

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเมลามีนและอนุพันธ์ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

ศิริวัฒน์ รายนะสุข วรัญญา แก้วทิพย์ เอกษา ตนานนท์ชัย สุนีย์ คณาพิพัฒน์
จิตติมา ณรงค์รักษ์ รังสรรค์ เข้มสุวรรณ

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเมลามีนและอนุพันธ์ในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ประกอบด้วยสารเมลามีน ไซโรมาซีน และแอมเมลิโน ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM Guide 2025 การเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ แล้วทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS ด้วยสถานะของแมสสเปคโตรเมทรีแบบ ESI positive mode โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตทในน้ำปราศจากไอออนและอะซิโตรไนไตรล์เป็นสารละลายเฟสเคลื่อนที่และใช้คอลัมน์ชนิด HILIC ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเมลามีน ไซโรมาซีน และแอมเมลิโน พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.75 - 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) ของสารเมลามีน ไซโรมาซีน และแอมเมลิโน เท่ากับ 0.9968, 0.9974 และ 0.9963 ตามลำดับ มีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณเป็น 0.50 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีความแม่นยำจากค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 82.22 - 102.96 มีความเที่ยงของการทวนซ้ำโดยพิจารณาจากค่า %RSD_r เฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.34 - 9.07 และและการทำซ้ำมีค่า %RSD_R เฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.23 - 9.10 จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้น วิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสารเมลามีนและอนุพันธ์ในอาหารสัตว์ที่ระดับความเข้มข้น 0.75 - 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

คำสำคัญ : สารเมลามีน ไซโรมาซีน และแอมเมลิโน, การตรวจสอบความใช้ได้, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for determination of melamine and analogues in animal feed by LC-MS/MS

Siriwat Rainasuk Warunya Kaewthip Aekkacha tananonchai Sunee Kanapipat
Thitima Narongruk Rangsak Khemsuwan

Abstract

This study developed and validated an in-house LC–MS/MS method for the determination of melamine and analogues included melamine, cyromazine and ammeline in animal feed in accordance with EURACHEM guide 2025. The sample was extracted with ammonium hydroxide analyzed by LC–MS/MS with detection employed electrospray ionization in positive-ion mode. The analysis was carried out using the mobile phase of 10mM ammonium acetate in deionized water and acetonitrile on a HILIC column. The results of method validation of melamine, cyromazine and ammeline found that the calibration curve at the level of 0.75 - 2.00 mg/kg were good and linear; the correlation of determination (r^2) of melamine, cyromazine and ammeline were 0.9968, 0.9974 and 0.9963 respectively. The limits of detection and quantitation were 0.50 and 0.75 mg/kg, respectively. The mean recovery accuracies ranged from 82.22 - 102.96%, repeatability precision (RSD_r) ranged from 1.34 - 9.07% and intermediate precision (RSD_R) ranged from 4.23 - 9.10%. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of melamine and analogues in animal feed at the level of 0.75 - 2.00 mg/kg.

Keywords : Melamine, cyromazine and ammeline, method validation, animal feed

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

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเมลามีนและอนุพันธ์ในอาหารสัตว์ โดย เทคนิค LC-MS/MS

ศิริวัฒน์ รายนะสุข วรัญญา แก้วทิพย์ เอกชา ตนานนท์ชัย สุนีย์ คณาพิพัฒน์
จิตติมา ณรงค์รักษ์ รังสรรค์ เข้มสุวรรณ

บทนำ

สารเมลามีนมีสูตรทางเคมี $C_3H_6N_6$ จัดเป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสูงถึงร้อยละ 66 มีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ายนมผงสามารถละลายน้ำได้ หรือการผสมในนมจะทำให้ตรวจพบปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าปกติ สารเมลามีนเป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกหรือใช้ทำแก้ว แต่เมลามีนไม่ได้เป็นวัตถุอันตรายสำหรับการผลิตอาหาร เนื่องจากสารเมลามีนนี้มีคุณสมบัติทนความร้อน จึงนิยมใช้ทำผลิตภัณฑ์พลาสติก และผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ถังพลาสติก น้ำยาดับเพลิง น้ำยาทำความสะอาด แก้ว และหมึกสีเหลือง เป็นต้น รวมถึงพบในยาฆ่าแมลงด้วย เมื่อสารเมลามีนเข้าสู่ร่างกายจะเข้าไปสะสมจนกลายเป็นนิ่วในไต ก่อให้เกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะ ทำลายระบบสืบพันธุ์ และทำให้ไตวายได้อย่างเฉียบพลัน จากการศึกษาพบว่า สารเมลามีน กรดไซยานูริก แอมมีไลต์ และแอมมีลีนเพียงชนิดเดียวไม่ทำให้เกิดความผิดปกติใดๆ ในขณะที่สารผสมระหว่างเมลามีนและกรดไซยานูริก (cyanuric acid) สามารถทำให้เกิดนิ่วอุดตันในระบบทางเดินปัสสาวะ (สุธน, 2551) จากปัญหาดังกล่าวที่เกิดขึ้นจากการตกค้างของสารเมลามีน จึงต้องมีการเฝ้าระวังการตกค้างของสารเมลามีนในอาหารและอาหารสัตว์ โดยสหภาพยุโรปได้กำหนดปริมาณเมลามีนอนุญาตปริมาณสูงสุดให้ใช้ในอาหารสัตว์ที่ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (EU, 2013)

ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ผู้ผลิตมีความจำเป็นต้องผสมสารเสริมโปรตีนเพื่อให้ผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์นั้นมีปริมาณโปรตีนเพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ ซึ่งปกติสารอาหารกลุ่มโปรตีนจะมีธาตุไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบมากกว่าสารอาหารกลุ่มอื่น ดังนั้น จึงใช้ปริมาณธาตุไนโตรเจนเป็นตัวชี้วัดของปริมาณโปรตีนในอาหาร ถ้าหากบริษัทผู้ผลิตอาหารต้องการลดต้นทุนการผลิตและเอาเปรียบผู้บริโภค อาจจะไม่ผสมสารเมลามีนในอาหารสัตว์ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่ามาตรฐาน เพื่อเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจนซึ่งสารเมลามีนมีปริมาณธาตุไนโตรเจนสูงกว่าที่พบในสารอาหารโปรตีนอื่นถึง 4 เท่า มีราคาถูกกว่าวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนจริงๆ ซึ่งสารเมลามีนไม่ใช่แหล่งโปรตีนที่สัตว์สามารถนำไปใช้ได้ และเมื่อสารเมลามีนปนเปื้อนในการผลิตอาหารสัตว์จะทำให้เกิดอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงอีกด้วย สารเมลามีนที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์หรือปุ๋ยบำรุงพืช จากนั้นก็จะส่งต่อเข้ามายังสัตว์ที่บริโภคอาหารหรือพืชอาหารสัตว์นั้นๆ ดังนั้นนอกจากผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมแล้ว ไข่ไก่ เนื้อสัตว์และพืชผักก็สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเมลามีนได้เช่นกัน

ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเมลามินและอนุพันธ์ในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ โดยดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM Guide, 2025 เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบดังกล่าว มีความแม่นยำ น่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์การใช้งานที่กำหนดไว้

1. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเมลามินและอนุพันธ์ในอาหารสัตว์ ทำให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารเมลามินและอนุพันธ์ในอาหารสัตว์ในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ประกอบด้วยสารเมลามิน ไซโรมาซิน และแอมเมลิน

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 ได้วิธีทดสอบสารเมลามินและอนุพันธ์ในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS
- 3.2 ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2017
- 3.3. ใช้ในการเฝ้าระวังการใช้สารต้องห้ามในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์

4.วิธีดำเนินการ

ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.1 การทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารเมลามิน ไซโรมาซิน และแอมเมลิน ที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4.1.2 เตรียม spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานของเมลามิน ไซโรมาซิน และแอมเมลิน จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4.1.3 เปรียบเทียบค่า response ของสารละลายมาตรฐาน (standard solution) กับสารละลายมาตรฐานในอาหารสัตว์ (matrix standard solution) จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น และประเมิน %matrix effect (ME) เกณฑ์การยอมรับต้องไม่เกิน $\pm 20\%$ (SANTE/11312/2021v2)

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

โดยที่ R = detector response

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

4.2.1 ทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามิน ไซโรมาซิน และแอมเมลิโน จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.2.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามิน ไซโรมาซิน และแอมเมลิโน และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า correlation of determination (r^2) ต้องไม่น้อยกว่า 0.995 (U.S. FDA, 2023)

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

4.3.1 ทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามิน ไซโรมาซิน และแอมเมลิโน ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่ทดสอบได้หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แล้วคำนวณหาค่า 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 spiked matrix sample ที่เติมสารลิโคมัยซินให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารที่คำนวณได้จากข้อ 4.3.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 และ Ion ratio ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด (EU, 2021) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามิน ไซโรมาซิน และแอมเมลิโน ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารที่คำนวณได้จากข้อ 4.3.1 จำนวน

10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่ทดสอบได้มาประเมินความแม่นยำและความเที่ยงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับหรือไม่ (AOAC, 2023) หากไม่เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.4 การทดสอบหาความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.4.1 การทดสอบหาค่าความแม่นยำและการทดสอบหาค่าความเที่ยงแบบการทวนซ้ำของการวัด (repeatability)

โดยทดสอบตัวอย่าง spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามิน ไฮโดรมาซีน และแอมเมลิโน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.75 (LOQ), 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการสกัดและทดสอบวันเดียวกัน ประเมินความแม่นยำโดยพิจารณาจากค่า %recovery โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2023) และความเที่ยงพิจารณาจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD_r) ของแต่ละระดับความเข้มข้นต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r)

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

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.4.2 การทดสอบหาค่าความแม่นยำและการทดสอบหาค่าความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility)

โดยเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อที่ 4.4.1 อีกจำนวน 1 ชุด แต่ทำการสกัดและทดสอบต่างวันกัน ประเมินความเที่ยงและแม่นยำของตัวอย่างทั้ง 2 ชุด ประเมินความแม่นยำโดยพิจารณาจากค่า %recovery โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2023) และความเที่ยงพิจารณาจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD_R) ของความเข้มข้นสารที่ทดสอบได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_R)

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

เมื่อ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.5 การทดสอบ selectivity และ specificity

4.5.1 เตรียมตัวอย่าง sample blank จำนวน 3 ซ้ำ

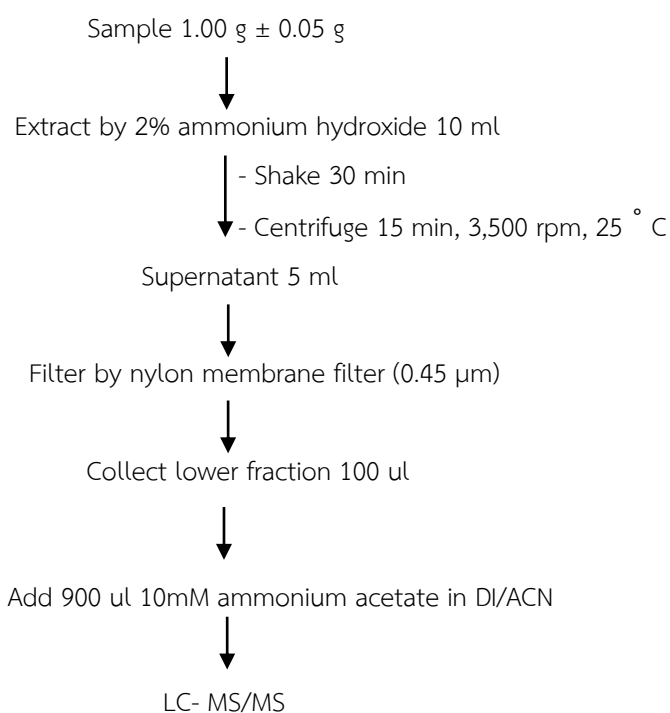
4.5.2 เตรียมตัวอย่าง spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารเมลามิน ไฮโดรมาซีน และแอมเมลิโน ที่ระดับความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

4.5.3 นำตัวอย่างข้อ (4.5.1 - 4.5.2) ทำการทดสอบด้วยวิธีทดสอบสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

4.5.4 เปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank (ข้อ 4.5.1) และ spiked matrix sample (ข้อ 4.5.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิน ว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใน matrix ของ sample blank

แผนผังขั้นตอนการทดสอบสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค

LC-MS/MS



5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

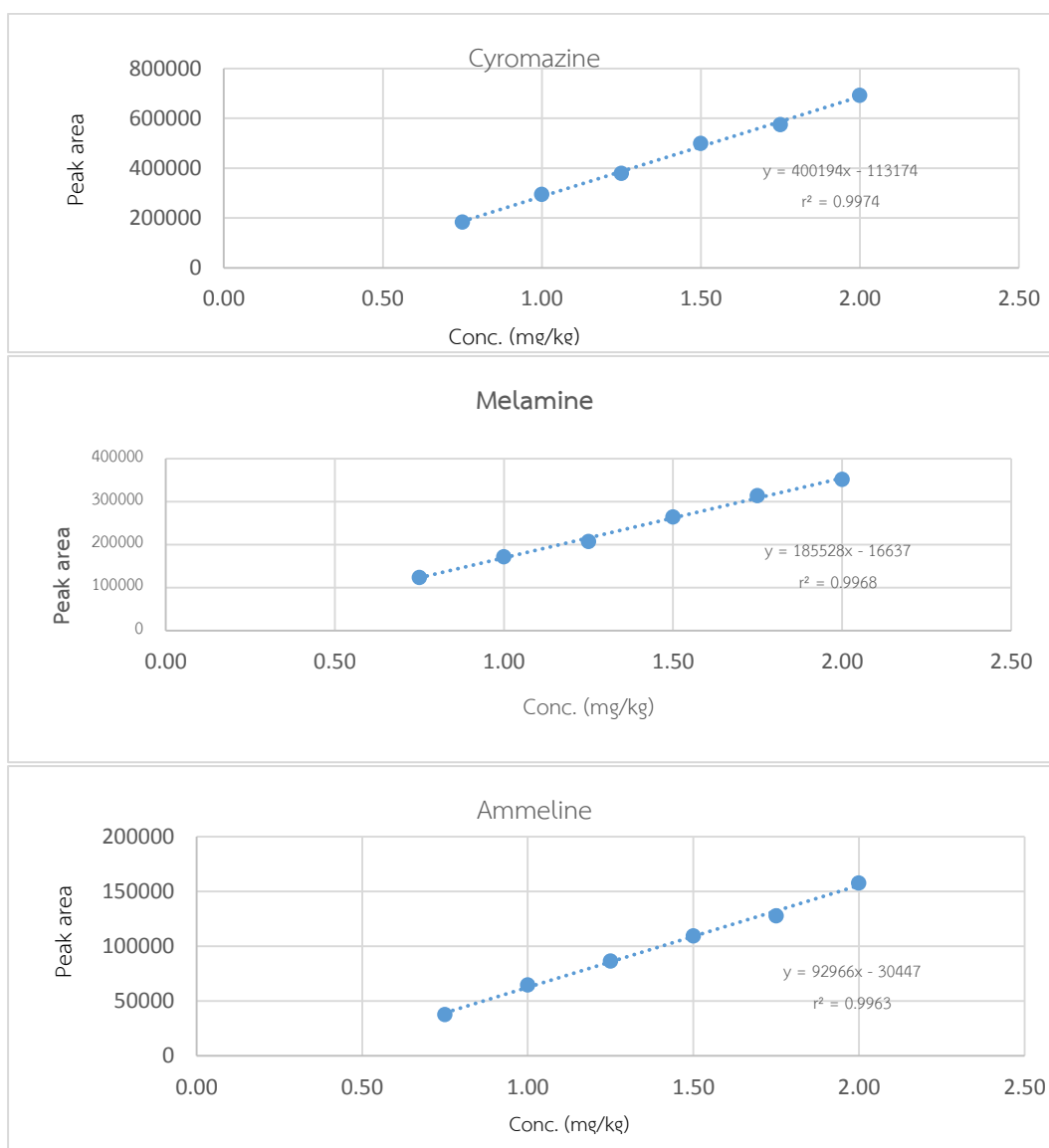
จากผลการทดสอบหาผลกระทบจากเมทริกซ์ของ standard solution เทียบกับ matrix standard solution จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น พบว่า %ME ของสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิน ดังตารางที่ 1 มีค่ามากกว่า ±20% ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (SANTE/11312/2021 V2) แสดงว่าเมทริกซ์มีผลกระทบกับสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิน ซึ่งอาจมาจากการชะร่วมนกันของสารอื่นที่อยู่ในเมทริกซ์ และบางครั้งไม่สามารถกำจัดผลกระทบจากเมทริกซ์ออกไปได้ทั้งหมด จึงเห็นควรใช้ matrix standard calibration curve ในการทดสอบสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลินในอาหารสัตว์

ตารางที่ 1 %matrix effect ของสารเมลามีน ไไซโรมาซีน และแอมเมลิน

ความเข้มข้น (mg/kg)	Peak area of melamine			Peak area of cyromazine			Peak area of ammeline		
	Standard solution	Matrix standard solution	%ME	Standard solution	Matrix standard solution	%ME	Standard solution	Matrix standard solution	%ME
0.75	7550774	105737	-98.60	16686038	139165	-99.17	4898639	85077	-98.26
1.00	13797692	140818	-98.98	20600219	177261	-99.14	6900598	108750	-98.42
1.25	18404664	175166	-99.05	23759896	243894	-98.97	8620250	139473	-98.38
1.50	24635720	218694	-99.11	28378663	308797	-98.91	11589802	162260	-98.60
1.75	31632802	249923	-99.21	32983248	358905	-98.91	13559394	189289	-98.60
2.00	38194209	299178	-99.22	36848196	412770	-98.88	15737818	214955	-98.63

5.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (working range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามีน ไไซโรมาซีน และแอมเมลินในช่วงความเข้มข้น 0.75 - 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ spiked matrix sample และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารเมลามีน ไไซโรมาซีน และแอมเมลิน เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation of determination ; r^2) พบว่า มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่า ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.75 - 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี เหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของสารเมลามีน ไซโรมาซีน และแอมเมลีนในช่วงความเข้มข้น 0.75 - 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

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

5.3.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารเมลามีน ไซโรมาซีน และแอมเมลีน โดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก $LOD = 3S'_0$ และ $LOQ = 10S'_0$ พบว่า มีค่าดังตารางที่ 2

5.3.2 ผลการยืนยันค่า LOD ของสารเมลามีน ไซโรมาซีน และแอมเมลีนที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่าร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (EU, 2021) จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน พบว่า $S/N \geq 3$ และมี

ค่าร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (EU, 2021) ดังนั้นค่า LOD ของสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิเน มีค่าเท่ากับ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

5.3.3 ผลการยืนยันค่า LOQ ของสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิเน ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่า %recovery ไม่อยู่ในช่วง 80 - 110% และ %RSD ไม่เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2023) จึงทำการปรับค่า LOQ ที่ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่า %mean recovery อยู่ในช่วง 80 - 110% และ %RSD เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่ 11 (AOAC, 2023) ดังนั้นค่า LOQ ของสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิเน มีค่าเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า LOD และ LOQ ของสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิเน

Compounds	Spiked sample 1.00 mg/kg (n=10)			LOD		LOQ (0.75 mg/kg, n=10)	
	S_0	LOD ($3S_0$)	LOQ ($10 S_0$)	(0.50 mg/kg, n=10)		%mean recovery	% RSD
				S/N	%IR		
Melamine	0.032	0.095	0.315	28.53	53.91	99.87	2.13
Cyromazine	0.067	0.200	0.667	27.91	57.33	100.47	2.68
Ammeline	0.217	0.652	2.173	20.36	42.65	94.77	5.10

5.4 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ

5.4.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิเน 3 ระดับ คือ 0.75 (LOQ), 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลิเนอยู่ในช่วงตามเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2023) แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีทดสอบ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2023)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ (%Recovery)		
		Melamine	Cyromazine	Ammeline
0.75	80 - 110	100.57	101.93	102.60
1.50	80 - 110	99.03	90.67	102.96
2.00	80 - 110	94.55	82.22	94.30

5.4.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามีน ไฮโรมาซีน และแอมเมลิ้น 3 ระดับ คือ 0.75 (LOQ), 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่า %RSD_r อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณได้จากสมการ Horwitz (%PRSD_r) ดังตารางที่ 4 และจากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของ (Repeatability; %RSD _r , n=10)		
		Melamine	Cyromazine	Ammeline
0.75	11.02	3.37	4.69	3.33
1.50	9.93	3.19	1.80	5.89
2.00	9.51	5.46	1.34	9.07

5.4.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารเมลามีน ไฮโรมาซีน และแอมเมลิ้น 3 ระดับ คือ 0.75 (LOQ), 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่า RSD_R อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณได้จากสมการ Horwitz (%PRSD_R) ดังตารางที่ 5 และจากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (precision) แบบการทำซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _R	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของ (with-in laboratory reproducibility; %RSD _R , n=20)		
		Melamine	Cyromazine	Ammeline
0.75	16.70	7.40	4.23	4.98
1.50	15.05	6.83	6.97	4.78
2.00	14.41	6.33	9.10	7.26

5.5 ผลการทดสอบ selectivity และ specificity

5.5.1 จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank กับสัญญาณของ spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารเมลามีน ไฮโรมาซีน และแอมเมลิ้น พบว่า ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน matrix ของ sample ที่มีพีคตรงกับสารเมลามีน ไฮโรมาซีนและแอมเมลิ้น

ที่ตำแหน่ง RT ในช่วง ± 0.1 นาที เป็นไปตามเกณฑ์ของ SANTE/11312/2021 V2 จากการทดสอบ selectivity และ specificity แสดงว่า วิธีการทดสอบมีความไวและความจำเพาะต่อสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลินที่มีสารรบกวนได้ดี

6. สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ แสดงให้เห็นว่า วิธีทดสอบเหมาะสมสำหรับการทดสอบสารเมลามีน ไโซโรมาซีน และแอมเมลินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบอ้างอิงตามแนวทางของ EURACHEM Guide, 2025 เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน มีความเที่ยงและความแม่นยำในเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (2023) โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.50 mg/kg, LOQ เท่ากับ 0.75 mg/kg และช่วงของการทดสอบที่ 0.75 – 2.00 mg/kg ในอาหารสัตว์

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (proficiency test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบมีความแม่นยำและเที่ยงยิ่งขึ้น และควรให้ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารอนุพันธ์ของสารเมลามีนตัวอื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการใช้สารต้องห้ามในสินค้าอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณนายอุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษาค้นคว้าสำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

จุฑาทิพย์ ลาภวิบูลย์สุข และสมภพ ลาภวิบูลย์สุข. 2558. การหาปริมาณสารเมลามีนในวัสดุสัมผัสอาหารโดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟี. Bulletin of applied sciences vol. 4. No.4.: 53-59.

สุธน เสถียรยานนท์. 2551. เมลามีน. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ ปีที่8(2)*. 57-64.

AOAC Official Methods of Analysis. 2023. Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F: 1-18.

- Benvenuti, ME. and O'Connor, A. 2007. Melamine, ammeline and cyanuric acid analysis by UPLC/MS/MS and UPLC/PDA. Water Corporation, Milford, MA, U.S.
- EURACHEM Guide. 2025. The Fitness for Purpose of Analytical Method A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 3rd edition.
- European Commission Directorate General for Health and Food Safety. 2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11312/2021v2. Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 01/01/2024.
- 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. 2013. Commission Regulation (EU) No 107/2013 of 5 February 2013 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for melamine in canned pet food. L35/1-2
- Sniegocki, T., Sell, B., Posyniak, A., and Zmudzki, J. 2010. Determination of melamine in feed by high performance liquid chromatography coupled mass spectrometry. *Bull Vet Inst Pulawy* 54. 543-547.
- U.S. Food and Drug Administration (2023) Methods, method verification and validation, laboratory manual, ORA laboratory procedure, volume II, ORA-LAB.5.4.5.