

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารลิวโคมัยซินในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

วรัญญา แก้วทิพย์ ศิริวัฒน์ رایณะสุข เอกชา ตนานนท์ชัย สุนีย์ คณาพิพัฒน์
พรเพ็ญ เจียมประสูตร นารีนารถ เฒ่าอุดม

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารลิวโคมัยซินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM Guide 2025 การเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายผสม เฮกเซนและเอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 3 : 1 และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต แล้วทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS ด้วยสถานะของแมสสเปคโตรเมทรีแบบ ESI positive mode โดยใช้สารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของกรดฟอร์มิกในน้ำปราศจากไอออนและอะซิโตรไนโตรลเป็นสารละลายเฟสเคลื่อนที่และใช้คอลัมน์ชนิด C18 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารลิวโคมัยซิน พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.05-1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) ของสารลิวโคมัยซินเท่ากับ 0.9989 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เท่ากับ 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารลิวโคมัยซินที่ระดับ 0.05, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 76.60, 106.72 และ 104.48 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารลิวโคมัยซินที่ระดับ 0.05, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 4.45, 2.62 และ 3.38 ตามลำดับ และทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของสารลิวโคมัยซินที่ระดับ 0.05, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 5.33, 6.53 และ 5.16 ตามลำดับ จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้น วิธีทดสอบนี้ จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสารลิวโคมัยซินในอาหารสัตว์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05-1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

คำสำคัญ : สารลิวโคมัยซิน, การตรวจสอบความใช้ได้, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Warunya Kaewthip Siriwat Rainasuk Aekkacha tananonchai Sunee Kanapipat
Ponpen jiamprasoot Nareenart Thoaudom

Abstract

This study developed and validated an in-house LC-MS/MS method for the determination of leucomycin in animal feed in accordance with EURACHEM guide 2025. The sample was extracted with the mixture of hexane and ethyl acetate in a 3 : 1 ratio and mixed with the solution of sodium carbonate, analyzed by LC-MS/MS with detection employed electrospray ionization in positive-ion mode. The analysis was carried out using the mobile phase of 0.1% formic acid in deionized water and acetonitrile on a C18 column. The results of method validation of leucomycin found that the calibration curve at the level of 0.05-1.00 mg/kg was good and linear; the correlation of determination (r^2) of leucomycin was 0.9989. The limits of detection and quantitation were 0.02 and 0.05 mg/kg, respectively. The mean %recovery of leucomycin at the level of 0.05, 0.50 and 1.00 mg/kg were 76.60%, 106.72% and 104.48%, respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level of 0.05, 0.50 and 1.00 mg/kg of leucomycin were 4.45%, 2.62% and 3.38%, respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility at the level of 0.05, 0.50 and 1.00 mg/kg of leucomycin were 5.33%, 6.53% and 5.16%, respectively. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of leucomycin in animal feed at the level of 0.05-1.00 mg/kg range.

Keywords : Leucomycin, method validation, animal feed

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

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารลิโคมัยซินในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

วรัญญา แก้วทิพย์ ศิริวัฒน์ รายนะสุข เอกชา ตนานนท์ชัย สุนีย์ คณาพิพัฒน์
พรเพ็ญ เจียมประสูตร์ นารีนารถ เฒ่าอุดม

บทนำ

ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จึงถูกนำมาใช้ทั้งเพื่อการควบคุมโรคและการป้องกันโรคในการเลี้ยงสัตว์ (วรรณพร, 2557) ในระบบการเลี้ยงสัตว์แบบอุตสาหกรรมซึ่งมีความหนาแน่นของสัตว์สูงและพื้นที่จำกัด ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงมีการเติมยาปฏิชีวนะลงในอาหารสัตว์เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรค และเพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ (ชัยวัฒน์ และ วรรณพร, 2557) อย่างไรก็ตาม การใช้ยาไม่ถูกต้องหรือไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิดเชื้อดื้อยาในสัตว์และถ่ายทอดผลกระทบสู่สาธารณสุขมนุษย์ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการตกค้างของยาในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ซึ่งสัมพันธ์กับอาการไม่พึงประสงค์ เช่น อาการทางระบบทางเดินอาหาร การระคายเคืองเฉพาะที่ อาการแพ้ และความเป็นพิษต่ออวัยวะ ตลอดจนการปนเปื้อนของยาสู่สิ่งแวดล้อม (ใจพร, 2555)

สารลิโคมัยซิน (leucomycin) หรือคิทาซามัยซิน (kitasamycin) จัดเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มแมโครไลด์ชนิดวง 16 อะตอม (16-membered macrolides) ที่ผลิตได้จาก *Streptomyces kitasatoensis* โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อบางชนิดในกลุ่มแกรมลบ ไมโคพลาสมา เลปโตสไปรา และริกเก็ตเซีย (Liu *et al.*, 2021) ด้วยคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดี การดูดซึมที่รวดเร็ว มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ทางปากสูง (high oral bioavailability) โดยยาที่เมื่อรับประทานเข้าสู่ร่างกายแล้ว ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ในปริมาณมาก คิดเป็นสัดส่วนที่สูงเมื่อเทียบกับยาที่ได้รับในรูปแบบฉีดเข้าเส้นเลือด ส่งผลให้มียาส่วนใหญ่ในรูปแบบที่ออกฤทธิ์ไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ โดยมีผลกระทบจากกระบวนการเมแทบอลิซึมในตับ (first-pass effect) น้อย จึงทำให้ยากกลุ่มแมโครไลด์ถูกใช้อย่างแพร่หลายทั้งในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย และใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารสัตว์ (feed additive) เพื่อป้องกันโรค อย่างไรก็ตามการใช้ยาอย่างต่อเนื่องนำไปสู่การตกค้างในสัตว์ที่เป็นอาหารแก่ผู้บริโภค การสะสมของยาในเนื้อเยื่อสัตว์จึงอาจจะเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ในระบบห่วงโซ่อาหาร โดยพบอาการข้างเคียงได้ตั้งแต่ความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร การระคายเคืองเฉพาะที่ อาการแพ้ ไปจนถึงความเป็นพิษต่อตับ (Song *et al.*, 2016)

ในหลายประเทศจึงมีการกำกับดูแลและควบคุมสารตกค้างของสารกลุ่มแมโครไลด์ โดย Codex และสหภาพยุโรปได้กำหนดค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด (MRLs) ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์หลายชนิดสำหรับสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ erythromycin, spiramycin, tilmicosin และ tylosin เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานหรือค่า MRLs สำหรับสารลิโคมัยซินในผลิตภัณฑ์จากสัตว์และอาหารสัตว์ แต่เพื่อเป็นการยกระดับการคุ้มครองผู้บริโภคเชิงป้องกัน ตั้งแต่ต้นน้ำของห่วงโซ่อาหาร กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ เล็งเห็นถึงความสำคัญที่ต้องเตรียมการรองรับการให้บริการทดสอบสารลิโคมัยซินในอาหารสัตว์ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการขยายปฏิกิริยาในระบบผลิตสินค้าปศุสัตว์ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารลิโคมัยซินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ โดยดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM Guide, 2025 เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบดังกล่าว มีความแม่นยำ น่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์การใช้งานที่กำหนดไว้

1. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารลิโคมัยซินในอาหารสัตว์ ทำให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารลิโคมัยซินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีทดสอบสารลิโคมัยซินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

3.2 ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2017

3.3 ใช้ในการเฝ้าระวังการขยายปฏิกิริยาในการผลิตสินค้าปศุสัตว์

4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.1 การทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารลิโคมัยซินที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4.1.2 เตรียม spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานของลิวโคมัยซิน จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS

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

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

โดยที่ R = detector response

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

4.2.1 ทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารลิวโคมัยซิน จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.2.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ spiked matrix sample ที่เติมสารลิวโคมัยซินและพื้นที่ใต้พีค (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 ที่เติมสารลิวโคมัยซินที่ความเข้มข้น 0.03 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 ที่เติมสารลิวโคมัยซินให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารที่คำนวณได้จากข้อ 4.3.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่า

ค่า 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 ที่เติมสารลิโคมัยซินที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า 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 ที่เติมสารลิโคมัยซิน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 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 ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารลิโคมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

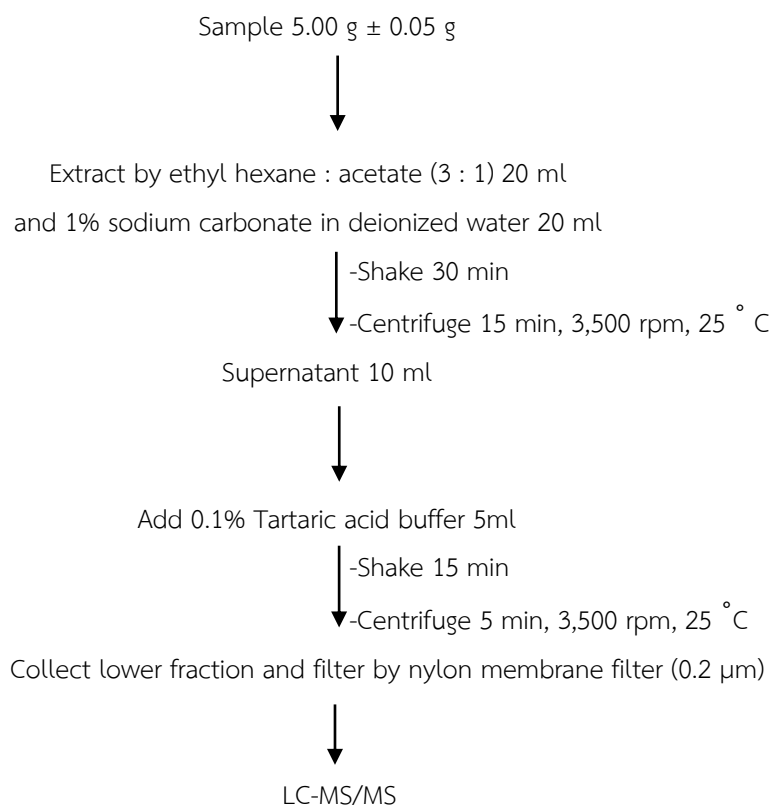
4.5.3 เตรียมตัวอย่าง spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารลิวโคมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเติมสารละลายมาตรฐานสารสไปราไมซินซึ่งสงสัยว่าจะรบกวนการทดสอบ ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

4.5.4 นำตัวอย่างข้อ (4.5.1-4.5.3) ทำการทดสอบด้วยวิธีทดสอบสารลิวโคมัยซินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

4.5.5 เปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank (ข้อ 4.5.1) และ spiked matrix sample (ข้อ 4.5.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารลิวโคมัยซินว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใน matrix ของ sample blank

4.5.6 เปรียบเทียบผลการทดสอบ spiked matrix sample (ข้อ 4.5.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารลิวโคมัยซินกับ spike matrix sample (ข้อ 4.5.3) ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารลิวโคมัยซินและเติมสารละลายมาตรฐานสารสไปราไมซินว่าพบ peak ของสารสไปราไมซินที่ตำแหน่ง retention time (RT) เดียวกันกับสารลิวโคมัยซิน หรือมี peak ของสารสไปราไมซินรบกวน peak ของสารลิวโคมัยซินหรือไม่

แผนผังขั้นตอนการทดสอบสารลิวโคมัยซินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS



5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

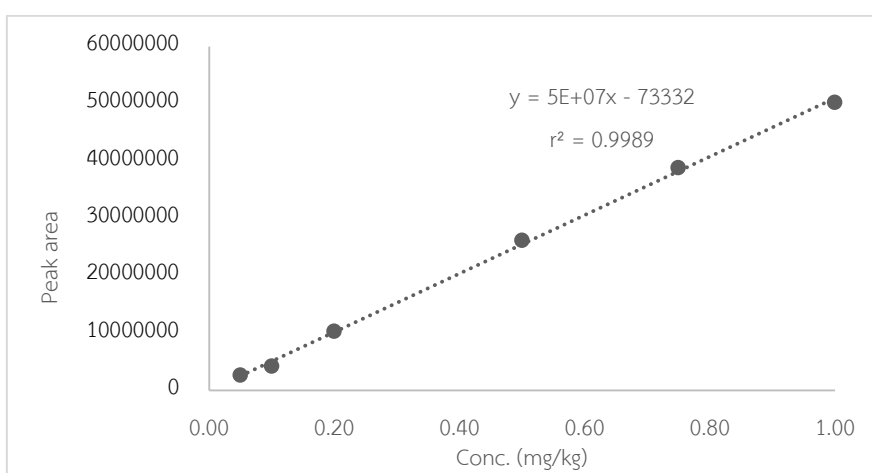
จากผลการทดสอบหาผลกระทบจากเมทริกซ์ของ standard solution เทียบกับ matrix standard solution จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น พบว่า %ME ของสารลิวโคมัยซิน ดังตารางที่ 1 มีค่ามากกว่า $\pm 20\%$ ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (SANTE/11312/2021 V2) แสดงว่าเมทริกซ์มีผลกระทบกับสารลิวโคมัยซิน ซึ่งอาจมาจากการชะร่วกันของสารอื่นที่อยู่ในเมทริกซ์ และบางครั้งไม่สามารถกำจัดผลกระทบจากเมทริกซ์ออกไปได้ทั้งหมด จึงเห็นควรใช้ matrix standard calibration curve ในการทดสอบสารลิวโคมัยซินในอาหารสัตว์

ตารางที่ 1 %matrix effect ของสารลิวโคมัยซิน

ความเข้มข้น (mg/kg)	Peak area		
	Standard solution	Matrix standard solution	%ME
0.05	1742840	162475	-90.68
0.10	2664734	298803	-88.79
0.25	5306714	1021962	-80.74
0.50	10332435	2316649	-77.58
0.75	14877228	3242243	-78.21
1.00	20312642	4410653	-78.29

5.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (working range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารลิวโคมัยซินในช่วงความเข้มข้น 0.05-1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ spiked matrix sample และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารลิวโคมัยซิน เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation of determination ; r^2) พบว่า มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่า ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.05-1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี เหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของสารลิวโคมัยซินในช่วงความเข้มข้นที่ 0.05-1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

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

5.3.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารลิวโคมัยซิน โดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.03 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 ของสารลิวโคมัยซินที่ 0.006 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (EU, 2021) จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 0.020 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน พบว่า $S/N \geq 3$ และมีค่าร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (EU, 2021) ดังนั้นค่า LOD ของสารลิวโคมัยซิน มีค่าเท่ากับ 0.020 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

5.3.3 ผลการยืนยันค่า LOQ ของสารลิวโคมัยซินที่ 0.020 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่า %recovery ไม่อยู่ในช่วง 60-115% และ %RSD ไม่เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2023) จึงทำการปรับค่า LOQ ที่ 0.050 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่า %mean recovery อยู่ในช่วง 60-115% และ %RSD เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่ 21 (AOAC, 2023) ดังนั้นค่า LOQ ของสารลิวโคมัยซินมีค่าเท่ากับ 0.050 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า LOD และ LOQ ของสารลิวโคมัยซิน

Compound	Spiked matrix sample 0.03 mg/kg (n = 10)			LOD (0.02 mg/kg, n = 10)	LOQ (0.05 mg/kg, n = 10)	
	S'_0	LOD	LOQ		%mean	%RSD

		(3S ₀)	(10 S ₀)	S/N	%IR	recovery	
Leucomycin	0.0020	0.006	0.020	652.50	22.83	94.20	5.79

5.4 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ

5.4.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารลิโคมัยซิน 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารลิโคมัยซินอยู่ในช่วงตามเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2023) แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีทดสอบ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2023)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)
0.05	60-115	76.60
0.50	80-110	106.72
1.00	80-110	104.48

5.4.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารลิโคมัยซิน 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 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	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability; %RSD _r , n = 10)
0.05	16.57	4.45
0.50	11.72	2.62
1.00	10.56	3.38

5.4.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารลิโคมัยซิน 3 ระดับ คือ 0.05 (LOQ), 0.50 และ 1.00 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	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (with-in laboratory reproducibility; %RSD _R , n = 20)
0.05	25.11	5.33
0.50	17.76	6.53
1.00	16.00	5.16

5.5 ผลการทดสอบ selectivity และ specificity

5.5.1 จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank กับสัญญาณของ spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารลิวโคมัยซิน พบว่า ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน matrix ของ sample ที่มีพีคตรงกับสารลิวโคมัยซินที่ตำแหน่ง RT ในช่วง ± 0.1 นาที เป็นไปตามเกณฑ์ของ SANTE/11312/2021 V2

5.5.2 จากผลการทดสอบ spiked matrix sample ที่เติมสารลิวโคมัยซินเปรียบเทียบกับ spiked matrix sample ที่เติมสารลิวโคมัยซินและสไปราไมซินที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่พบ peak ของสารสไปราไมซินที่ตำแหน่ง RT เดียวกับสารลิวโคมัยซิน ในช่วง ± 0.1 นาที ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ SANTE/11312/2021 V2

จากการทดสอบ selectivity และ specificity แสดงว่า วิธีการทดสอบมีความไวและความจำเพาะต่อสารลิวโคมัยซินที่มีสารรบกวนได้ดี

6. สรุปผลการทดลอง

การตรวจความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ แสดงให้เห็นว่า วิธีทดสอบเหมาะสมสำหรับการทดสอบสารลิวโคมัยซินในอาหารสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบอ้างอิงตามแนวทางของ EURACHEM Guide, 2025 เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน มีความเที่ยงและความแม่นยำในเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (2023) โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.02 mg/kg, LOQ เท่ากับ 0.05 mg/kg และช่วงของการทดสอบที่ 0.05-1.00 mg/kg ในอาหารสัตว์

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (proficiency test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและเที่ยงยิ่งขึ้น และควรให้ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารในกลุ่มแมโครไลด์ตัวอื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการใช้อย่างผิดวิธีในระบบการผลิตสินค้าปศุสัตว์ต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณนายอุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษานี้สำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

- ใจพร พุ่มคำ. 2555. อาหาร (ไม่)ปลอดภัย... ผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์. *วารสารอาหารและยา*. 8-11.
- ชัยวัฒน์ อาจีน และวรรณพร ทะพิงค์แก. 2557. การใช้สารประกอบโฟโตเจนิกเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์กระเพาะเดียว. *วารสารสัตวศาสตร์แห่งประเทศไทย*. 1(1) : 11-20.
- วรรณพร ทะพิงค์แก. 2557. ทางเลือกในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตสำหรับปศุสัตว์. *วารสารเกษตร*. 30 (2): 201-212.
- AOAC Official Methods of Analysis. 2023. Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F: 1-18.
- Chen, L., Dan, Y., Zhicong, Y., Wuduo, Z., Yanlong, C., Wenfen, Z., and Shusheng, Z. 2019. Determination of Six Macrolide Antibiotics in Chicken Sample by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Based on Solid Phase Extraction. *Jour of Analytical Methods in Chemistry*.
- EURACHEM Guide. 2025. The Fitness for Purpose of Analytical Method A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 3rd edition.
- European Commission. 2021. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical method for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling

and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. *Official Journal of the European Union*, L 180/84-109.

European Commission Directorate General for Health and Food Safety. 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.

Liu, G., Zhu, B., Wang, F., Ren, X., Li, Y., Zhang, F. and Wang, J. 2021. Quantitative analysis of impurities in leucomycin bulk drugs and tablets: A high performance liquid chromatography-charged aerosol detection method and its conversion to ultraviolet detection method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 202.

Song, X., Zhou, T., Liu, Q., Zhang, M., Meng, C., Li, J. and He, L. 2016. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food chemistry*.

U.S. Food and Drug Administration (2023) Methods, method verification and validation, laboratory manual, ORA laboratory procedure, volume II, ORA-LAB.5.4.5.