

การพัฒนาวิธีทดสอบ tilmicosin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

ชูศักดิ์ อางสูงเนิน งามอาจ บุญบรรลุ ธนธรณ์ ดั่งทอง ปนัดดา เต้าชัยภูมิ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบ tilmicosin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยใช้เทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อทดสอบการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) ผลการทดสอบพบว่า mobile phase ที่มี 20% acetonitrile เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ค่า retention time และประสิทธิภาพการแยกที่สมดุล ขณะที่ 40% methanol เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมสารมาตรฐาน การสกัดด้วย 90% methanol และ 90% acetonitrile ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) และสามารถใช้แทนกันได้ การสร้าง calibration curve พบว่า matrix-fortified calibration curve ให้ผลความแม่นยำมากกว่าเนื่องจากลดผลกระทบจาก matrix effect ส่วนการศึกษาระยะเวลาการสกัดพบว่า 30 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ได้ต่อไป

คำสำคัญ : tilmicosin อาหารสัตว์ที่ผสมยา การกระจายตัวของยาเป็นเนื้อเดียวกัน การปนเปื้อนข้าม
liquid chromatography-mass spectrometry

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Chusak Ardsoongnearn, Ongart Boonbanlu, Thanathorn Duangthong,
Panadda Taochaiyaphum

Abstract

This study aimed to develop a method for the determination of tilmicosin in medicated animal feed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method was designed to evaluate homogeneity and drug carryover. The results indicated that a mobile phase containing 20% acetonitrile was the most suitable, as it provided a balanced retention time and separation efficiency, while 40% methanol was found to be the most appropriate solvent for preparing standard solutions. Extraction with 90% methanol and 90% acetonitrile showed no significant difference ($p \geq 0.05$), suggesting that they can be used interchangeably. For calibration curve construction, the matrix-fortified calibration curve yielded greater accuracy by minimizing matrix effects. The extraction time study demonstrated that 30 minutes was the most suitable duration. Therefore, the developed method can be applied for method validation in the analysis of medicated animal feed using liquid chromatography-mass spectrometry.

Keywords: tilmicosin, 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

การใช้ยา tilmicosin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาเป็นวิธีการที่สำคัญและมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคในสัตว์ โดยเฉพาะในสุกรและสัตว์ปีก ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบทางเดินหายใจ เช่น โรคปอดบวมที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ยานี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่รุนแรง ช่วยลดอัตราการเจ็บป่วยและตายของสัตว์เลี้ยง การผสม tilmicosin ในอาหารสัตว์จะช่วยให้สัตว์ได้รับการรักษาอย่างทั่วถึงและมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปแล้วจะมีการใช้ tilmicosin ในอัตราส่วน 1,000 ถึง 2,000 กรัมต่ออาหารสัตว์ 1,000 กิโลกรัม และควรใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 15 วัน เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในการรักษาและป้องกันโรค การควบคุมคุณภาพของอาหารสัตว์ที่ผสมยานี้เป็นสิ่งสำคัญ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ การใช้ยา tilmicosin ยังช่วยลดความเสี่ยงจากการเกิดเชื้อดื้อยาในสัตว์ ซึ่งเป็นปัญหาที่ทวีความรุนแรงขึ้นในปัจจุบัน การพัฒนากระบวนการผลิตอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพสูงและปลอดภัยจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อสนับสนุนการเลี้ยงสัตว์อย่างยั่งยืนและเพิ่มความสามารถในการแข่งขันในตลาดเกษตรกรรม

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

Robin S. Readnour et al. (1997) ตรวจสอบปริมาณ tilmicosin ในอาหารสัตว์ในช่วงความเข้มข้น 100 - 600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยสกัด tilmicosin จากอาหารสุกรด้วยการเติมสารสกัดอาหารสุกร 200 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 20:80 ที่ pH 2.5 และมี dibutylammonium phosphate 25 mM) ลงในอาหารสัตว์ 20 กรัม แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธี liquid chromatography (LC) แบบ gradient แยก tilmicosin ออกจาก feed matrix ในเวลา 30 นาที recovery ของ tilmicosin จากอาหารสัตว์ที่เติมสารมาตรฐานอยู่ในช่วง 96.7 - 112% โดยมีค่า coefficients of variation (CV) อยู่ในช่วง 1.4 - 3.9% การวิเคราะห์ tilmicosin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาให้ค่า recovery เฉลี่ย 92.7% ของปริมาณที่ระบุบนฉลากสำหรับอาหารชนิดเม็ดที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 99.1% สำหรับอาหารชนิดผงที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การวิเคราะห์ tilmicosin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยามีค่า CV อยู่ในช่วง 2.6 - 3.8% วิธีนี้ไม่พบการรบกวนจากยาอื่นอีก 18 ชนิด

Yibar Artun et al. (2014) การตรวจหาสารตกค้างกลุ่ม macrolides ในอาหารสัตว์เพื่อความปลอดภัยของอาหารเป็นประเด็นที่สำคัญมาก จึงได้มีการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธี liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อหาปริมาณสารตกค้างของ macrolides 4 ชนิด (erythromycin, spiramycin, tilmicosin และ tylosin) ในอาหารสัตว์ โดยใช้ roxithromycin (ROX) ซึ่งเป็น macrolides ที่ไม่ได้ใช้ในทางสัตวแพทย์เป็น internal standard การวิเคราะห์ mass spectral ทำในโหมด positive-ion โดยใช้การตรวจวัดแบบ multiple reaction monitoring ด้วยไอออน (mass-to-charge ratio, m/z) ดังนี้: m/z 837.4→679.2; m/z 734.4→576.2; m/z 422.4→174.1; m/z 869.1→696.1 และ m/z 916.4→772.4 สำหรับ roxithromycin (ROX), erythromycin (ERY), spiramycin (SPI), tilmicosin (TIL) และ tylosin (TYL) ตามลำดับ วิธีนี้ให้ค่าความแม่นยำ ความเที่ยง และการคืนกลับที่ดี โดยมีค่าการคืนกลับเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 98.9% (TIL) ถึง 101% (ERY) และค่าเฉลี่ยรวม 99.9% ชีตจำกัดของการตรวจวัด (LODs) ของ ERY, SPI, TIL และ TYL อยู่ที่ 5.1, 6.6, 6.7 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และชีตจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQs) อยู่ที่ 8.5, 11.1, 11.2 และ 12.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ค่าชีตจำกัดของการตัดสินใจ ($CC\alpha$) และความสามารถในการตรวจจับ ($CC\beta$) ที่น่าพอใจ วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีความไวสูง และเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่ม macrolides ในอาหารสัตว์พร้อมกันหลายชนิด

Piatkowska Marta et al. (2015) พัฒนาวิธีการตรวจสารตกค้าง 120 ชนิดพร้อมกันในไข่สด โดยสารเหล่านี้แบ่งเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะ tetracyclines 6 ชนิด, fluoroquinolones 11 ชนิด, sulphonamides 17 ชนิด, nitroimidazoles 9 ชนิด, amphenicoles 2 ชนิด, cephalosporines 7 ชนิด, penicilines 8 ชนิด, macrolides 8 ชนิด, ยาถ่ายพยาธิ benzimidazoles 20 ชนิด, coccidiostats 14 ชนิด, insecticides 3 ชนิด, dyes 12 ชนิด และสารอื่นๆ อีก 3 ชนิด วิธีการเตรียมตัวอย่างทำโดยสกัดด้วย 0.1% formic acid ในสารละลาย acetonitrile:น้ำ (อัตราส่วน 8:2) โดยเติม EDTA และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดผ่านดิสก์ HybridSPE การแยกสารใช้คอลัมน์ C8 และใช้ตัวชะที่เป็นส่วนผสมของ (A) methanol: acetonitrile (8:2) และ (B) 0.1% formic acid แบบค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้น ผลการทดสอบความถูกต้องตามมาตรฐาน Commission Decision 2002/657/EC พบว่ามีความเป็นเส้นตรง ($r \geq 0.99$), การกลับคืน 75-108%, ความแม่นยำในการวิเคราะห์ซ้ำ CV 1.60-15.9%, ความแม่นยำในการทำซ้ำต่างวัน CV 2.60-15%, ชีตจำกัดการตัดสินใจ 2.25-1156 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และความสามารถในการตรวจจับ 2.04-1316 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิธีนี้ได้นำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างไข่จริงจำนวน 150 ตัวอย่าง ที่เก็บจากโครงการเฝ้าระวังและควบคุมคุณภาพ

George Kaklamanos et al. (2013) การศึกษาแนวโน้มใหม่ของเทคโนโลยี full scan mass spectrometry ได้ถูกนำมาประเมินเพื่อระบุสารด้านแบคทีเรียหลากหลายชนิดในอาหารสัตว์ โดย Orbitrap Exactive ที่มีประสิทธิภาพในการแยกแยะสูงนั้นให้ความแม่นยำในการวัดมวลที่ดีเยี่ยม ส่งผลให้สามารถวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณในตัวอย่างที่ซับซ้อนอย่างอาหารสัตว์ได้ การเตรียมตัวอย่างใช้วิธีการทั่วไปอย่างง่าย โดยสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ผสมเครื่อง mass spectrometer ทำงานในโหมด full scan และสลับช่วงไฟฟ้าระหว่างบวกและลบ โดย

ใช้ Heated Electrospray Ionization (H-ESI) การตรวจวัดใช้ระบบควบคุมอัตโนมัติของจำนวนไอออนที่เข้าสู่เครื่องวิเคราะห์มวล ร่วมกับการควบคุมเวลาในการฉีดไอออน ทำให้สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากความซับซ้อนของตัวอย่างอาหารสัตว์ ประสิทธิภาพในการแยกแยะจึงเป็นกุญแจสำคัญในการแยกมวลที่รบกวนจากเมทริกซ์และมวลที่แท้จริงของสารเป้าหมาย เพื่อให้ได้ความแม่นยำของมวลที่ 5 ppm นอกจากนี้การใช้ช่วงมวลแคบ (± 5 ppm) ช่วยเพิ่มความจำเพาะของวิธี ทำให้อัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนของสารดีขึ้น การศึกษาได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อย่างละเอียดในอาหารสุกร และพบว่าการใช้ Liquid Chromatography ร่วมกับ High Resolution Orbitrap Exactive เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการวิเคราะห์สารต้านแบคทีเรียที่ไม่พึงประสงค์ในการควบคุมอาหารสัตว์ เพื่อรับประกันความปลอดภัยของอาหารภายใต้กรอบกฎหมายห่วงโซ่อาหารของสหภาพยุโรป

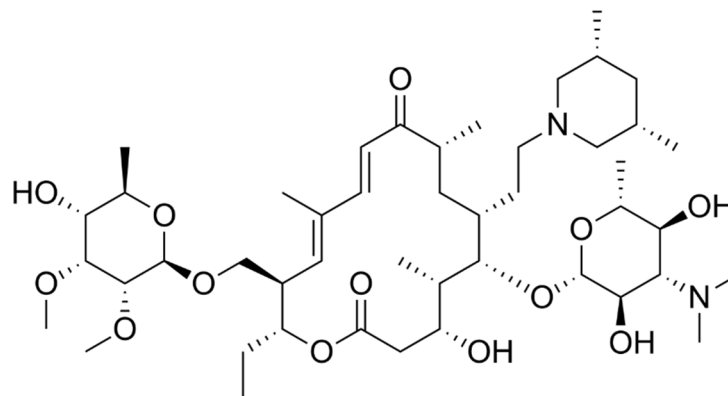


Fig. 1 Structure of tilmicosin

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบ tilmicosin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับทดสอบปริมาณ tilmicosin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา และการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ที่ช่วงระดับความเข้มข้น 100 - 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) ในช่วงระดับ 1 - 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการพัฒนาวิธีทดสอบ tilmicosin 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 25 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 M Ω .cm (น้ำ DI)

4.3 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน tilmicosin ยี่ห้อ HPC

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 ที่เหมาะกับลักษณะของสาร หา precursor ion และ product ion ที่เฉพาะเจาะจง และปรับแต่งพารามิเตอร์ของ mass spectrometry เช่น collision energy และ Dwell time เพื่อให้ได้ sensitivity ที่ดีที่สุด
- 4.4.2 ศึกษาสัดส่วนของ mobile phase ที่มี acetonitrile แตกต่างกันระหว่าง 10 - 50 % มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลขององค์ประกอบตัวทำละลายต่อสมบัติทาง chromatography ของ tilmicosin
- 4.4.3 การศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นของตัวอย่างจริง ของการทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญและการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) การประเมินผลด้วย correlation coefficient (r) ที่ต้องมีค่า $r \geq 0.995$ เพื่อยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณตอบสนอง ซึ่งจะเพิ่มความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
- 4.4.4 การศึกษาการใช้ acetonitrile และ methanol ในการละลายที่ความเข้มข้น 40%, 60%, 80% และ 100% เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม
- 4.4.5 ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดตัวอย่างโดยใช้ 90% methanol และ 90% acetonitrile เพื่อเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสม

- 4.4.6 การศึกษา matrix effect ของ homogeneity และ drug carryover โดยการเทียบ slope ของ matrix-matching calibration curve และ standard calibration curve solution
- 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

5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษา condition ของ Liquid Chromatography (LC) และ m/z ตาม Table 1 และ Table 2 โดยใช้คอลัมน์ Phenomenex Kinetex C18 (1.7 μ m, 100 $\times$ 2.1 mm) ภายใต้การไหลแบบ gradient โดย mobile phase ประกอบด้วยสารละลาย A คือ 0.1% formic acid ในน้ำ และสารละลาย B คือ 0.1% formic acid ใน acetonitrile โดยเริ่มต้นที่ A:B = 80:20 (v/v) และปรับเป็น 20:80 ภายใน 3 นาที คงสภาพดังกล่าวจนถึง 4 นาที จากนั้นปรับกลับเป็น 80:20 ที่ 4.1 นาที และสิ้นสุดที่ 5 นาที อัตราการไหลเท่ากับ 0.2 mL/min อุณหภูมิคอลัมน์ 40 °C อุณหภูมิตัวอย่าง 10 °C ปริมาตรฉีด 2 μ L การตรวจวัดทำด้วยเครื่อง tandem mass spectrometer ที่ใช้โหมด ionization แบบ positive ion (ESI) แรงดันไฟฟ้า 3500 V พร้อม sheath gas, auxiliary gas และ sweep gas ที่ 40, 3 และ 1 (Arb) ตามลำดับ อุณหภูมิ ion transfer tube และ vaporizer เท่ากับ 325 °C และ 300 °C ตามลำดับ โดยใช้ความดัน CID gas ที่ 1.5 mTorr

Table 1. LC condition.

Parameters	Value		
Column:	Phenomenex, Kinetex 1.7 μ m C18 100 $\times$ 2.1 mm		
Mobile phase:	A: 0.1%FA in water		
	B: 0.1%FA in Acetonitrile		
	Time	A	B
	0	80	20
	3	20	80
	3.1	20	80
	4	20	80
	4.1	80	20
	5	80	20
Flow rate:	0.2 mL/min		
Column temperature:	40 °C		
Sample temperature:	10 °C		
Injection volume:	2 μ L		
End time	5 min		

Table 2. 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

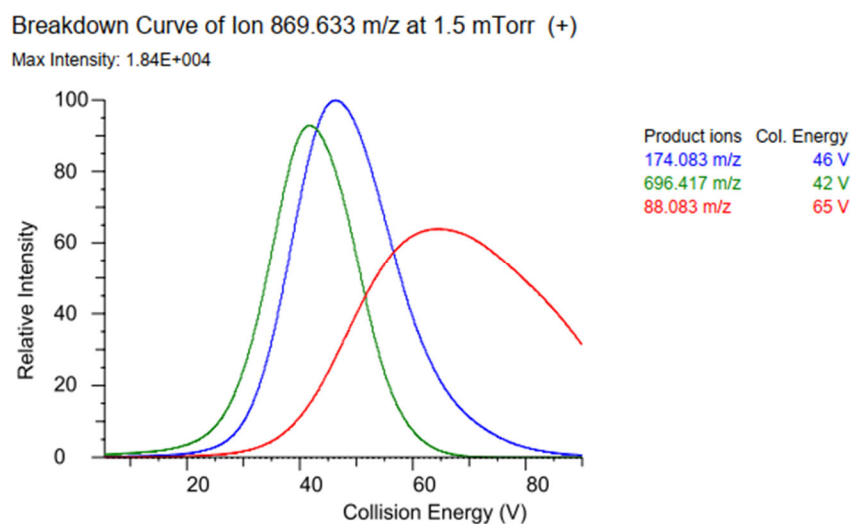


Fig. 2 CID breakdown curves of tilmicosin

Table 3. MS detection.

Compounds	Precursor ions (m/z)	Product ions (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)	Dwell Time (ms)
Tilmicosin	869.63	174.08	46	259	118.339
		696.41	42	259	118.339

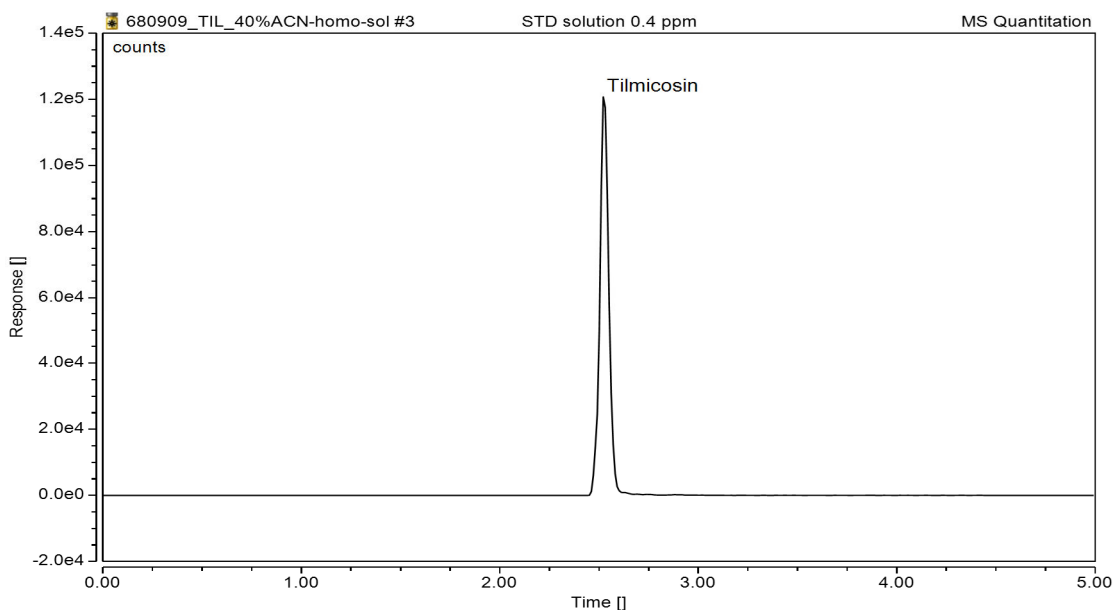


Fig. 3 Chromatogram ของ tilmicosin ที่ได้จากการปรับ condition ของ Liquid Chromatography (LC) และ m/z

5.2 จากการประเมินผลของ mobile phase ที่มีสัดส่วน acetonitrile แตกต่างกันระหว่าง 10–50% พบว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ acetonitrile มีผลต่อค่า retention time, peak area, asymmetry factor และ theoretical plates โดยที่เงื่อนไขการใช้ 10% ACN ให้จำนวน theoretical plates สูงที่สุดเท่ากับ 28,400 แต่มีค่า retention time เท่ากับ 2.9 นาที ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ที่ต้องการความรวดเร็ว ขณะที่การเพิ่มสัดส่วน acetonitrile เกิน 30% ทำให้ retention time สั้นลงอย่างมาก แต่จำนวน theoretical plates ลดลงอย่างชัดเจน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการแยกและความคมชัดของ peak ลดลง ทั้งนี้พบว่า เงื่อนไขที่ใช้ 20% acetonitrile ให้ผลการวิเคราะห์ที่สมมูลมากที่สุด โดยมี retention time เท่ากับ 2.5 นาที ไม่ยาวเกินไป ค่า asymmetry factor เท่ากับ 1.04 แสดงถึงความสมมาตรของ peak ที่ดี และมีจำนวน theoretical plates เท่ากับ 22,005 ซึ่งเพียงพอในการสะท้อนประสิทธิภาพของคอลัมน์ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า mobile phase ที่มี 20% acetonitrile เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบ tilmicosin ตาม Table 4 และ Fig. 4 - 8

Table 4. The test results of the proportion of acetonitrile used as the mobile phase.

Acetonitrile (%)	Retention Time (min)	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
10%	2.9	3098	1.2	28400
20%	2.5	2768	1.04	22005
30%	1.4	2418	1.21	2100
40%	1.0	3361	1.46	3981
50%	0.9	5025	1.07	2180

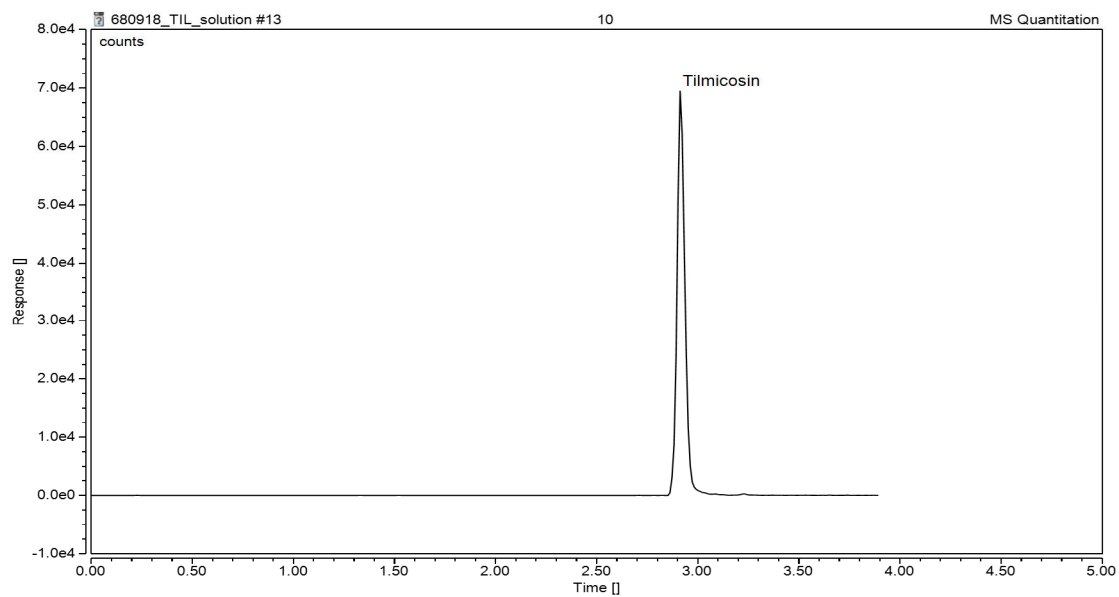


Fig. 4 Chromatogram of tilmicosin using mobile phase containing 10% acetonitrile

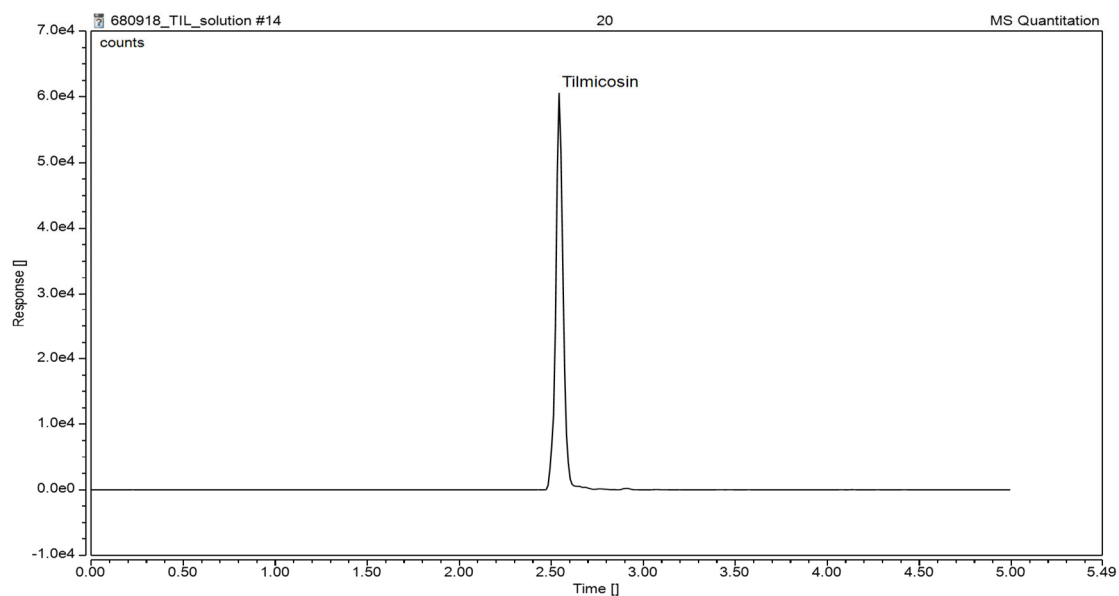


Fig. 5 Chromatogram of tilmicosin using mobile phase containing 20% acetonitrile

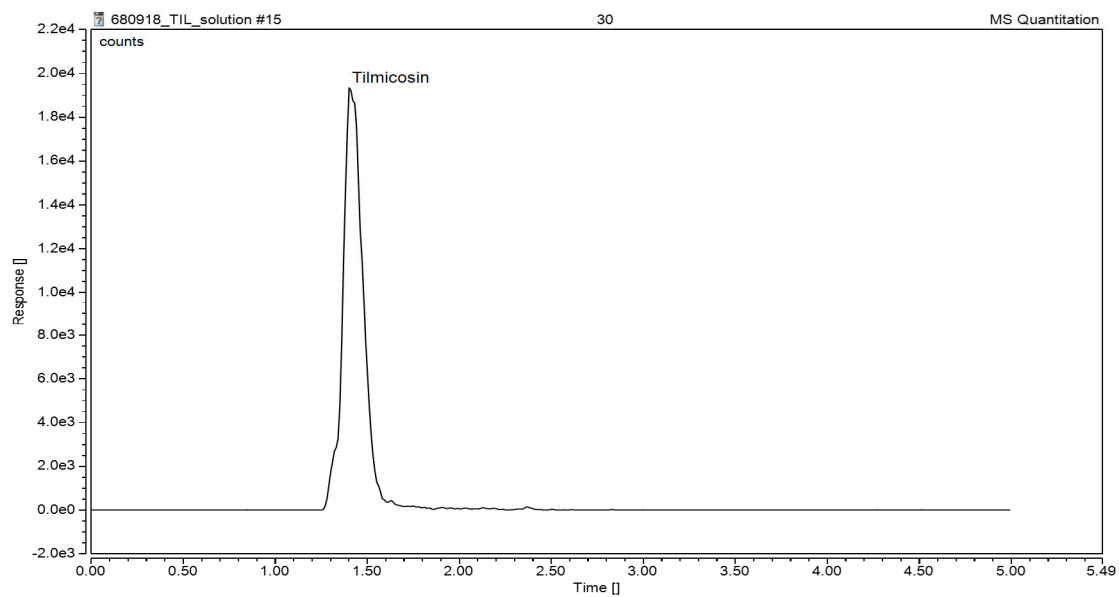


Fig. 6 Chromatogram of tilmicosin using mobile phase containing 30% acetonitrile

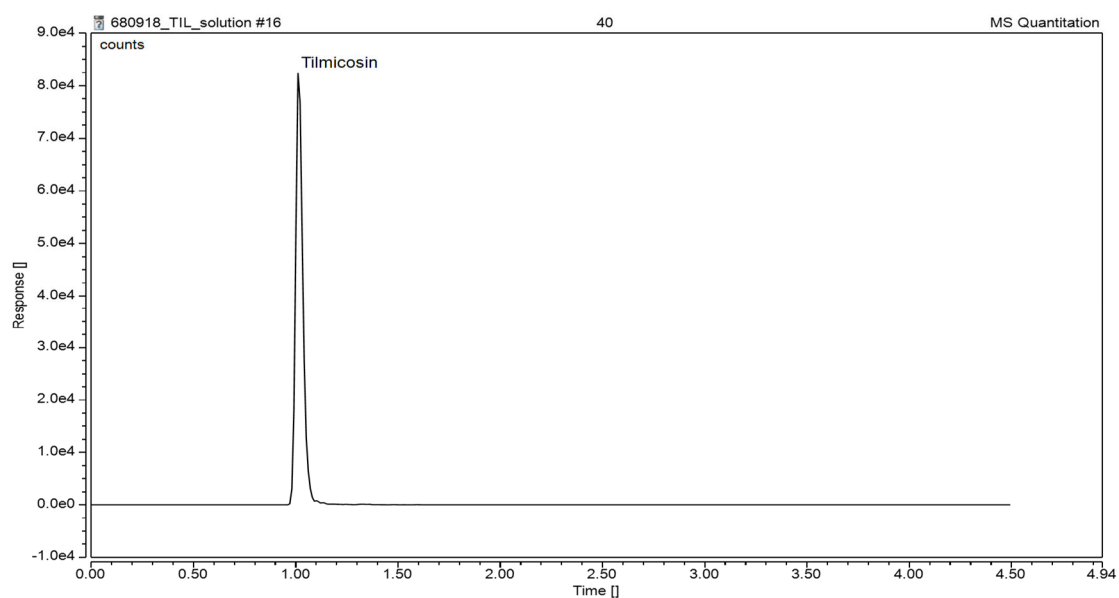


Fig. 7 Chromatogram of tilmicosin using mobile phase containing 40% acetonitrile

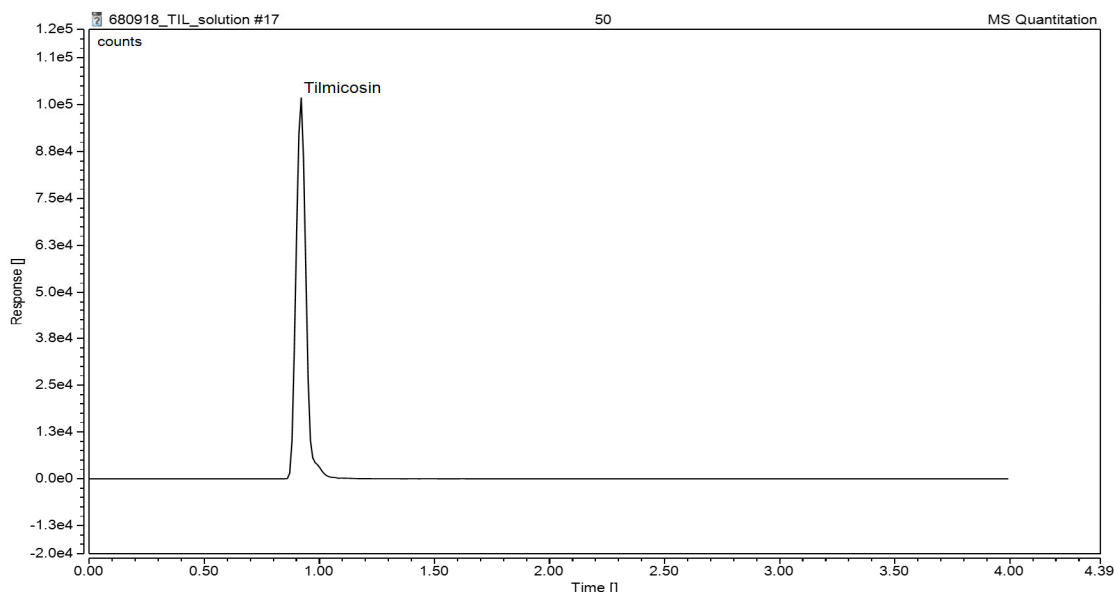


Fig. 8 Chromatogram of tilmicodin using mobile phase containing 50% acetonitrile

5.3 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของ homogeneity และ drug carryover จากผลการทดสอบตาม Table 5 และ Fig. 9 พบว่าค่า slope ของ standard solution calibration curve มีค่ามากกว่า matrix-fortified calibration curve ทั้งในกรณี homogeneity และ drug carryover โดยค่า slope อยู่ในช่วง 9406.92–13096.17 แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของการตอบสนองสัญญาณเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารละลายมาตรฐานกับ matrix จริง ขณะที่ค่า intercept อยู่ในช่วง 967.40–2139.98 โดยเฉพาะ drug carryover ในกรณี matrix มีค่า intercept สูงซึ่งอาจบ่งชี้ถึงผลกระทบจากองค์ประกอบของ matrix ที่ส่งผลต่อสัญญาณการวิเคราะห์ สำหรับค่า correlation coefficient (r) พบว่ามีค่ามากกว่า 0.9977 ในทุกกรณี แสดงถึงความเป็น linearity ที่ดีไม่ว่าจะใช้ standard solution calibration curve หรือ matrix-fortified calibration curve ก็ตาม อย่างไรก็ตาม ค่าความแตกต่างระหว่าง slope และ intercept ระหว่าง calibration curve สะท้อนให้เห็นว่า matrix อาจมีอิทธิพลต่อ matrix effect ดังนั้นการใช้ matrix-fortified calibration curve จึงมีความเหมาะสมมากกว่าในการประเมินความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีทดสอบในสถานะที่ใกล้เคียงกับตัวอย่างจริง

Table 5. Linearity of tilmicodin for homogeneity and drug carryover.

Item	Slope		Intercept		r	
	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix fortified calibration curve
Homogeneity	13096.17	9406.92	1047.65	1088.40	0.9984	0.9977
Drug carryover	12561.75	9449.73	967.40	2139.98	0.9988	0.9996

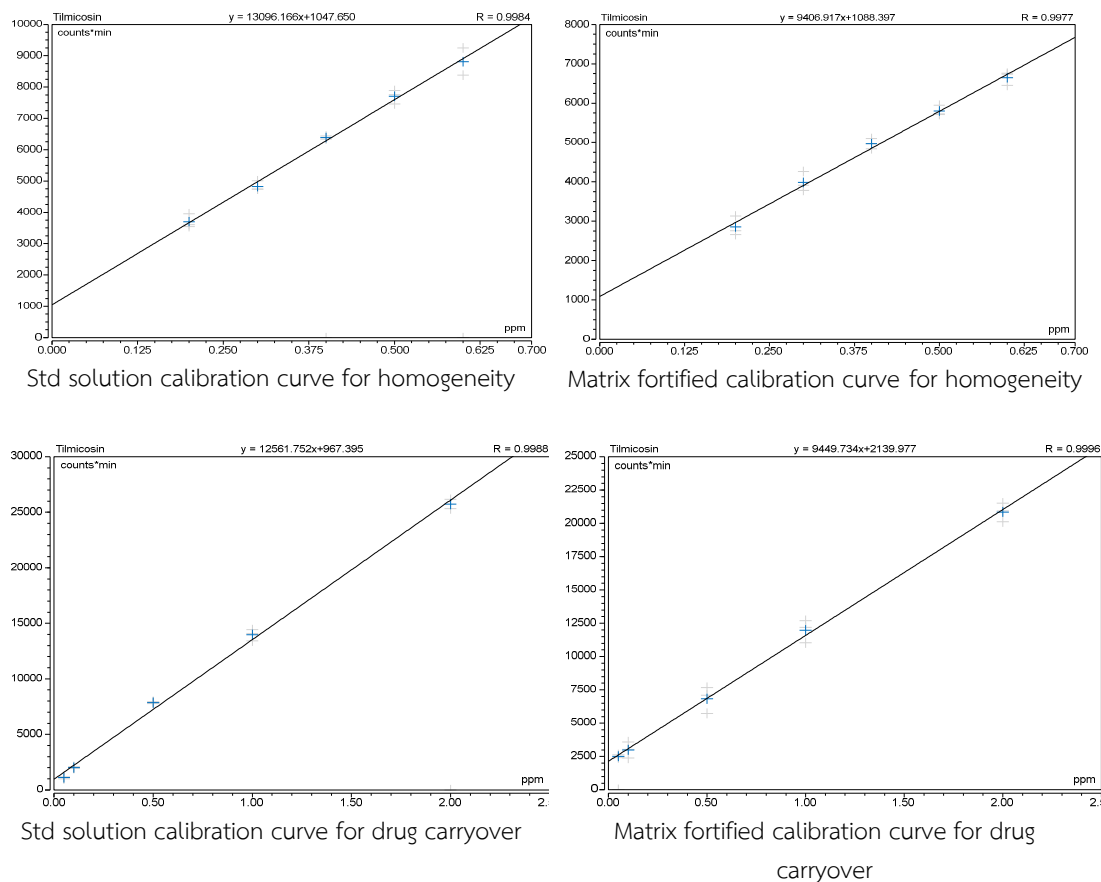


Fig. 9 Linearity of tilmicosin for homogeneity and drug carryover

5.4 ผลการศึกษาใช้ methanol และ acetonitrile ในการละลายสารมาตรฐาน tilmicosin ที่ความเข้มข้น 40%, 60%, 80% และ 100% ตาม Table 6 และ Table 7 โดยพิจารณาจากค่า peak area, asymmetry factor และจำนวน theoretical plates ผลการทดสอบพบว่า 40% methanol ให้ค่า peak area สูงเท่ากับ 7464 และค่า asymmetry factor เท่ากับ 1.02 และ theoretical plates เท่ากับ 17043 แสดงถึงความไวและประสิทธิภาพการแยกสารที่ดี ในขณะที่ 40% และ 60% acetonitrile ให้ค่า theoretical plates ใกล้เคียงกันเท่ากับ 16887 และ 16946 ตามลำดับ แต่ค่า peak area ต่ำ โดยเฉพาะที่ 60% acetonitrile ซึ่งมีค่าเพียง 4228 สรุปได้ว่า 40% methanol เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้สมดุลระหว่างประสิทธิภาพการแยกและความไวของการทดสอบ

Table 6. Chromatographic parameters at different methanol concentrations

Methanol (%)	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
40	7464	1.02	17043
60	5946	1.06	16420
80	7027	1.02	15976
100	6839	1.05	16072

Table 7. Chromatographic parameters at different acetonitrile concentrations

Acetonitrile (%)	Peak Area	Asymmetry Factor	Theoretical Plates
40	6496	1.07	16887
60	4228	0.91	16946
80	6256	1.01	15904
100	6615	1.04	15961

5.5 ผลศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายสองชนิดที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 90% methanol และ 90% acetonitrile ตาม Table 8 พบว่า การสกัดด้วย 90% methanol ให้ค่า average เท่ากับ 2643.00 โดยมีค่า SD เท่ากับ 182.02 และค่า %RSD เท่ากับ 6.89 ในขณะที่การสกัดด้วย 90% acetonitrile ให้ค่า average เท่ากับ 2720.83 โดยมีค่า SD เท่ากับ 168.64 และ %RSD เท่ากับ 6.20 ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าทั้งสองวิธีการสกัดมีความสม่ำเสมอของข้อมูลใกล้เคียงกัน เพื่อประเมินว่าค่าที่ได้จากทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ได้ทำการทดสอบทางสถิติด้วย independent t-test แบบ two-tailed ผลการทดสอบพบว่าค่า t เท่ากับ -0.77 และค่า p เท่ากับ 0.46 ซึ่งมีค่ามากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่กำหนดไว้ ($\alpha = 0.05$) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่สกัดด้วย methanol และ acetonitrile ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการใช้ตัวทำละลาย 90% methanol และ 90% acetonitrile ให้ผลลัพธ์เชิงปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งบ่งชี้ว่าทั้งสองชนิดของตัวทำละลายสามารถใช้แทนกันได้ในการศึกษาสารภายใต้เงื่อนไขการทดลองนี้ อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมอาจพิจารณาปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น ความสะดวกในการใช้งาน ต้นทุน ราคา และความปลอดภัยของสารเคมี

Table 8. Comparison of peak areas extracted using 90% methanol and 90% acetonitrile

No	Peak Area	
	extracted using 90% methanol	extracted using 90% acetonitrile
1	2381	2838
2	2633	2507
3	2647	2815
4	2541	2504
5	2733	2868
6	2923	2793
Average	2643.00	2720.83
SD	182.02	168.64
%RSD	6.89	6.20

5.6 ผลการศึกษาผลการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ standard solution calibration curve และ matrix matching calibration curve ตาม Table 9 พบว่า ทั้งในกรณีของ homogeneity และ drug carryover ต่างให้ค่า r อยู่ในระดับที่มากกว่า 0.995 แสดงถึงความเป็นเชิงเส้นที่ดีของทั้งสองวิธี อย่างไรก็ตาม ค่า slope ของ standard solution calibration curve มีค่ามากกว่าของ matrix matching calibration curve อย่างต่อเนื่อง ซึ่งบ่งชี้ถึงผลของ matrix ที่ทำให้เกิด signal suppression โดยมีค่า matrix effect อยู่ระหว่าง 74.02–77.25% ทั้งนี้ค่า intercept ของ matrix matching calibration curve มีความแตกต่างบางส่วน โดยเฉพาะ drug carryover ที่ให้ค่า intercept สูงกว่าเมื่อเทียบกับ standard solution calibration curve การทดสอบดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าแม้ standard solution calibration curve จะให้ค่า slope สูง แต่การใช้ matrix matching calibration curve อาจสะท้อนสภาพจริงของตัวอย่างได้แม่นยำมากกว่า เนื่องจากคำนึงถึงผลกระทบของ matrix ที่เกิดขึ้นจริงในระบบการทดสอบ

Table 9. Calibration curve parameters and matrix effect for homogeneity and drug carryover

Item	Slope		Intercept		r		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	
Homogeneity	13014.3	9633.186	1139.582	915.4661	0.9974	0.9962	74.02
Drug carryover	12367.55	9554.533	1007.345	2402.146	0.9983	0.9990	77.25

5.7 ผลการศึกษาระยะเวลาการสกัด โดยแปรระดับระยะเวลาการสกัดเป็น 15, 30 และ 60 นาที การประเมิน homogeneity ตาม Table 10 พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบในช่วงเวลา 15, 30 และ 60 นาที มีค่าเฉลี่ยค่อนข้างคงที่ โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 23,710.67–22,444.33 ทั้งนี้แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตามเวลา แต่แนวโน้มของค่า SD และ %RSD กลับลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยค่า %RSD จาก 7.12% ที่ 15 นาที ลดลงเหลือเพียง 4.49% ที่ 60 นาที ในทางกลับกัน การประเมิน drug carryover ตาม Table 11 พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามเวลา โดยที่ 15 นาทีมีค่าเฉลี่ยเพียง 10,227.50 แต่เพิ่มขึ้นจนถึง 20,921.00 ที่ 60 นาที การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นดังกล่าวสะท้อนถึงการสะสมหรือคงค้างของสารที่เกิดขึ้นระหว่างการทดสอบ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบยังแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของข้อมูลเพิ่มขึ้นตามเวลาเช่นกัน โดยค่า %RSD ที่ 15 และ 30 นาที มีค่า 9.58% และ 6.48% แต่ที่ 60 นาทีเพิ่มสูงถึง 32.22% ซึ่งเป็นระดับที่สูงที่ ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าการทดสอบ drug carryover มีความน่าเชื่อถือน้อยลงในระยะเวลานานเกินไป และควรให้ความสำคัญกับการประเมินผลในระยะเวลานั้นถึงปานกลาง เพื่อหลีกเลี่ยงความคลาดเคลื่อนและรักษาความถูกต้องของการทดสอบ

Table 10. Comparison homogeneity of peak areas at different extraction times (15, 30, and 60 min)

No.	Peak Area		
	Extraction Time	Extraction Time	Extraction Time
	15 min	30 min	60 min
1	25355	20508	22743
2	24193	19453	23356
3	25768	21493	23497
4	21456	20071	20746
5	23007	20563	22112
6	22485	19834	22212
Average	23710.67	20320.33	22444.33
SD	1688.20	709.96	1007.69
%RSD	7.12	3.49	4.49

Table 11. Comparison drug carryover of peak areas at different extraction times (15, 30, and 60 min)

No.	Peak Area		
	Extraction Time	Extraction Time	Extraction Time
	15 min	30 min	60 min
1	8661	12017	12738
2	9912	12102	11895
3	10124	12046	23665
4	11495	12928	25989
5	11018	13363	24774
6	10155	13993	26465
Average	10227.50	12741.50	20921.00
SD	979.89	825.21	6741.30
%RSD	9.58	6.48	32.22

6. สรุปผลการทดลอง

การทดสอบนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบ tilmicosin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยใช้เทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อทดสอบ homogeneity และ drug carryover ผลการศึกษาพบว่า mobile phase ที่เหมาะสมที่สุดคือ 20% acetonitrile ซึ่งให้ค่า retention time และ theoretical plates ที่สมดุล ขณะที่การละลายสารมาตรฐานด้วย 40% methanol ให้ความไวและประสิทธิภาพสูงสุด การสกัดด้วย 90% methanol และ 90% acetonitrile ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) จึงสามารถใช้แทนกันได้ นอกจากนี้การใช้ matrix-fortified calibration curve ให้ความแม่นยำมากกว่าการใช้ standard solution calibration curve เนื่องจากลดผลของ matrix effect การศึกษาระยะเวลาการสกัดแสดงให้เห็นว่าช่วง 30 นาที เหมาะสมที่สุด เนื่องจากลดค่าความแปรปรวนได้ โดยสรุปวิธีการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ทดสอบ homogeneity และ drug carryover ของ tilmicosin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาได้

7. ข้อเสนอแนะ

- 7.1 ควรใช้ 20% acetonitrile ใน mobile phase และ 40% methanol เป็น solvent ละลายสารมาตรฐาน เพื่อให้ได้ peak ที่ชัดเจนและเสถียร
- 7.2 การสกัดตัวอย่างสามารถเลือกใช้ทั้ง 90% methanol หรือ 90% acetonitrile ได้ โดยพิจารณาจากต้นทุน ความสะดวก และความปลอดภัย
- 7.3 เพื่อความแม่นยำ ควรใช้ matrix-fortified calibration curve แทน standard solution calibration curve เพื่อลดผลของ matrix effect
- 7.4 ระยะเวลากการสกัดควรเลือกในช่วง 30 นาที เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่เสถียรและลดความแปรปรวน

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2568 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

- Robin S. Readhour, Susan L. Helton-Groce, and Sharon S. Dixon., 1997. Determination of Tilmicosin in Swine Feeds by Liquid Chromatography. Journal of AOAC International Vol. 80, No. 6
- Marta P., P. Jedziniak., J. Zmudzki. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography - tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 2015.
- Artun Y., A. OZCAN., M. Yilmaz KARACA., Determination of Erythromycin, Spiramycin, Tilmicosin and Tylosin in Animal Feedingstuffs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, 2013.
- Kaklamanos G., U. Vincent., C. von Holst., Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to Orbitrap Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A. (2023) p 1-46