg/kg	5 mg/kg	
Lasalocid	25	0.05	0.1	0.2	0.4	1.0	5
Maduramicin	25	0.05	0.1	0.2	0.4	1.0	5
Monensin	25	0.05	0.1	0.2	0.4	1.0	5
Narasin	25	0.05	0.1	0.2	0.4	1.0	5
Salinomycin	25	0.05	0.1	0.2	0.4	1.0	5

4.4.2.2.8 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

การสกัดตัวอย่าง homogeneity



การสกัดตัวอย่าง drug carryover

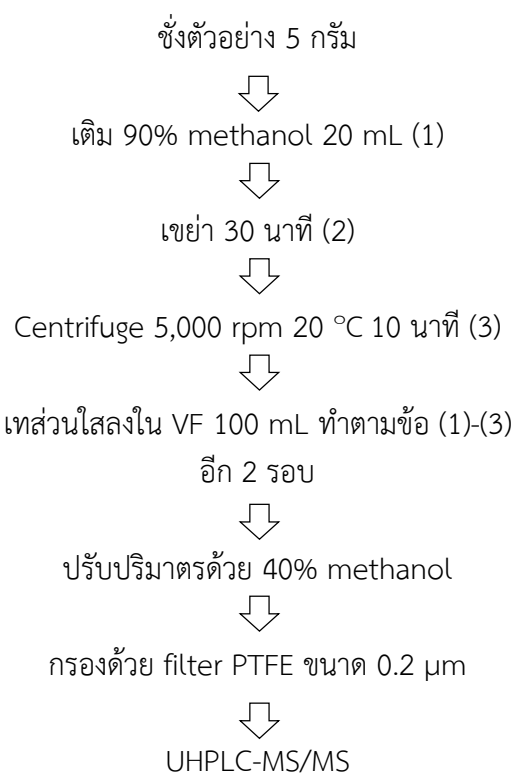


Fig. 2 Sample extraction procedures for homogeneity and drug carryover

- 4.4.3 ศึกษาการใช้ methanol ในการละลายที่ความเข้มข้น 40%, 60%, 80% และ 100% methanol เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม
- 4.4.4 ศึกษาการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ methanol และ acetonitrile ที่ 40% เพื่อเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม
- 4.4.5 ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดตัวอย่างโดยใช้ 90% methanol และ 90% acetonitrile เพื่อเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสม
- 4.4.6 ศึกษา matrix effect ของ homogeneity และ drug carryover โดยการเทียบ slope ของ matrix-matching calibration curve และ standard calibration curve solution
 - 4.4.6.1 การเตรียม matrix-matching calibration curve สำหรับทดสอบ matrix effect สำหรับทดสอบ homogeneity และ drug carryover เตรียมตาม Table 1 และ Table 2 ตามลำดับ นำไปสกัดตัวอย่างตามข้อ 4.4.2.2.8
 - 4.4.6.2 การเตรียม standard calibration curve solution สำหรับทดสอบ matrix effect สำหรับทดสอบ homogeneity และ drug carryover เตรียมตามข้อ 4.4.2.2.3 และ 4.4.2.2.4 ตามลำดับ
- 4.4.7 การศึกษาระยะเวลาการสกัด โดยแปรระดับระยะเวลาการสกัดเป็น 15, 30 และ 60 นาที ทดสอบโดยใช้ matrix-fortified calibration curve และ standard calibration curve solution สำหรับทดสอบ homogeneity และ drug carryover เตรียมตาม Table 1 และ Table 2 นำไปสกัดตัวอย่างตามข้อ 4.4.2.2.3 และ 4.4.2.2.4 ตามลำดับ

5. ผลการทดลอง

- 5.1 ผลการศึกษา condition ของ Liquid Chromatography (LC) และ m/z ตาม Table 3 และ Table 4

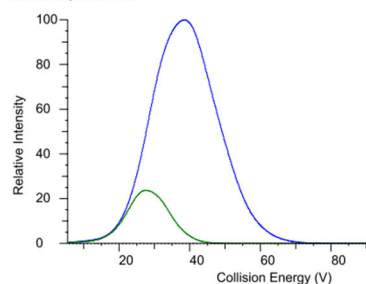
Table 3. LC condition.

Parameters	Value
Column:	Phenomenex, Kinetex 1.7 μ m C18 100 x 2.1 mm
Mobile phase:	0.1%FA in water: 0.1%FA in Acetonitrile (5:95, v/v)
Flow rate:	0.2 mL/min
Column temperature:	40 °C
Sample temperature:	10 °C
Injection volume:	5 μ L
End time	6 min

Table 4. H-ESI parameters.

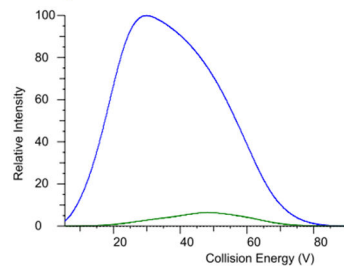
Parameters	Value
Positive Ion (V)	3500
Sheath Gas (Arb)	40
Aux Gas (Arb)	3
Sweep Gas (Arb)	1
Ion Transfer Tube Temp (°C)	325
Vaporizer Temp (°C)	300
CID gas (mTorr)	1.5

Breakdown Curve of Ion 613.383 m/z at 1.5 mTorr (+)
Max Intensity: 7.18E+004



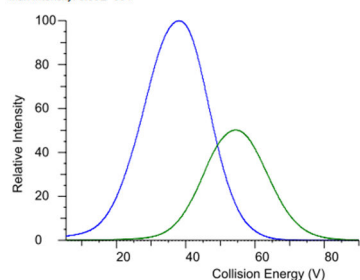
Lasalocid

Breakdown Curve of Ion 939.450 m/z at 1.5 mTorr (+)
Max Intensity: 1.12E+005



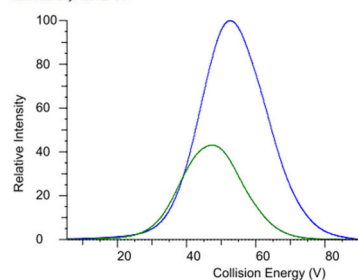
Maduramicin

Breakdown Curve of Ion 693.367 m/z at 1.5 mTorr (+)
Max Intensity: 3.99E+004



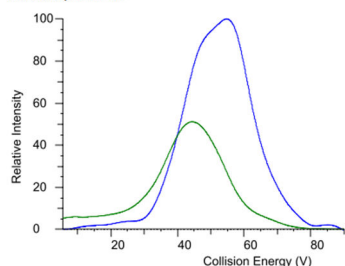
Monensin

Breakdown Curve of Ion 787.550 m/z at 1.5 mTorr (+)
Max Intensity: 3.91E+004



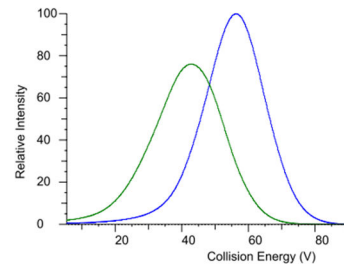
Narasin

Breakdown Curve of Ion 773.750 m/z at 1.5 mTorr (+)
Max Intensity: 9.45E+001



Salinomycin

Breakdown Curve of Ion 747.550 m/z at 1.5 mTorr (+)
Max Intensity: 2.10E+005



Nigericin

Fig. 3 CID breakdown curves of ionophore and internal standard (nigericin)

Table 5. MS detection.

Compounds	Precursor ions (m/z)	Product ions (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)	Dwell Time (ms)
Lasalocid	613.38	377.17	39	299	33.694
		595.25	28	299	33.694
Maduramicin	939.45	877.42	30	299	33.694
		895.42	48	299	33.694
Monensin	693.37	675.34	38	250	33.694
		416.17	55	250	33.694
Narasin	787.55	413.17	53	299	33.694
		531.30	47	299	33.694
Salinomycin	773.75	431.25	55	250	33.694
		531.33	44	250	33.694
Nigericin	747.55	703.33	56	281	33.694
		729.33	43	281	33.694

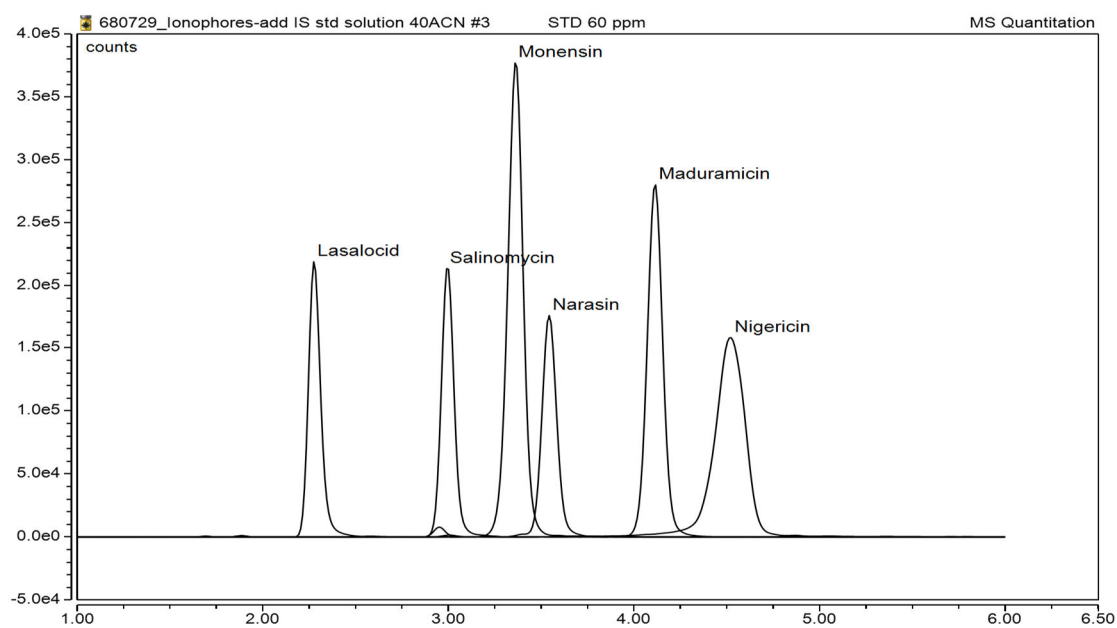


Fig. 4 Chromatogram Ionophore

5.2 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของ homogeneity และ drug carryover

ผลการเปรียบเทียบสมการ calibration curve ของ homogeneity ระหว่างการใช้ standard solution calibration curve และ matrix-fortified calibration curve สำหรับทดสอบยาในกลุ่ม ionophores ตาม Table 6 พบว่า slope ของ standard solution calibration curve มีค่ามากกว่า matrix fortified calibration curve ในทุกสาร สะท้อนถึงผลของ matrix effect ที่ทำให้ sensitivity ลดลงเมื่อตรวจวัดในสถานะที่มีตัวรบกวนจริง จากอาหารสัตว์ สำหรับค่า intercept พบความแตกต่างระหว่างสองวิธี โดยบางสาร เช่น maduramicin และ narasin ให้ค่า intercept ใน matrix เป็นบวก แสดงถึงสัญญาณรบกวนจาก matrix ที่อาจส่งผลต่อการประเมินปริมาณสาร ส่วนค่า correlation coefficient (r) ของทั้งสองกรณีอยู่ในช่วง 0.9963 - 0.9999 ซึ่งสูงกว่า 0.995 ทุกค่า บ่งชี้ถึงความเป็น linearity ที่ดีของวิธีทดสอบ

ผลการเปรียบเทียบสมการ calibration curve ของ drug carryover ระหว่างการใช้ standard solution calibration curve และ matrix-fortified calibration curve สำหรับทดสอบยาในกลุ่ม ionophores ตาม Table 7 พบว่าค่า slope จาก standard solution calibration curve สูงกว่าที่ได้จาก matrix-fortified calibration curve ในทุกกรณี ซึ่งบ่งชี้ถึงอิทธิพลของ matrix effect ที่ทำให้สัญญาณการตรวจวัดลดลง นอกจากนี้ ค่า intercept ของ matrix-fortified calibration curve มีการเบี่ยงเบนจากศูนย์มากกว่าการใช้ standard solution calibration curve เช่น maduramicin และ monensin ที่ให้ค่า intercept สูง แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการเกิด systematic bias ในขณะที่ค่า r ของทั้งสองวิธีมีค่ามากกว่า 0.9978 สะท้อนความเป็น linearity

อย่างไรก็ตามการทดสอบ homogeneity และ drug carryover การใช้ standard solution calibration curve แม้จะให้ค่า slope ที่สูงและมี linearity ที่ดี แต่มีความเสี่ยงจากการรบกวนของ matrix ซึ่งอาจกระทบต่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ ดังนั้น การใช้ matrix-fortified calibration curve จึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมกว่า เนื่องจากสามารถสะท้อนสภาพการวิเคราะห์จริงของตัวอย่างอาหารสัตว์ได้อย่างน่าเชื่อถือมากขึ้น แม้ค่า slope จะต่ำกว่าก็ตาม

Table 6. Linearity of ionophores compounds for homogeneity.

Compounds	Slope		Intercept		<i>r</i>	
	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve
Lasalocid	3.42	2.73	-7.88	-5.16	0.9987	0.9963
Maduramicin	2.27	2.08	-4.92	5.61	0.9989	0.9999
Monensin	5.6	5.09	-1.49	-5.32	0.9987	0.9970
Narasin	0.87	0.77	-1.93	0.66	0.9985	0.9984
Salinomycin	3.42	2.73	-7.88	-5.16	0.9985	0.9982

Table 7. Linearity of ionophores compounds for drug carryover.

Compounds	Slope		Intercept		<i>r</i>	
	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve
Lasalocid	141.11	57.22	-0.99	-3.58	0.9978	0.9980
Maduramicin	97.11	67.06	-4.87	20.6	0.9991	0.9984
Monensin	232.74	140.34	3.87	7.34	0.9986	0.9986
Narasin	36.41	33.73	-0.68	2.57	0.9985	0.9978
Salinomycin	166.32	138.14	-15.26	-7.81	0.9987	0.9980

5.3 ผลการศึกษาตัวทำละลาย methanol ใช้ในการละลายที่ความเข้มข้น 40%, 60%, 80% และ 100% ตามตารางที่ 8 - 11 พบว่า ความเข้มข้นของ methanol มีอิทธิพลต่อสมรรถนะการแยกโดยประเมินจากค่า theoretical plates, ค่า asymmetry factor และ retention time โดยทั่วไปค่า theoretical plates ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ประสิทธิภาพของคอลัมน์โครมาโทกราฟี ยิ่งค่ามีค่าสูงยิ่งสะท้อนถึงการแยกที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่วนค่า asymmetry factor เข้าใกล้ 1 บ่งบอกถึงความสมมาตรของโครมาโทกราฟิกพีคที่ดี ซึ่งมีความสำคัญต่อความแม่นยำในการหาปริมาณสาร ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า 40% methanol ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด โดยมีค่า theoretical plates อยู่ในช่วง 6010 - 11612 และค่า asymmetry factor ใกล้เคียง 1 (0.99 - 1.19) แสดงถึงรูปแบบพีคที่เหมาะสม ขณะที่ 60% methanol ยังคงแสดงค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (theoretical plates 5599-10991, asymmetry factor 0.97 - 1.18) และมีข้อได้เปรียบด้านการลดเวลาในการรันตัวอย่าง สำหรับ 80% methanol และ 100% methanol พบว่าประสิทธิภาพการแยกและความสมมาตรของพีคลดลง โดยเฉพาะที่ 100% methanol ซึ่งให้ค่า theoretical plates ต่ำที่สุด (2018 - 3095) และค่า asymmetry factor เบี่ยงเบนมากขึ้น

(0.92 - 1.15) ส่งผลให้เกิดการบิดเบี้ยวของพีคและลดความถูกต้องของข้อมูลเชิงปริมาณ ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าใช้ 40% methanol เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้สมดุลที่ดีที่สุดในระหว่างประสิทธิภาพการแยก และความสมมาตรของพีค ในขณะที่ 60% methanol อาจถือเป็นทางเลือกสำรองที่เหมาะสมในกรณีที่ต้องการลดระยะเวลาในการวิเคราะห์โดยไม่สูญเสียคุณภาพของการแยกมากนัก

Table 8. Chromatographic parameters using 40% methanol as solvent.

Compounds	Retention Time (min)	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
Lasalocid	2.28	16716	1.19	6010
Maduramicin	4.11	27405	1.02	11612
Monensin	3.36	16071	0.99	8224
Narasin	3.54	14561	1.04	10082
Salinomycin	2.99	16071	1.10	9404

Table 9. Chromatographic parameters using 60% methanol as solvent.

Compounds	Retention Time (min)	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
Lasalocid	2.25	17712	1.18	5599
Maduramicin	4.08	47313	1.02	10991
Monensin	3.33	36995	0.97	7702
Narasin	3.51	21000	1.11	9068
Salinomycin	2.97	16604	1.02	8956

Table 10. Chromatographic parameters using 80% methanol as solvent.

Compounds	Retention Time (min)	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
Lasalocid	2.23	18354	1.11	5112
Maduramicin	4.06	35280	1.05	9994
Monensin	3.31	36907	0.97	6982
Narasin	3.50	19661	1.05	8512
Salinomycin	2.95	18427	1.06	7832

Table 11. Chromatographic parameters using 100% methanol as solvent.

Compounds	Retention Time (min)	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
Lasalocid	2.19	18535	1.15	2018
Maduramicin	3.99	34620	0.92	1759
Monensin	3.24	38062	1.00	1657
Narasin	3.44	21759	1.07	3095
Salinomycin	2.90	18990	1.15	2681

5.4 ผลการศึกษาการประเมินสมบัติทาง chromatographic ของ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin ตาม Table 12 และ 13 พบว่า 40% acetonitrile ให้ค่า asymmetry factor ใกล้ 1 และ theoretical plates สูงกว่า 40% methanol ในสารส่วนใหญ่ สะท้อนถึงการแยกที่มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม 40% methanol มีแนวโน้มให้ค่า area สูงกว่า โดยเฉพาะ salinomycin และ narasin ขณะที่ lasalocid และ maduramicin ได้ค่า area สูงกว่าชัดเจนเมื่อใช้ acetonitrile ส่วน monensin แม้ค่า area ใกล้เคียงกัน แต่ acetonitrile ยังคงให้ plates สูงกว่า

Table 12. Chromatographic performance of ionophores compounds dissolved in 40% acetonitrile.

Compounds	Parameters	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
Lasalocid	Average	16964.50	1.17	4615.00
	SD	288.75	0.06	78.22
	%RSD	1.70	5.07	1.69
Maduramicin	Average	75700.83	1.11	7322.67
	SD	1650.94	0.04	163.75
	%RSD	2.18	3.61	2.24
Monensin	Average	69545.17	1.01	5705.83
	SD	1219.78	0.02	164.55
	%RSD	1.75	2.22	2.88
Narasin	Average	14945.00	1.05	7640.83
	SD	192.12	0.02	983.47
	%RSD	1.29	1.97	12.87
Salinomycin	Average	44344.67	1.11	6580.17
	SD	1203.62	0.04	140.61
	%RSD	2.71	3.86	2.14

Table 13. Chromatographic performance of ionophores compound dissolved in 40% methanol.

Compounds	Parameters	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
Lasalocid	Average	32.00	1.20	4625.17
	SD	4.52	0.13	569.01
	%RSD	14.11	10.62	12.30
Maduramicin	Average	46264.00	1.14	7412.83
	SD	2182.52	0.02	121.08
	%RSD	4.72	1.70	1.63
Monensin	Average	60564.50	1.02	5587.50
	SD	3026.33	0.01	167.95
	%RSD	5.00	1.44	3.01
Narasin	Average	8711.50	1.17	7560.33
	SD	462.06	0.03	307.05
	%RSD	5.30	2.29	4.06
Salinomycin	Average	85843.83	1.08	5361.17
	SD	5052.92	0.06	169.12
	%RSD	5.89	5.29	3.15

5.5 ผลการทดสอบ t-test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่าง 90% methanol และ 90% acetonitrile ตาม Table 14 - 16 พบว่า lasalocid, monensin, narasin และ maduramicin ไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ว่า ทั้งสองตัวทำละลายมีสมรรถนะใกล้เคียงกันสำหรับการสกัดยาในกลุ่ม ionophores อย่างไรก็ตาม ในกรณีของ salinomycin พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยแสดงให้เห็นว่า ตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดสารชนิดนี้ ดังนั้นจึงควรพิจารณาเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสม โดยเฉพาะเมื่อเป้าหมายคือการตรวจวัดหรือวิเคราะห์ salinomycin

Table 14. Peak areas of ionophores compounds extracted using 90% methanol.

No.	Peak areas				
	Lasalocid	Maduramicin	Monensin	Narasin	Salinomycin
1	16922	30818	52482	6460	18268
2	17635	31468	52541	6350	17742
3	17235	30940	52457	6324	17419
4	17849	32119	55794	6853	18817
5	18583	31113	54314	6369	18458
6	18469	32398	55640	6638	17826
Average	17782.17	31476.00	53871.33	6499.00	18088.33
SD	660.07	650.48	1595.06	207.79	517.04
%RSD	3.71	2.07	2.96	3.20	2.86

Table 15. Peak areas of ionophores compounds extracted using 90% acetonitrile.

No.	Peak areas				
	Lasalocid	Maduramicin	Monensin	Narasin	Salinomycin
1	15520	30022	51256	5520	16514
2	16648	32550	53166	5973	17044
3	16599	32018	51538	6134	17059
4	17586	33520	53609	6389	16915
5	16974	32648	52953	6429	16085
6	18785	35631	56686	7371	18542
Average	17018.67	32731.50	53201.33	6302.67	17026.50
SD	1095.75	1839.52	1945.41	618.78	831.82
%RSD	6.44	5.62	3.66	9.82	4.89

Table 16. Results of the t-test for each compounds between extraction with 90% methanol and 90% acetonitrile.

Compounds	t-statistic	p-value	Significance ($\alpha=0.05$)
Lasalocid	0.85	0.42	Not significant ($p \geq 0.05$)
Maduramicin	-0.69	0.509	Not significant ($p \geq 0.05$)
Monensin	0.28	0.788	Not significant ($p \geq 0.05$)
Narasin	0.47	0.659	Not significant ($p \geq 0.05$)
Salinomycin	2.63	0.028	Significant ($p \leq 0.05$)

5.6 ผลการศึกษาค่า matrix effect ของ homogeneity ของยาในกลุ่ม ionophores ตาม Table 17 พบว่าทุกสารมีค่า matrix effect ในช่วง 91.36–248.25% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลของ matrix มีอิทธิพลต่อการตอบสนองของสัญญาณจากเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเฉพาะ lasalocid ที่มีค่า matrix effect สูงถึง 248.25% บ่งชี้ว่ามี signal enhancement ขณะที่สารอื่น ๆ เช่น monensin และ maduramicin มีค่า matrix effect ประมาณ 91–92% สะท้อนถึง signal suppression เล็กน้อย ส่วน narasin และ salinomycin อยู่ในระดับใกล้เคียง 100% (101.96% และ 119.78%) แสดงถึงการถูกรบกวนจาก matrix ไม่มากนัก

ผลการศึกษาค่า matrix effect ของ drug carryover ของยากลุ่ม ionophores ตาม Table 18 พบว่าสารแต่ละชนิดมีระดับการรบกวนจาก matrix แตกต่างกันโดย maduramicin (62.60%), lasalocid (75.65%) และ monensin (76.97%) แสดงถึง signal suppression ในขณะที่ narasin (93.96%) มี signal suppression น้อย ส่วน salinomycin (105.11%) พบ signal enhancement เล็กน้อย เมื่อพิจารณาจะเห็นว่า narasin และ salinomycin อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ขณะที่อีกสามสารมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ สะท้อนให้เห็นถึงความจำเป็นในการใช้ matrix-fortified calibration curve เพื่อแก้ไขผลกระทบจาก matrix และเพิ่มความถูกต้องของการวิเคราะห์

ดังนั้น สรุปได้ว่า ผลของ matrix effect แตกต่างกันไปตามชนิดของสาร ซึ่งมีผลต่อความถูกต้องและความแม่นยำในการทดสอบ โดยเฉพาะในกรณีที่ matrix effect มีค่ามากกว่า 120% หรือ น้อยกว่า 80% จำเป็นต้องใช้เทคนิค matrix-fortified calibration curve เพื่อแก้ไขปัญหาและเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลทดสอบ เนื่องจากการใช้ standard solution calibration curve เพียงอย่างเดียวอาจก่อให้เกิด systematic bias ได้

Table 17. Calibration curve parameters and matrix effects of ionophores compounds for homogeneity.

Compounds	Slope		Intercept		<i>r</i>		Matrix effect
	Std	Matrix	Std	Matrix	Std	Matrix	
	solution	matching	solution	matching	solution	matching	
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	
	curve	curve	curve	curve	curve	curve	
Lasalocid	1.14	2.83	2.92	12.45	0.9999	0.9982	248.25
Maduramicin	5.41	6.48	48.4	56.21	0.9977	0.9978	91.72
Monensin	5.09	4.65	36.03	17.33	0.9971	0.9986	91.36
Narasin	1.02	1.04	7.54	3.39	0.9984	0.9990	101.96
Salinomycin	3.02	2.77	26.82	14.48	0.9975	0.9982	119.78

Table 18. Calibration curve parameters and matrix effects of ionophores compounds for drug carry over.

Compounds	Slope		Intercept		<i>r</i>		Matrix effect
	Std	Matrix	Std	Matrix	Std	Matrix	
	solution	matching	solution	matching	solution	matching	
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	
	curve	curve	curve	curve	curve	curve	
Lasalocid	64.36	48.69	-4.62	6.05	0.9985	0.9993	75.65
Maduramicin	202.44	212.79	73.86	19.93	0.9972	0.9981	62.60
Monensin	189.52	145.87	37.38	23.5	0.9973	0.9969	76.97
Narasin	36.95	34.72	9.4	6.11	0.9983	0.9987	93.96
Salinomycin	122.04	76.4	33.55	11.19	0.9980	0.9955	105.11

5.7 การศึกษาระยะเวลาการสกัด โดยแปรระดับระยะเวลาการสกัดเป็น 15, 30 และ 60 นาที ตาม Table 19 - 28

จากผลการศึกษา %recovery ของ ionophores ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งระยะเวลาในการสกัดและ calibration curve ที่ใช้มีผลต่อ %recovery โดยการใช้ matrix-fortified calibration curve ให้ค่า %recovery สูงกว่าและสะท้อนผลใกล้เคียงกับสถานะจริงของตัวอย่างมากกว่าการใช้ standard solution calibration curve ในทุกสาร ซึ่งสะท้อนถึงอิทธิพลของ matrix effect ที่ส่งผลต่อการทดสอบ สำหรับระยะเวลาในการสกัดพบความแตกต่างตามชนิดสารโดย lasalocid, maduramicin และ narasin ให้ค่า %recovery สูงสุดเมื่อสกัดเป็นเวลา 60 นาที ในทางกลับกัน monensin และ salinomycin มีค่า %recovery สูงที่ 15 นาที แต่ลดลงชัดเจนเมื่อเพิ่มเวลา ซึ่งอาจเกิดจากการสลายตัวหรือการสูญเสียสารในสถานะการสกัดที่ยาวนานขึ้น โดยภาพรวมค่า %RSD ส่วนใหญ่ต่ำกว่า 5% ยืนยันถึงความแม่นยำและความเสถียรของวิธี

ดังนั้นแนวทางที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบคือการเลือกใช้ matrix-fortified calibration curve ร่วมกับเวลาในการสกัดที่เหมาะสมเฉพาะต่อชนิดสาร ได้แก่ 60 นาที สำหรับ lasalocid, maduramicin และ narasin และ 15 นาทีสำหรับ monensin และ salinomycin ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการทดสอบใน matrix อาหารสัตว์ได้มากที่สุด

Table 19. Calibration curve results of lasalocid at 60 mg/kg for standard solution and matrix-fortified samples under different extraction times.

No.	Extraction Time 15 min		Extraction Time 30 min		Extraction Time 60 min	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	55.16	67.97	54.67	67.35	57.10	70.39
2	52.43	64.55	53.81	66.28	58.16	71.72
3	55.05	67.83	54.17	66.73	58.52	72.17
4	54.99	67.76	54.18	66.74	58.19	71.75
5	56.04	69.07	55.76	68.71	58.91	72.65
6	55.97	68.98	53.26	65.60	59.22	73.04
Average	54.94	67.69	54.31	66.90	58.35	71.95
SD	1.32	1.65	0.85	1.06	0.74	0.92
RSD	2.40	2.43	1.56	1.59	1.27	1.28

Table 20. Calibration curve results for % recovery of lasalocid from a 60 mg/kg standard solution and matrix-fortified samples at different extraction times.

No.	Extraction Time 15 min		Extraction Time 30 min		Extraction Time 60 min	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	91.93	113.28	91.12	112.26	95.16	117.32
2	87.38	107.58	89.69	110.47	96.93	119.53
3	91.75	113.05	90.28	111.21	97.53	120.28
4	91.66	112.93	90.30	111.24	96.98	119.58
5	93.40	115.11	92.93	114.52	98.18	121.09
6	93.28	114.97	88.77	109.33	98.70	121.74
Average	91.57	112.82	90.51	111.50	97.25	119.92
SD	2.19	2.74	1.41	1.77	1.23	1.54
RSD	2.40	2.43	1.56	1.59	1.27	1.28

Table 21. Calibration curve results of maduramicin at 60 mg/kg for standard solution and matrix-fortified samples under different extraction times.

No.	เวลาการสกัด 15 นาที		เวลาการสกัด 30 นาที		เวลาการสกัด 60 นาที	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	54.74	63.88	52.89	61.58	60.86	71.49
2	52.94	61.65	52.95	61.66	62.59	73.65
3	55.71	65.08	53.51	62.35	61.99	72.90
4	56.32	65.85	56.99	66.68	60.95	71.61
5	54.24	63.26	58.97	69.14	62.38	73.38
6	54.66	63.78	57.96	67.89	61.69	72.53
Average	54.77	63.92	55.55	64.88	61.74	72.59
SD	1.17	1.46	2.74	3.41	0.72	0.90
RSD	2.14	2.29	4.94	5.26	1.17	1.23

Table 22. Calibration curve results for % recovery of maduramicin from a 60 mg/kg standard solution and matrix-fortified samples at different extraction times.

No.	เวลาการสกัด 15 นาที		เวลาการสกัด 30 นาที		เวลาการสกัด 60 นาที	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	91.23	106.47	88.15	102.64	101.43	119.15
2	88.24	102.75	88.25	102.76	104.32	122.74
3	92.84	108.47	89.18	103.92	103.32	121.50
4	93.87	109.74	94.99	111.14	101.59	119.34
5	90.41	105.44	98.29	115.24	103.96	122.29
6	91.10	106.31	96.61	113.15	102.82	120.88
Average	91.28	106.53	92.58	108.14	102.91	120.99
SD	1.96	2.43	4.57	5.68	1.20	1.49
RSD	2.14	2.29	4.94	5.26	1.17	1.23

Table 23. Calibration curve results of monensin at 60 mg/kg for standard solution and matrix-fortified samples under different extraction times.

No.	เวลาการสกัด 15 นาที		เวลาการสกัด 30 นาที		เวลาการสกัด 60 นาที	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	63.48	70.55	62.58	69.57	53.17	59.21
2	62.74	69.74	63.17	70.21	52.35	58.31
3	63.28	70.33	59.25	65.90	51.09	56.93
4	62.82	69.83	57.43	63.90	49.86	55.58
5	65.34	72.60	54.13	60.27	50.09	55.83
6	65.11	72.35	53.72	59.82	48.43	54.00
Average	63.79	70.90	58.38	64.95	50.83	56.65
SD	1.14	1.26	4.05	4.45	1.74	1.91
RSD	1.79	1.77	6.94	6.86	3.42	3.37

Table 24. Calibration curve results for % recovery of monensin from a 60 mg/kg standard solution and matrix-fortified samples at different extraction times.

No.	เวลาการสกัด 15 นาที		เวลาการสกัด 30 นาที		เวลาการสกัด 60 นาที	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	105.80	117.59	104.30	115.95	88.61	98.69
2	104.57	116.24	105.28	117.02	87.25	97.19
3	105.46	117.22	98.74	109.83	85.15	94.89
4	104.70	116.38	95.71	106.50	83.10	92.63
5	108.89	120.99	90.21	100.45	83.48	93.04
6	108.52	120.59	89.53	99.70	80.71	90.01
Average	106.32	118.17	97.30	108.24	84.72	94.41
SD	1.91	2.10	6.75	7.42	2.90	3.18
RSD	1.79	1.77	6.94	6.86	3.42	3.37

Table 25. Calibration curve results of narasin at 60 mg/kg for standard solution and matrix-fortified samples under different extraction times.

No.	เวลาการสกัด 15 นาที		เวลาการสกัด 30 นาที		เวลาการสกัด 60 นาที	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	61.39	65.43	61.77	65.87	60.26	64.17
2	57.87	61.50	59.76	63.61	61.76	65.85
3	61.81	65.91	58.43	62.12	62.35	66.51
4	61.34	65.38	58.44	62.13	63.12	67.37
5	60.90	64.89	60.09	63.99	64.56	68.99
6	61.33	65.37	57.41	60.98	63.80	68.14
Average	60.77	64.75	59.32	63.12	62.64	66.84
SD	1.45	1.63	1.55	1.74	1.54	1.72
RSD	2.39	2.51	2.61	2.75	2.45	2.58

Table 26. Calibration curve results for % recovery of narasin from a 60 mg/kg standard solution and matrix-fortified samples at different extraction times.

No.	เวลาการสกัด 15 นาที		เวลาการสกัด 30 นาที		เวลาการสกัด 60 นาที	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	102.31	109.06	102.96	109.78	100.43	106.95
2	96.45	102.49	99.60	106.01	102.93	109.74
3	103.02	109.84	97.38	103.53	103.92	110.86
4	102.23	108.97	97.41	103.56	105.20	112.29
5	101.51	108.15	100.16	106.64	107.61	114.99
6	102.22	108.95	95.69	101.63	106.34	113.57
Average	101.29	107.91	98.86	105.19	104.40	111.40
SD	2.42	2.71	2.58	2.90	2.56	2.87
RSD	2.39	2.51	2.61	2.75	2.45	2.58

Table 27. Calibration curve results of salinomycin at 60 mg/kg for standard solution and matrix-fortified samples under different extraction times.

No.	เวลาการสกัด 15 นาที		เวลาการสกัด 30 นาที		เวลาการสกัด 60 นาที	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	68.34	69.54	65.72	66.68	38.95	37.45
2	68.12	69.30	67.32	68.43	34.35	32.43
3	69.22	70.50	60.07	60.51	29.84	27.51
4	64.88	65.76	56.88	57.03	27.33	24.76
5	67.58	68.71	51.85	51.54	26.68	24.05
6	71.49	72.98	52.56	45.93	25.67	22.95
Average	68.27	69.47	59.07	58.35	30.47	28.19
SD	2.16	2.36	6.52	8.70	5.19	5.67
RSD	3.16	3.39	11.04	14.90	17.03	20.10

Table 28. Calibration curve results for % recovery of salinomycin from a 60 mg/kg standard solution and matrix-fortified samples at different extraction times.

No.	เวลาการสกัด 15 นาที		เวลาการสกัด 30 นาที		เวลาการสกัด 60 นาที	
	std	matrix	std	matrix	std	matrix
	solution	fortified	solution	fortified	solution	fortified
	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration	calibration
	curve	curve	curve	curve	curve	curve
1	113.90	115.90	109.54	111.14	64.91	62.42
2	113.54	115.50	112.20	114.05	57.25	54.06
3	115.37	117.50	100.12	100.86	49.74	45.85
4	108.13	109.60	94.80	95.05	45.54	41.27
5	112.64	114.52	86.42	85.90	44.46	40.09
6	119.16	121.64	87.60	76.55	42.78	38.25
Average	113.79	115.78	98.45	97.26	50.78	46.99
SD	3.60	3.93	10.87	14.49	8.65	9.44
RSD	3.16	3.39	11.04	14.90	17.03	20.10

6. สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีทดสอบยาในกลุ่ม ionophores ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยใช้เทคนิค liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของตัวทำละลายมีผลอย่างมากต่อสมรรถนะของการแยกสาร โดย 40% methanol แสดงผลการแยกที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งในด้านค่า theoretical plates และค่า asymmetry factor ซึ่งบ่งชี้ถึงความสมมาตรของพีคที่ดี ส่วน 60% methanol แม้มีค่าประสิทธิภาพต่ำกว่าเล็กน้อย แต่ยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้และเหมาะสมในกรณีที่ต้องการลดเวลาในการวิเคราะห์ สำหรับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่าง 90% methanol และ 90% acetonitrile พบว่า lasalocid, maduramicin, monensin และ narasin ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) สะท้อนถึงความสามารถในการสกัดที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ในกรณีของ salinomycin พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการเลือกตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดสารบางชนิดโดยเฉพาะ

นอกจากนี้ การศึกษา matrix effect แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของอาหารสัตว์มีผลต่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์อย่างมาก โดยค่าการรบกวนมีทั้งลักษณะ signal suppression และ signal enhancement แตกต่างกันไปในแต่ละสาร การใช้ standard calibration curve เพียงอย่างเดียวอาจก่อให้เกิด systematic bias ได้ ในขณะที่ matrix-fortified calibration curve สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวและให้ผลที่สะท้อนสภาพจริงของตัวอย่างได้ดีกว่า สำหรับการศึกษาระยะเวลาการสกัด พบว่ามีความแตกต่างระหว่างชนิดของสาร โดย lasalocid, maduramicin และ

narasin ให้ค่า %recovery สูงสุดที่เวลา 60 นาที ขณะที่ monensin และ salinomycin ให้ผลที่ดีที่สุดเมื่อสกัดเพียง 15 นาที แต่มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัด ซึ่งอาจเกิดจากการสลายตัวของสารหรือการสูญเสียระหว่างกระบวนการ สรุปลงได้ว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตอบสนองต่อเกณฑ์ความแม่นยำและความเที่ยงตรงได้ดี และสามารถนำไปใช้ในการประเมินทั้ง homogeneity และ drug carryover ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

7. ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้การตรวจสอบมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น แนะนำให้ใช้ matrix-fortified calibration curve เป็นมาตรฐานหลักในการวิเคราะห์ เนื่องจากสามารถชดเชยผลกระทบจาก matrix effect ได้ดีกว่า standard calibration curve การเลือกใช้ ตัวทำละลายและระยะเวลาการสกัดควรปรับให้เหมาะสมตามชนิดของสาร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ % recovery และลดความคลาดเคลื่อนของผลวิเคราะห์ ทั้งนี้ ควรมีการทดสอบเพิ่มเติมกับตัวอย่างอาหารสัตว์หลายชนิดและหลายสภาวะ เพื่อประเมินความสามารถในการประยุกต์ใช้ของวิธีในสภาพจริงที่หลากหลายมากขึ้น รวมถึงควรมีการตรวจสอบความเสถียรของสารระหว่างกระบวนการสกัดและการเก็บรักษาตัวอย่าง เพื่อป้องกันการสูญเสียหรือการเปลี่ยนแปลงของสารที่อาจส่งผลต่อค่าการวิเคราะห์

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2568 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

- Ursula V., M. Chedin., S. Yasar., C. von Holst., Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Part I. Application to targeted feed, J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008) 750–757.
- Ursula V., M. Chedin., S. Yasar., C. von Holst., Determination of ionophore coccidiostats in feeding stuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part II. Application to cross-contamination levels and non-targeted feed, J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (2011) 526–534.