การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ionophores ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

องอาจ บุญบรรลุ ธนธรณ์ ด้วงทอง ปนัดดา เต้าชัยภูมิ นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไอโอโนฟอร์ (Ionophores) ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมยาด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) สำหรับการประเมินความสม่ำเสมอของการผสม (Homogeneity) และการปนเปื้อนข้ามของยา (Drug Carryover) ผลการศึกษาพบว่า วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9983 - 0.9999 สำหรับการทดสอบความสม่ำเสมอของการผสม (ช่วงความเข้มข้น 10 - 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่งให้ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ระหว่าง 0.67 - 6.60% และร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ระหว่าง 87.30 - 105.40% สำหรับการทดสอบการปนเปื้อนข้าม (ช่วงความเข้มข้น 0.4 - 4.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีค่า r เท่ากับ 0.9972 - 0.9991 โดยมี %RSD ระหว่าง 2.61 - 10.82% และ %recovery ระหว่าง 90.00 - 103.33% ซึ่งค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ทั้งนี้ วิธีวิเคราะห์มีขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดปริมาณ (LOQ) สำหรับความสม่ำเสมอของการผสมเท่ากับ 1.2 - 1.6 และ 9.17 - 9.91 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และสำหรับการปนเปื้อนข้ามเท่ากับ 0.04 และ 0.36 - 0.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากการศึกษาผลกระทบจากเมทริกซ์ (Matrix Effect) พบทั้งการเพิ่มขึ้นและลดลงของสัญญาณ (Signal Enhancement และ Signal Suppression) จึงแนะนำให้ใช้ระบบสารละลายมาตรฐานเทียบกับเมทริกซ์ (Matrix-matched หรือ Matrix-fortified calibration) เพื่อชดเชยผลกระทบดังกล่าว ด้านการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ไม่พบสัญญาณรบกวนหรือการรบกวนข้าม (Cross-interference) ระหว่างสารที่ศึกษา สรุปได้ว่า วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS นี้มีความถูกต้อง ความเที่ยง ความไว และความจำเพาะเจาะจงผ่านเกณฑ์มาตรฐาน และมีความเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับใช้ตรวจสอบสารกลุ่มไอโอโนฟอร์ในอาหารสัตว์ผสมยาภายใต้เงื่อนไขของการศึกษานี้

คำสำคัญ: Ionophores อาหารสัตว์ที่ผสมยา homogeneity, drug carryover, liquid chromatography-mass spectrometry

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Validation of an Analytical Method for the Determination of Ionophores in Medicated Feed Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

Ongart Boonbanlu, Thanathorn Duangthong, Panadda Taochaiyaphum, and Naraya Tangsirisap

Abstract

This study aimed to validate a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of ionophore compounds, namely lasalocid, maduramicin, monensin, narasin, and salinomycin, in medicated animal feed to evaluate homogeneity and drug carryover. The results showed that the analytical method exhibited acceptable linearity, with correlation coefficients (r) ranging from 0.9983 to 0.9999 for the homogeneity test (concentration range of 10 - 120 mg/kg), yielding relative standard deviations (%RSD) of 0.67 - 6.60% and recoveries of 87.30 - 105.40%. For the drug carryover test (concentration range of 0.4 - 4.8 mg/kg), the correlation coefficients (r) ranged from 0.9972 to 0.9991, with %RSD values of 2.61 - 10.82% and recoveries of 90.00 - 103.33%. Both accuracy and precision were within acceptable criteria. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for homogeneity were 1.2 - 1.6 mg/kg and 9.17 - 9.91 mg/kg, respectively, while those for drug carryover were 0.04 mg/kg and 0.36 - 0.38 mg/kg, respectively. Matrix effect studies revealed both signal enhancement and signal suppression; therefore, matrix-matched or matrix-fortified calibration is recommended to compensate for matrix effects. Specificity tests demonstrated no interfering signals or cross-interference among the studied compounds. In conclusion, the proposed LC-MS/MS method demonstrates acceptable accuracy, precision, sensitivity, and specificity, making it highly suitable for the determination of ionophores in medicated animal feed under the conditions of this study.

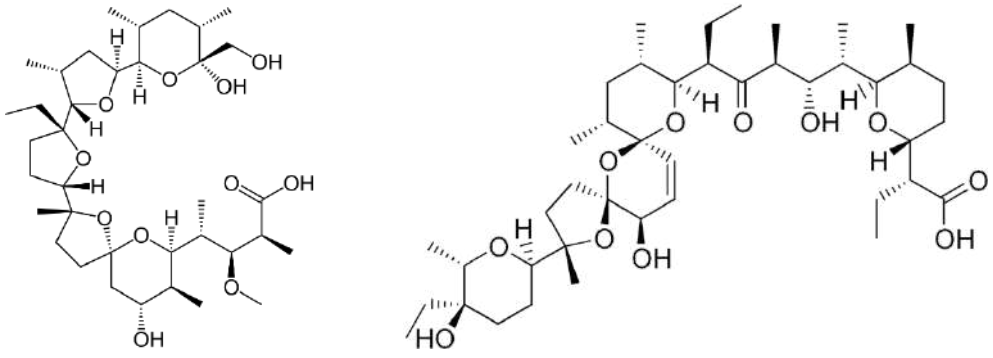
Keywords: ionophores, medicated feed, homogeneity, drug carryover, liquid chromatography-mass spectrometry

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development.

บทนำ

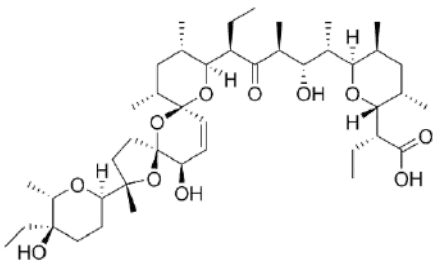
ยากลุ่ม ionophores เป็นสารปฏิชีวนะที่มีกลไกการออกฤทธิ์เฉพาะในการรบกวนสมดุลของไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยทำหน้าที่เป็นตัวพาไอออนบวก เช่น Na^+, K^+, Ca^{2+} และ Mg^{2+} ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เซลล์ต้องใช้พลังงานมากขึ้นในการรักษาสมดุล จนกระทั่งพลังงานหมดและตายในที่สุด ยากลุ่มนี้นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์ปีกและโคเนื้อ เพื่อควบคุมโรค coccidiosis เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร และป้องกันโรค bloat ในโค ตัวยาที่นิยมใช้ได้แก่ monensin สำหรับโคเนื้อและโคนม salinomycin สำหรับสัตว์ปีกและสุกร narasin สำหรับไก่เนื้อ และ lasalocid สำหรับโคเนื้อและสัตว์ปีก การใช้ยากลุ่มนี้ต้องอยู่ภายใต้การดูแลของสัตวแพทย์ ต้องระวังการใช้ร่วมกับยากลุ่ม macrolides และต้องคำนึงถึงระยะหยุดยาก่อนส่งโรงฆ่ารวมถึงต้องมีการผสมยาในอาหารอย่างทั่วถึงด้วยเครื่องผสมที่มีประสิทธิภาพ มีการตรวจสอบความเข้มข้นของยาเป็นระยะ และปฏิบัติตามข้อกำหนดทางกฎหมายเรื่องปริมาณยาตกค้างสูงสุดเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ทั้งนี้แนวโน้มในอนาคตมีการพัฒนาสูตรยาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นควบคู่กับการวิจัยหาทางเลือกอื่นเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะและการพัฒนาระบบตรวจสอบยาตกค้างให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ด้วยเหตุผลดังกล่าวภายแผนใต้แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560 - 2564 ยุทธศาสตร์ที่ 4 การป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยาและควบคุมกำกับดูแลการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมในภาคการเกษตรและสัตว์เลี้ยง กรมปศุสัตว์ได้มุ่งมั่นดำเนินการเพื่อให้บรรลุเป้าหมายในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะลงร้อยละ 30 รวมถึงการควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ที่ผสมยา ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการควบคุมการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยา ซึ่งมีการกำหนดหลักเกณฑ์การควบคุมคุณภาพที่สำคัญคือ ทดสอบการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีการกระจายตัวของยาอย่างสม่ำเสมอตามใบสั่งยาของสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์ม สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงไม่เกิดการปนเปื้อนข้ามระหว่างชุดการผลิตตามที่กฎหมายกำหนด เป็นการลดโอกาสเกิดสารตกค้างรวมถึงการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ซึ่งการตรวจสอบกำหนดให้ใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ homogeneity และ drug carryover

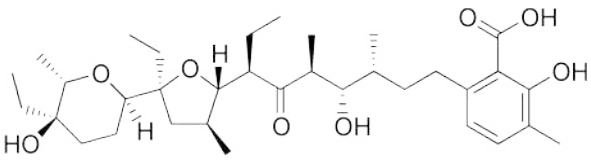


Monensin Salinomycin

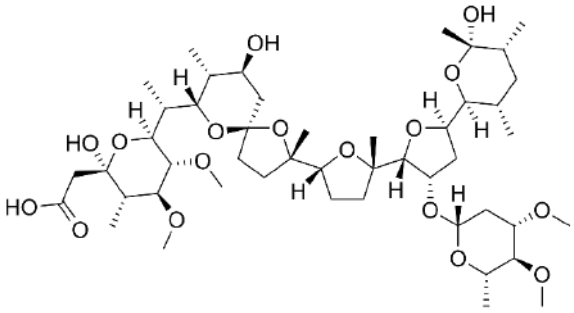
รูปที่ 1 โครงสร้างของสารกลุ่ม ionophores



Narasin



Lasalocid



Maduramicin

รูปที่ 1 โครงสร้างของสารกลุ่ม ionophores (ต่อ)

1. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ionophores ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับทดสอบปริมาณ ionophores 5 ชนิด ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา และการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ที่ช่วงระดับความเข้มข้น 10 - 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) ในช่วงระดับ 0.4 – 4.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ionophores ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry และนำไปใช้ในการทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

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 Volumetric pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร

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, internal standard (IS)

4.4 ขั้นตอนการทดลอง

4.4.1 การเตรียม mobile phase

1) การเตรียม 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 ปิเปต formic acid 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับ DI water ด้วย กรองผ่าน cellulose acetate filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารละลายใส่ใน laboratory bottle ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไป degas

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

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

4.4.4 การเตรียม matrix-fortified standard calibration curve ของ homogeneity และ drug carryover ขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 1 และ 2 และนำไปสกัดตามรูปที่ 2

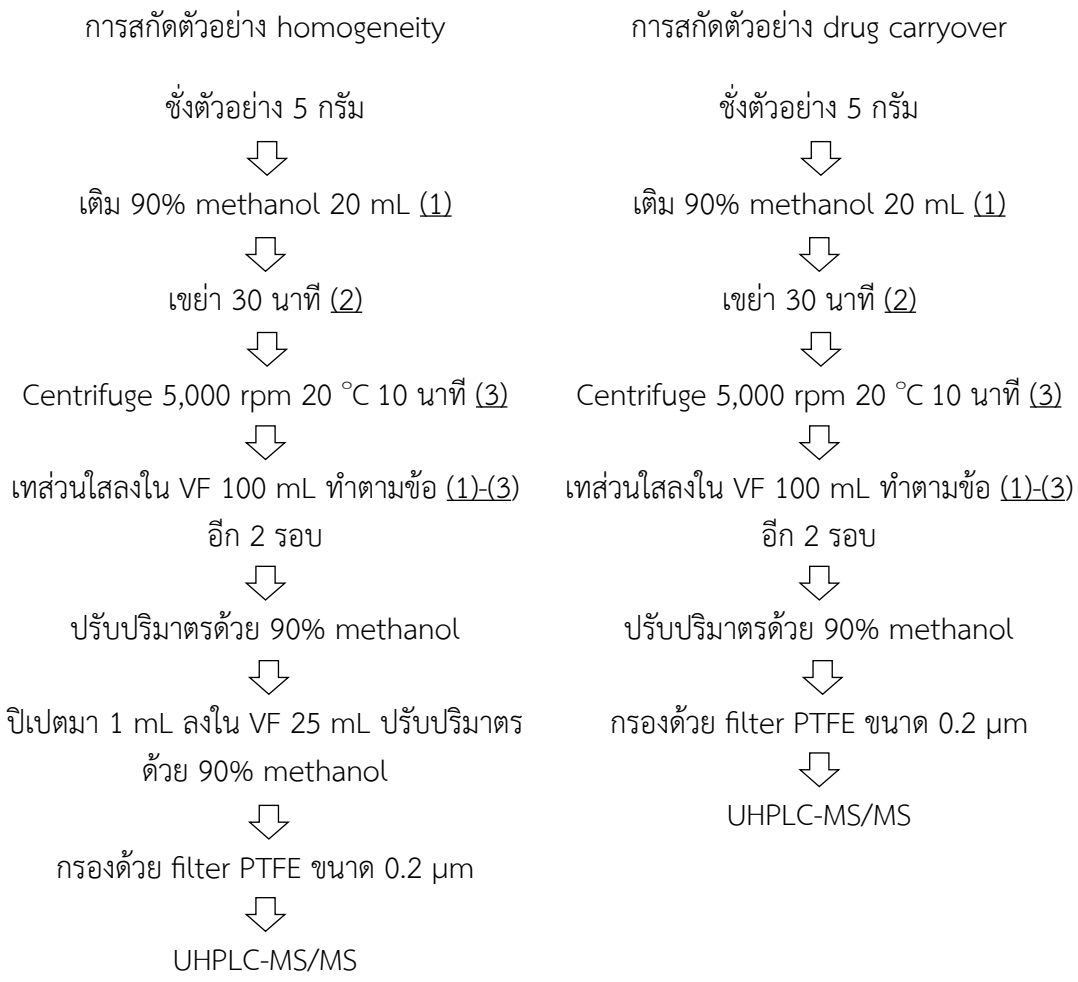
ตารางที่ 1 การเตรียม matrix-fortified standard calibration curve ทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ homogeneity

Level	Blank sample	500 mg/kg ionophore addition (mL)	1,000 mg/kg nigericin (IS) addition (mL)	Final concentration (mg/kg)
1	5	0.1	0.4	10
2	5	0.3	0.4	30
3	5	0.6	0.4	60
4	5	0.9	0.4	90
5	5	1.2	0.4	120

ตารางที่ 2 การเตรียม matrix-fortified standard calibration curve ทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ drug carryover

Level	Blank sample	20 mg/kg ionophore addition (mL)	20 mg/kg nigericin (IS) addition (mL)	Final concentration (mg/kg)
1	5	0.1	0.3	0.4
2	5	0.3	0.3	1.2
3	5	0.6	0.3	2.4
4	5	0.9	0.3	3.6
5	5	1.2	0.3	4.8

4.4.5 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง homogeneity และ drug carryover



รูปที่ 2 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง homogeneity และ drug carryover

4.4.6 ศึกษาช่วงของการทดสอบ (working range) และศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียม matrix-fortified sample สำหรับทดสอบ homogeneity ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 – 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (10, 30, 60, 90 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และสำหรับทดสอบ drug carryover และให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.4 - 4.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (0.4, 1.2, 2.4, 3.6 และ 4.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ทดสอบความเข้มข้นละ 7 ซ้ำๆ นำค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคระหว่าง analyte product ion/ internal standard product ion และความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005)

4.4.7 ศึกษา accuracy โดยการเตรียม matrix-fortified sample ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 30, 60 และ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ homogeneity ความเข้มข้น 1.2, 2.4 และ 3.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover โดยเตรียมความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % recovery homogeneity อยู่ในช่วง 90 – 107% และ drug carryover อยู่ในช่วง 80 - 110 (AOAC, 2019)

4.4.8 ศึกษา precision โดยการเตรียม matrix-fortified sample ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 30, 60 และ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ homogeneity ความเข้มข้น 1.2, 2.4 และ 3.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover โดยเตรียมความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ homogeneity %RSD ≤ 6.3 และ drug carryover ≤ 10 (AOAC, 2019)

4.4.9 ศึกษา limit of detection (LOD) โดยการประเมินจาก signal to noise จะต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3 : 1 โดยเตรียม matrix-fortified sample ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ homogeneity และความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover ทดสอบความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

4.4.10 ศึกษา limit of quantitation (LOQ) โดยการประเมินจาก signal to noise จะต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 10 : 1 โดยเตรียม matrix-fortified sample ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ homogeneity และความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับทดสอบ drug carryover ทดสอบความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

4.4.11 ศึกษา matrix effect ของการทดสอบ homogeneity และ drug carryover โดยการเตรียม matrix-matched calibration curve และ เตรียม standard solution calibration curve จากนั้นคำนวณหา matrix effect โดยใช้สูตร

$$\text{matrix effect} = \frac{\text{Slope ของ matrix-matched calibration curve}}{\text{Slope ของ standard solution calibration}} \times 100$$

4.4.12 ศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม ionophores ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง blank matrix, standard solution และตัวอย่าง blank matrix ที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ผลตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม ionophores ในตัวอย่างอาหารสัตว์

ตัวอย่างทดสอบ	การเตรียมตัวอย่าง	ผลที่คาดหวัง
Blank matrix	อาหารสัตว์ที่ไม่เติมสารมาตรฐาน	ไม่พบสัญญาณรบกวนที่ RT ของสารเป้าหมาย
Standard solution	สารมาตรฐาน ionophores 5 ชนิดใน solvent	พบ peak ของสารเป้าหมาย
Matrix + standard	Blank matrix เติม ionophores 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 60 mg/kg	พบ peak ที่ RT สอดคล้องกับ standard solutions
Matrix + individual analyte	Blank matrix เติมสารแต่ละชนิดแยกกัน	ไม่พบการรบกวนระหว่างสาร

5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษา linearity ทั้งในการทดสอบ homogeneity และ drug carryover พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) ของการทดสอบ homogeneity ให้ค่า *r* อยู่ในช่วง 0.9983 - 0.9999 (ตารางที่ 4) และการทดสอบ drug carryover ให้ค่า *r* อยู่ในช่วง 0.9972 - 0.9991 (ตารางที่ 5) ผลการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดีระหว่างความเข้มข้นของสารและสัญญาณตอบสนองของ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin ตลอดช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ทั้งนี้ค่าที่ได้เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005)

5.2 ผลการศึกษา working range ในการทดสอบ homogeneity ช่วงความเข้มข้น 10 - 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบค่า %RSD ของสารทั้ง 5 ชนิดอยู่ในช่วง 0.67 - 6.60% และ %Recovery อยู่ในช่วง 87.30 -105.40% ตามตารางที่ 6 - 10 และการทดสอบ drug carryover ที่ช่วงความเข้มข้น 0.4 - 4.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.61 - 10.82% และค่า %Recovery อยู่ในช่วง 90.00 - 103.33% ตามตารางที่ 11 - 15

ตารางที่ 4 Linearity ของการทดสอบ homogeneity

No	Compounds	Slope	Intercept	*r*
1	Lasalocid	555.101	2735.078	0.9983
2	Maduramicin	324.577	7944.698	0.9988
3	Monensin	273.685	3042.663	0.9992
4	Narasin	295.541	8176.908	0.9991
5	Salinomycin	137.549	1549.665	0.9999

ตารางที่ 5 Linearity ของการทดสอบ drug carryover

No	Compounds	Slope	Intercept	*r*
1	Lasalocid	16904.074	36.507	0.9987
2	Maduramicin	25561.978	140.270	0.9972
3	Monensin	16096.848	-5.882	0.9974
4	Narasin	19103.494	25.378	0.9991
5	Salinomycin	10336.239	-33.597	0.9973

ตารางที่ 6 Working range homogeneity ของ lasalocid

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**10**	**30**	**60**	**90**	**120**
Mean	9.17	31.26	61.54	90.99	116.67
SD	0.32	1.02	2.04	1.09	2.79
%RSD	3.50	3.22	3.31	1.20	2.39
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 7.5	%RSD ≤ 6.3	%RSD ≤ 5.7	%RSD ≤ 5.4	%RSD ≤ 5.1
%Recovery	87.30	105.40	102.56	101.10	97.23
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %		90 – 107 %		

ตารางที่ 7 Working range homogeneity ของ maduramicin

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**10**	**30**	**60**	**90**	**120**
Mean	9.25	29.98	58.65	89.14	118.66
SD	0.31	0.77	1.36	2.19	1.38
%RSD	3.34	2.58	2.32	2.45	1.16
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 7.5	%RSD ≤ 6.3	%RSD ≤ 5.7	%RSD ≤ 5.4	%RSD ≤ 5.1
%Recovery	92.52	99.92	97.74	99.05	98.89
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %		90 – 107 %		

ตารางที่ 8 Working range homogeneity ของ monensin

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**10**	**30**	**60**	**90**	**120**
Mean	9.91	30.22	60.18	90.84	119.22
SD	0.43	1.03	1.77	0.70	1.18
%RSD	4.31	3.40	2.95	0.77	0.99
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 7.5	%RSD ≤ 6.3	%RSD ≤ 5.7	%RSD ≤ 5.4	%RSD ≤ 5.1
%Recovery	99.11	100.72	100.31	100.93	99.35
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %		90 – 107 %		

ตารางที่ 9 Working range homogeneity ของ narasin

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**10**	**30**	**60**	**90**	**120**
Mean	9.42	31.14	59.01	90.27	119.99
SD	0.41	0.96	0.96	0.60	0.95
%RSD	4.35	3.09	1.62	0.67	0.79
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 7.5	%RSD ≤ 6.3	%RSD ≤ 5.7	%RSD ≤ 5.4	%RSD ≤ 5.1
%Recovery	94.24	103.81	98.35	100.30	99.99
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %		90 – 107 %		

ตารางที่ 10 Working range homogeneity ของ salinomycin

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**10**	**30**	**60**	**90**	**120**
Mean	9.49	30.52	59.76	91.42	121.04
SD	0.63	0.94	1.99	2.95	2.23
%RSD	6.60	3.07	3.32	3.23	1.84
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 7.5	%RSD ≤ 6.3	%RSD ≤ 5.7	%RSD ≤ 5.4	%RSD ≤ 5.1
%Recovery	94.93	101.73	99.60	101.58	100.86
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %		90 – 107 %		

ตารางที่ 11 Working range drug carryover ของ lasalocid

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**0.4**	**1.2**	**2.4**	**3.6**	**4.8**
Mean	0.36	1.21	2.48	3.52	4.73
SD	0.02	0.06	0.08	0.20	0.16
%RSD	4.24	5.00	3.11	5.65	3.45
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 12	%RSD ≤ 10	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 8
%Recovery	90.00	100.83	103.33	97.90	98.54
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %				

ตารางที่ 12 Working range drug carryover ของ maduramicin

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**0.4**	**1.2**	**2.4**	**3.6**	**4.8**
Mean	0.36	1.16	2.26	3.44	4.66
SD	0.03	0.06	0.10	0.17	0.21
%RSD	7.06	5.48	4.54	5.01	4.59
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 12	%RSD ≤ 10	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 8
%Recovery	90.71	96.43	94.05	95.67	97.14
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %				

ตารางที่ 13 Working range drug carryover ของ monensin

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**0.4**	**1.2**	**2.4**	**3.6**	**4.8**
Mean	0.37	1.10	2.19	3.25	4.38
SD	0.04	0.11	0.18	0.26	0.23
%RSD	10.82	9.95	8.42	7.96	5.23
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 12	%RSD ≤ 10	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 8
%Recovery	92.86	91.31	91.25	90.20	91.19
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %				

ตารางที่ 14 Working range drug carryover ของ narasin

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**0.4**	**1.2**	**2.4**	**3.6**	**4.8**
Mean	0.38	1.23	2.44	3.46	4.72
SD	0.02	0.03	0.08	0.18	0.18
%RSD	5.29	2.61	3.30	5.30	3.89
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 12	%RSD ≤ 10	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 8
%Recovery	93.93	102.50	101.79	96.03	98.36
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %				

ตารางที่ 15 Working range drug carryover ของ salinomycin

จำนวนซ้ำ	**ความเข้มข้น (mg/kg)**				
(n=7)	**0.4**	**1.2**	**2.4**	**3.6**	**4.8**
Mean	0.37	1.10	2.19	3.25	4.38
SD	0.04	0.11	0.18	0.26	0.23
%RSD	10.82	9.95	8.42	7.96	5.23
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 12	%RSD ≤ 10	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 9	%RSD ≤ 8
%Recovery	92.86	91.31	91.25	90.20	91.19
เกณฑ์การยอมรับ	80 – 110 %				

5.3 ผลการศึกษา accuracy สารกลุ่ม ionophores ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin สำหรับทดสอบ homogeneity ที่ระดับความเข้มข้น 30, 60 และ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %recovery อยู่ในช่วง 94.59 – 105.39 (เกณฑ์การยอมรับ 90 - 107%) (ตารางที่ 16 - 20) และสำหรับทดสอบ drug carryover ที่ระดับความเข้มข้น 1.2, 2.4 และ 3.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %recovery อยู่ในช่วง 85.95 – 103.33 % (เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110%) (ตารางที่ 21 - 25)

ตารางที่ 16 %recovery ของ lasalocid ในการทดสอบ homogeneity

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Mean	31.62	61.54	90.99	28.38	56.77	87.02	29.81	59.28	90.16
SD	1.02	2.04	1.09	0.93	1.67	2.46	0.69	0.86	0.96
%RSD	3.22	3.31	1.20	3.28	2.94	2.83	2.33	1.46	1.07
%Recovery	105.39	102.56	101.10	94.59	94.61	96.69	99.36	98.80	100.18
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 90 – 107 %									

ตารางที่ 17 %recovery ของ maduramicin ในการทดสอบ homogeneity

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Mean	29.98	58.65	89.14	30.04	59.28	87.26	29.81	58.33	89.00
SD	0.77	1.36	2.19	1.05	1.10	1.84	0.78	1.27	1.22
%RSD	2.58	2.32	2.45	3.48	1.85	2.10	2.61	2.18	1.37
%Recovery	99.92	97.74	99.05	100.14	98.80	96.95	99.36	97.21	98.89
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 90 – 107 %									

ตารางที่ 18 %recovery ของ monensin ในการทดสอบ homogeneity

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Mean	30.22	60.18	90.84	30.55	59.19	87.29	30.35	58.86	89.51
SD	1.03	1.77	0.69	0.92	1.96	3.45	0.89	1.43	0.95
%RSD	3.40	2.94	0.76	3.01	3.31	3.95	2.93	2.42	1.06
%Recovery	100.72	100.31	100.93	101.82	98.66	96.99	101.16	98.09	99.46
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 90 – 107 %									

ตารางที่ 19 %recovery ของ narasin ในการทดสอบ homogeneity

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Mean	31.14	59.01	90.27	30.45	58.08	86.87	29.82	59.36	89.75
SD	0.96	0.96	0.60	1.40	1.53	2.72	0.88	0.35	0.65
%RSD	3.09	1.62	0.67	4.58	2.64	3.13	2.96	0.59	0.72
%Recovery	103.81	98.35	100.30	101.51	96.80	96.53	99.40	98.93	99.72
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 90 – 107 %									

ตารางที่ 20 %recovery ของ salinomycin ในการทดสอบ homogeneity

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Mean	30.52	59.76	91.42	30.91	59.85	87.33	29.74	59.03	90.37
SD	0.94	1.99	2.95	0.75	1.51	3.12	0.92	1.50	2.10
%RSD	3.07	3.32	3.23	2.42	2.52	3.57	3.09	2.55	2.32
%Recovery	101.73	99.60	101.58	103.02	99.74	97.03	99.13	98.39	100.41
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 90 – 107 %									

ตารางที่ 21 %recovery ของ lasalocid ในการทดสอบ drug carryover

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6
Mean	1.21	2.48	3.52	1.14	2.31	3.37	1.07	2.06	3.27
SD	0.06	0.08	0.20	0.07	0.10	0.26	0.06	0.11	0.14
%RSD	5.00	3.11	5.65	5.88	4.37	7.62	5.12	5.54	4.23
%Recovery	100.83	103.33	97.90	94.88	96.31	93.73	89.52	85.95	90.87
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 80 – 110 %									

ตารางที่ 22 %recovery ของ maduramicin ในการทดสอบ drug carryover

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6
Mean	1.16	2.26	3.44	1.10	2.32	3.37	1.09	2.20	3.30
SD	0.06	0.10	0.17	0.06	0.14	0.14	0.08	0.11	0.09
%RSD	5.48	4.54	5.01	5.36	6.05	4.28	7.59	4.79	2.70
%Recovery	96.43	94.05	95.67	91.79	96.67	93.73	91.19	91.55	91.75
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 80 – 110 %									

ตารางที่ 23 %recovery ของ monensin ในการทดสอบ drug carryover

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6
Mean	1.10	2.19	3.25	1.16	2.31	3.45	1.21	2.32	3.40
SD	0.11	0.18	0.26	0.04	0.07	0.12	0.05	0.12	0.23
%RSD	9.95	8.42	7.96	3.54	3.08	3.58	4.51	5.08	6.79
%Recovery	91.31	91.25	90.20	96.90	96.37	95.79	101.19	96.79	94.56
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 80 – 110 %									

ตารางที่ 24 %recovery ของ narasin ในการทดสอบ drug carryover

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6
Mean	1.23	2.44	3.46	1.18	2.28	3.41	1.13	2.18	3.36
SD	0.03	0.08	0.18	0.07	0.12	0.15	0.05	0.13	0.15
%RSD	2.61	3.30	5.30	6.01	5.11	4.40	4.43	5.77	4.56
%Recovery	102.50	101.79	96.03	98.57	95.12	94.60	94.29	91.01	93.29
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 80 – 110 %									

ตารางที่ 25 %recovery ของ salinomycin ในการทดสอบ drug carryover

No.	Concentration (mg/kg)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6	1.2	2.4	3.6
Mean	1.10	2.19	3.25	1.17	2.29	3.50	1.19	2.39	3.61
SD	0.11	0.18	0.26	0.04	0.06	0.09	0.06	0.08	0.07
%RSD	9.95	8.42	7.96	3.74	2.68	2.71	4.95	3.30	1.81
%Recovery	91.31	91.25	90.20	97.74	95.30	97.14	99.29	99.40	100.24
เกณฑ์การยอมรับ %recovery 80 – 110 %									

5.4 ผลการศึกษา precision สารกลุ่ม ionophores ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin ในการทดสอบ homogeneity ที่ระดับความเข้มข้น 30, 60 และ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า repeatability ของสารทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.67 - 3.95% (เกณฑ์การยอมรับ ≤ 6.3 %) และค่า intermediate precision อยู่ในช่วง 1.95 - 5.35% (เกณฑ์การยอมรับ ≤ 10%) (ตารางที่ 26 - 30) และการทดสอบ drug carryover ที่ระดับความเข้มข้น 1.2, 2.4 และ 3.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า repeatability ของสารทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.61 - 9.95% (เกณฑ์การยอมรับ ≤ 10%) และค่า intermediate precision (%RSD) อยู่ในช่วง 4.30 - 8.71% (เกณฑ์การยอมรับ ≤ 15%) (ตารางที่ 31 - 35)

ตารางที่ 26 %RSD ของ lasalocid ในการทดสอบ homogeneity

No.	30 mg/kg			60 mg/kg			90 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	31.62	28.38	29.81	61.54	56.77	59.28	90.99	87.02	90.16
SD (n=7)	1.02	0.93	0.69	2.04	1.67	0.86	1.09	2.46	0.96
Repeatability, %RSD (n=7)	3.22	3.28	2.33	3.31	2.94	1.46	1.20	2.83	1.07
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 6.3								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	5.35			4.24			2.63		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								

ตารางที่ 27 %RSD ของ maduramicin ในการทดสอบ homogeneity

No.	30 mg/kg			60 mg/kg			90 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	29.98	30.04	29.81	58.65	59.28	58.33	89.14	87.26	89.00
SD (n=7)	0.77	1.05	0.78	1.36	1.10	1.27	2.19	1.84	1.22
Repeatability, %RSD (n=7)	2.58	3.48	2.61	2.32	1.85	2.18	2.45	2.10	1.37
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 6.3								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	2.79			2.13			2.16		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								

ตารางที่ 28 %RSD ของ monensin ในการทดสอบ homogeneity

No.	30 mg/kg			60 mg/kg			90 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	30.22	30.55	30.35	30.22	59.19	58.86	60.18	87.29	89.51
SD (n=7)	1.03	0.92	0.89	1.03	1.96	1.43	1.77	3.45	0.95
Repeatability, %RSD (n=7)	3.40	3.01	2.93	3.40	3.31	2.42	2.94	3.95	1.06
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 6.3								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	3.00			2.93			2.80		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								

ตารางที่ 29 %RSD ของ narasin ในการทดสอบ homogeneity

No.	30 mg/kg			60 mg/kg			90 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	31.14	90.27	29.82	59.01	58.08	59.36	90.27	86.87	89.75
SD (n=7)	0.96	0.60	0.88	0.96	1.53	0.35	0.60	2.72	0.65
Repeatability, %RSD (n=7)	3.09	0.67	2.96	1.62	2.64	0.59	0.67	3.13	0.72
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 6.3								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	3.89			1.95			2.46		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								

ตารางที่ 30 %RSD ของ salinomycin ในการทดสอบ homogeneity

No.	30 mg/kg			60 mg/kg			90 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	30.52	30.91	29.74	59.76	59.85	59.03	91.42	87.33	90.37
SD (n=7)	0.94	0.75	0.92	1.99	1.51	1.50	2.95	3.12	2.10
Repeatability, %RSD (n=7)	3.07	2.42	3.09	3.32	2.52	2.55	3.23	3.57	2.32
เกณฑ์การยอมรับ	%RSDr ≤ 6.3								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	3.17			2.75			3.53		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSDR ≤ 10								

ตารางที่ 31 %RSD ของ lasalocid ในการทดสอบ drug carryover

No.	1.2 mg/kg			2.4 mg/kg			3.6 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	1.21	1.14	1.07	2.48	2.31	2.06	3.52	3.37	3.27
SD (n=7)	0.06	0.07	0.06	0.08	0.10	0.11	0.20	0.26	0.14
Repeatability, %RSD (n=7)	5.00	5.88	5.12	3.11	4.37	5.54	5.65	7.62	4.23
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	7.11			8.71			6.52		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 15								

ตารางที่ 32 %RSD ของ maduramicin ในการทดสอบ drug carryover

No.	1.2 mg/kg			2.4 mg/kg			3.6 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	1.16	1.10	1.09	2.26	2.32	2.20	3.44	3.37	3.30
SD (n=7)	0.06	0.06	0.08	0.10	0.14	0.11	0.17	0.14	0.09
Repeatability, %RSD (n=7)	5.48	5.36	7.59	4.54	6.05	4.79	5.01	4.28	2.70
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	6.42			5.43			4.30		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 15								

ตารางที่ 33 %RSD ของ monensin ในการทดสอบ drug carryover

No.	1.2 mg/kg			2.4 mg/kg			3.6 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	1.10	1.16	1.21	2.19	2.31	2.32	3.25	3.45	3.40
SD (n=7)	0.11	0.04	0.05	0.18	0.07	0.12	0.26	0.12	0.23
Repeatability, %RSD (n=7)	9.95	3.54	4.51	8.42	3.08	5.08	7.96	3.58	6.79
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	7.46			6.17			6.54		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 15								

ตารางที่ 34 %RSD ของ narasin ในการทดสอบ drug carryover

No.	1.2 mg/kg			2.4 mg/kg			3.6 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	1.23	1.18	1.13	2.44	2.28	2.18	3.46	3.41	3.36
SD (n=7)	0.03	0.07	0.05	0.08	0.12	0.13	0.18	0.15	0.15
Repeatability, %RSD (n=7)	2.61	6.01	4.43	3.30	5.11	5.77	5.30	4.40	4.56
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	5.54			6.54			4.69		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 15								

ตารางที่ 35 %RSD ของ salinomycin ในการทดสอบ drug carryover

No.	1.2 mg/kg			2.4 mg/kg			3.6 mg/kg		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Mean (n=7)	1.10	1.17	1.19	2.19	2.29	2.39	3.25	3.50	3.61
SD (n=7)	0.11	0.04	0.06	0.18	0.06	0.08	0.26	0.09	0.07
Repeatability, %RSD (n=7)	9.95	3.74	4.95	8.42	2.68	3.30	7.96	2.71	1.81
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 10								
Intermediate precision, %RSD (n=21)	7.25			6.16			6.35		
เกณฑ์การยอมรับ	%RSD ≤ 15								

5.5 ผลการศึกษา LOD และ LOQ สารกลุ่ม ionophores ในการทดสอบ homogeneity พบว่าค่า LOD อยู่ในช่วง 1.2 - 1.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ 9.17 - 9.91 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และการทดสอบ drug carryover พบว่าค่า LOD ของทุกสารมีค่า 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ 0.36 - 0.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 36)

ตารางที่ 36 LOD และ LOQ สารกลุ่ม ionophores ในการทดสอบ homogeneity และ drug carryover

Compounds	Homogeneity		Drug carryover	
	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Lasalocid	1.2	9.17	0.04	0.36
Maduramicin	1.6	9.25	0.04	0.36
Monensin	1.3	9.91	0.04	0.37
Narasin	1.5	9.42	0.04	0.38
Salinomycin	1.2	9.49	0.04	0.37

5.6 ผลการศึกษา matrix effect ของตัวอย่าง homogeneity (ตารางที่ 37) และตัวอย่าง drug carryover (ตารางที่ 38) พบว่า matrix ส่งผลต่อการตอบสนองของสัญญาณสารอย่างชัดเจน โดยผลการทดสอบ homogeneity พบทั้งการเพิ่มขึ้นของสัญญาณ (signal enhancement) ใน lasalocid, maduramicin และ narasin ซึ่ง lasalocid มีค่า matrix effect สูงสุด 185.34% และการลดลงของสัญญาณ (signal suppression) ใน monensin และ salinomycin โดย salinomycin มีค่าต่ำสุด 62.20% และการทดสอบตัวอย่าง drug carryover มีค่า matrix effect อยู่ในช่วง 44.56 - 113.74% แสดงการกดสัญญาณใน lasalocid และ maduramicin และการเสริมสัญญาณใน narasin และ salinomycin ดังนั้นเพื่อชดเชยผลกระทบจาก matrix ลดความคลาดเคลื่อน และเพิ่มความถูกต้องของผลการทดสอบในตัวอย่างจริง จึงควรใช้วิธี matrix-matched calibration

ตารางที่ 37 Calibration curve parameters and matrix effects of ionophores compounds for homogeneity

Compounds	Slope		Intercept		*r*		Matrix effect
	Std solution calibration curve	Matrix matching calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix matching calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix matching calibration curve	
Lasalocid	464.030	860.043	2831.226	10577.468	0.9992	0.9980	185.34
Maduramicin	954.266	1246.053	6532.853	11867.505	0.9990	0.9982	130.58
Monensin	951.209	759.842	9388.570	6997.715	0.9984	0.9979	79.88
Narasin	178.393	224.369	1957.22	2468.282	0.9987	0.9985	125.77
Salinomycin	532.701	331.341	5671.664	3327.717	0.9979	0.9977	62.20

ตารางที่ 38 Calibration curve parameters and matrix effects of ionophores compounds for drug carryover

Compounds	Slope		Intercept		*r*		Matrix effect
	Std solution calibration curve	Matrix matching calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix matching calibration curve	Std solution calibration curve	Matrix matching calibration curve	
Lasalocid	16250.624	7241.804	5520.823	855.307	0.9972	0.9973	44.56
Maduramicin	39132.178	21978.159	7711.453	3523.545	0.9982	0.9977	56.16
Monensin	19431.440	13669.546	5112.119	4707.093	0.9972	0.9973	70.35
Narasin	5650.920	6427.479	1723.248	659.142	0.9953	0.9996	113.74
Salinomycin	6213.559	6248.054	1550.684	2979.892	0.9994	0.9983	100.56

5.7 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม ionophores ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง blank matrix, standard solution และตัวอย่าง blank matrix ที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า blank matrix ไม่ปรากฏสัญญาณรบกวนที่ retention time ของสารเป้าหมาย ขณะที่ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานพบ peak ของสารแต่ละชนิดที่ retention time สอดคล้องกับ standard solution และตรวจพบทั้ง quantifier และ qualifier transition ตามที่กำหนด นอกจากนี้ การทดสอบสารแต่ละชนิดแยกกันไม่พบสัญญาณรบกวนจากสาร ionophores ชนิดอื่น (ตารางที่ 39 และ 40)

ตารางที่ 39 ผลการเปรียบเทียบ Retention time และ MRM transitions ของสารกลุ่ม ionophores ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างอาหารสัตว์ที่เติมสารมาตรฐาน

Compounds	RT standard (min)	RT matrix + standard (min)	Quantifier transition	Qualifier transition	ผล
Lasalocid	2.60	2.60	พบ	พบ	ผ่าน
Maduramicin	3.41	3.41	พบ	พบ	ผ่าน
Monensin	3.00	3.00	พบ	พบ	ผ่าน
Narasin	3.18	3.18	พบ	พบ	ผ่าน
Salinomycin	2.87	2.87	พบ	พบ	ผ่าน

ตารางที่ 40 ผลการทดสอบการรบกวนระหว่างสารกลุ่ม ionophores (Cross-interference) ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

MRM	Lasalocid	Maduramicin	Monensin	Narasin	Salinomycin
Lasalocid	✓	-	-	-	-
Maduramicin	-	✓	-	-	-
Monensin	-	-	✓	-	-
Narasin	-	-	-	✓	-
Salinomycin	-	--	-	-	✓

จากตารางที่ 40 หมายความว่า เมื่อเติม lasalocid อย่างเดียว ต้องเกิด peak ที่ transition ของ lasalocid ไม่ควรเกิด peak ที่ transition ของสาร ionophores ตัวอื่นในตำแหน่งที่อาจทำให้เกิด false identification

6. สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่ม ionophores ได้แก่ lasalocid, maduramicin, monensin, narasin และ salinomycin ด้วยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry พบว่าวิธีมีความเป็นเส้นตรง โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของการทดสอบ homogeneity และ drug carryover อยู่ในช่วง 0.9983 - 0.9999 และ 0.9972 - 0.9991 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ r ≥ 0.995 และมีช่วงการใช้งานที่เหมาะสม โดยการทดสอบ homogeneity ที่ช่วง 10 - 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม %RSD 0.67 - 6.60% และ %recovery 87.30 - 105.40% การทดสอบ drug carryover ที่ช่วง 0.4 - 4.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม %RSD 2.61 - 10.82% และ %recovery 90.00 - 103.33% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด นอกจากนี้ การประเมิน accuracy ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 94.59 - 105.39% สำหรับ homogeneity และ 85.95 - 103.33% สำหรับ drug carryover precision ให้ค่า repeatability และ intermediate precision อยู่ภายในเกณฑ์การยอมรับทั้งสองการทดสอบ สะท้อนว่าวิธีมีความถูกต้องและความเที่ยงสำหรับการทดสอบสารกลุ่ม ionophores ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา

การศึกษา limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) พบว่าการทดสอบ homogeneity มีค่า LOD 1.2 - 1.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ 9.17 - 9.91 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และการทดสอบ drug carryover มีค่า LOD 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ 0.36 - 0.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงถึงความสามารถของวิธีในการตรวจวัดสารในระดับความเข้มข้นต่ำ ขณะที่การศึกษา matrix effect พบว่าองค์ประกอบของตัวอย่างมีผลต่อการตอบสนองของสัญญาณทั้งในลักษณะ signal enhancement และ signal suppression จึงควรใช้ matrix-matched calibration หรือ matrix-fortified calibration เพื่อชดเชยผลกระทบดังกล่าวและเพิ่มความถูกต้องของการวิเคราะห์ สำหรับการทดสอบ specificity ไม่พบสัญญาณรบกวนจาก blank matrix ที่ retention time ของสารเป้าหมาย และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานให้ retention time และ MRM transitions สอดคล้องกับสารมาตรฐาน รวมทั้งไม่พบ cross - interference ระหว่างสาร ionophores แต่ละชนิด ผลการศึกษาทั้งหมดจึงแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบมีความเป็นเส้นตรง ความถูกต้อง ความเที่ยง ความไว และความจำเพาะเจาะจงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ทดสอบสารกลุ่ม ionophores ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาเพื่อประเมิน homogeneity และ drug carryover ภายใต้เงื่อนไขของการศึกษานี้

7. ข้อเสนอแนะ

7.1 ควรนำวิธีทดสอบที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้แล้วไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยาจริง เพื่อประเมิน homogeneity และ drug carryover ในการปฏิบัติงาน และติดตามประสิทธิภาพของวิธีเมื่อใช้งานกับตัวอย่างที่มีลักษณะของ matrix แตกต่างกัน

7.2 ควรใช้ matrix-matched calibration หรือ matrix-fortified calibration ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง เนื่องจากผลการศึกษาพบว่าองค์ประกอบของตัวอย่างอาหารสัตว์มีผลต่อการตอบสนองของสัญญาณทั้งในลักษณะ signal enhancement และ signal suppression ซึ่งอาจส่งผลต่อความถูกต้องของผลการทดสอบ

7.3 ควรศึกษาความใช้ได้ของวิธีเพิ่มเติมกับตัวอย่างอาหารสัตว์ที่มีสูตรและองค์ประกอบของ matrix แตกต่างกัน เช่น อาหารสุกร อาหารไก่ หรืออาหารสัตว์ที่มีวัตถุดิบแตกต่างกัน เพื่อยืนยันความสามารถในการนำวิธีไปใช้ได้อย่างครอบคลุมมากขึ้น

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2569 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

AOAC (2019). AOAC Guidelines for Standard Method Performance Requirements Official Methods for Analysis. 21st Ed. Appendix, AOAC INTERNATIION. p. 1-17.

Artun Y., A. OZCAN., M. Yilmaz KARACA., Determination of Erythromycin, Spiramycin, Tilmicosin and Tylosin in Animal Feedingstuffs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, 2013.

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.

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

Robin S. Readnour, 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

U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2005). Guidance for Industry #135: Validation of Analytical Procedures for Type C Medicated Feeds [PDF document]. Retrieved from https://fda.report/media/70019/CVM-GFI--135-Validation-of-Analytical-Procedures-for-Type-C-Medicated-Feeds.pdf.