การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยวิธี LC-MS/MS

อรอุมา ปีนถา พัชยา เชื้อศรีศิริ วรวุธ วุฒศรี ธารา ทิพมาน วราภรณ์ รักษาพล

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS ได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ โดยออกแบบและดำเนินการตามแนวทางของ Commission Implementing Regulation (CIR) (EU) 2021/808 ซึ่งสามารถยืนยันชนิดและหาปริมาณของสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazoles จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ Dimetridazole (DMZ), Ronidazole (RNZ), 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI) (เป็น hydroxyl metabolites ของสารตกค้าง Dimetridazole และ Ronidazole), Ipronidazole (IPZ), Ipronidazole-hydroxy (IPZ-OH) เป็น hydroxy metabolites ของสารตกค้าง Ipronidazole), Metronidazole (MNZ) และ Metronidazole-hydroxy (MNZ-OH) (เป็น hydroxyl metabolites ของสารตกค้างMetronidazole) ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งานที่มีความเป็นเส้นตรงผ่านเกณฑ์การยอมรับ อยู่ในช่วง 0 – 2.0 µg/kg (สำหรับสาร DMZ, RNZ, IPZ, IPZ-OH, MNZ, และ MNZ-OH) และ 0 – 4.0 µg/kg (สำหรับสาร HMMNI) วิธีวิเคราะห์มีความไวเพียงพอที่จะวัดปริมาณสารแต่ละชนิดตามค่าเกณฑ์การตัดสินผลทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (CCα) ของสาร DMZ, RNZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ, และ MNZ-OH เท่ากับ 0.22, 0.21, 0.42, 0.22, 0.22, 0.22 และ 0.21 µg/kg ตามลำดับ ค่าความแม่นและความเที่ยง ผ่านตามเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของ CIR (EU) 2021/808 สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและหาปริมาณของสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ทั้ง 7 ชนิดในไข่บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

คำสำคัญ: การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Nitroimidazoles ไข่ LC-MS/MS

งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์
สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Validation of Confirmatory Method for Nitroimidazoles Residues in Egg by LC-MS/MS

Onuma Peenta Phatchaya Chueasrisiri Worrawut Wuttasri Tara Tipman Varaporn Raksaphon

Abstract

The confirmatory method for nitroimidazoles residue in egg by LC-MS/MS was validated according to Commission Implementing Regulation (CIR) (EU) 2021/808 which could identify and quantify seven compounds of nitroimidazoles including Dimetridazole (DMZ), Ronidazole (RNZ), 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI) (hydroxyl metabolites of Dimetridazole and Ronidazole), Ipronidazole (IPZ), Ipronidazole-hydroxy (IPZ-OH) (hydroxy metabolites of Ipronidazole), Metronidazole (MNZ) and Metronidazole-hydroxy (MNZ-OH) (hydroxyl metabolites of Metronidazole). The working range which linearity is in the acceptable criteria are as range of 0–2.0 µg/kg for DMZ, RNZ, IPZ, IPZ-OH, MNZ, and MNZ-OH, and 0–4.0 µg/kg for HMMNI. The decision limit (CCα) of the method at 99% confidence level for DMZ, RNZ, HMMNI, IPZ, IPZ-OH, MNZ and MNZ-OH were 0.22, 0.21, 0.42, 0.22, 0.22, 0.22 and 0.21 µg/kg, respectively. The accuracy and precision of seven compounds were satisfied according to CIR (EU) 2021/808 criteria. In conclusion, the method is suitable for identify and quantity seven nitroimidazoles residues in egg, which fulfils the objective of this experiment.

Keywords: Method Validation, Nitroimidazole, Egg, LC-MS/MS

Veterinary Drug and Hormone Residue Analysis Laboratory,
Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of livestock Products, Department of Livestock Development

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยวิธี LC-MS/MS

อรอุมา ปีนถา พัชยา เชื้อศรีศิริ วรวุธ วุฒศรี ธารา ทิพมาน วราภรณ์ รักษาพล

บทนำ

สารกลุ่ม Nitroimidazoles เป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ในอดีตมีการนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อบางชนิดในสัตว์ เช่น Histomoniasis และ Coccidiosis ในสัตว์ปีก, Trichomoniasis ในโค กระบือ และ haemorrhagic enteritis ในสุกร ซึ่งต้องสงสัยว่ามีคุณสมบัติในการก่อมะเร็ง(carcinogenic) และก่อการกลายพันธุ์ (mutagenic) (BVL, NIIM_009., 2019) สหภาพยุโรป (Commission Delegated Regulation(EU) 2022/1644) จึงได้จัดให้สารกลุ่ม Nitroimidazoles อยู่ในกลุ่ม A2(c) ซึ่งเป็นสารต้องห้าม (Prohibited substances) ไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในสัตว์ที่ผลิตอาหาร และประกาศกรมปศุสัตว์ไม่กำหนดค่า MRL ในไข่ ดังนั้นจึงห้ามพบสารตกค้างยาสัตว์ (Zero Tolerance)

สำหรับวิธีทดสอบนี้สารกลุ่ม Nitroimidazoles จะถูกสกัดออกมาจากไข่ ด้วย Ethyl acetate จากนั้นนำสิ่งสกัดมาระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน เติม Hydrochloric acid และกำจัดไขมันด้วย Hexane จากนั้นนำสิ่งสกัดมา clean up โดยใช้เทคนิค Solid Phase Extraction (SPE) ด้วย cartridge ชนิด Strong cation exchange เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก (interfere) ที่อาจรบกวนผลการทดสอบ จากนั้นนำสิ่งสกัดไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน เติม 0.05% Formic acid แล้วนำสิ่งสกัดไปวิเคราะห์แยกสารโดยใช้ HPLC คอลัมน์ ชนิด C18 และตรวจวิเคราะห์ชนิด และปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer ESI positive MRM mode

1.วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS รวมทั้งยืนยันว่าวิธีมีความเหมาะสมว่ามีสมรรถนะดีพอ เหมาะสมกับการใช้งาน (Fitness for purpose) สามารถตรวจสารตกค้างยาสัตว์ได้ต่ำกว่า Minimum Method Performance Requirements (MMPR) (หรือต่ำกว่าอย่างน้อยครึ่งหนึ่งของ MMPR) และผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808

2.ขอบข่าย

ครอบคลุมการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 7 สาร ได้แก่ Dimetridazole (DMZ), Ronidazole (RNZ), 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI) (เป็น hydroxyl metabolites ของสารตกค้าง

Dimetridazole และ Ronidazole), Ipronidazole (IPZ), Ipronidazole-hydroxy (IPZ-OH) เป็น hydroxy metabolites ของสารตกค้าง Ipronidazole), Metronidazole (MNZ) และ Metronidazole-hydroxy (MNZ-OH) (เป็น hydroxyl metabolites ของสารตกค้าง Metronidazole) ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808

3.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธียืนยัน และผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป CIR(EU) 2021/808

2. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้แล้วไปใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมต่างๆ ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

4.วิธีดำเนินการ

4.1. ตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบอิเล็กโทรสเปรย์ (ESI+) โดยรายละเอียดของสาร Nitroimidazoles ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดของสารตกค้างยาสัตว์ Nitroimidazoles สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ SCIEX รุ่น API 4000 (DLD5) และ รุ่น Tripple quad 6500+ (DLD12)

ลำดับ	ชื่อสาร		ชื่อย่อ	Molecular Weight (g/mol)	LC-MS/MS (DLD5)			Rt (min.)	LC-MS/MS (DLD12)			Rt (min.)
					Precursor ion	Product ion			Precursor ion	Product ion		
						1°	2°			1°	2°	
1	Standard	Dimetridazole	DMZ	141.13	142.15	95.90	81.10	7.08	142.00	96.10	81.20	7.03
2		Metronidazole	MNZ	171.15	172.25	128.05	82.15	5.57	172.00	128.00	82.10	5.56
3		Metronidazole-hydroxy	MNZ-OH	187.15	188.30	125.95	122.95	4.61	188.00	126.20	123.20	4.66
4		Ronidazole	RNZ	200.15	201.23	140.10	55.16	5.75	201.00	140.20	54.90	5.73
5		HMMNI	HMMNI	157.10	158.00	143.10	55.10	5.38	158.00	140.20	55.30	5.40
6		Ipronidazole	IPZ	169.18	170.25	124.10	109.20	9.58	170.00	124.10	109.10	9.47
7		Ipronidazole-hydroxy	IPZ-OH	185.18	186.27	168.15	122.00	7.67	186.20	168.10	122.00	7.59
8	Internal Standard	Dimetridazole-D_3	DMZ-D_3	144.15	145.15	-	99.10	7.05	144.90	-	99.30	6.98
9		Metronidazole-$^{13}C_2$, $^{15}N_2$	MNZ-$^{13}C_2$, $^{15}N_2$	175.12	176.10	-	132.00	5.54	175.25	-	131.20	5.53
10		Metronidazole-OH-D_2	MNZ-OH-D_2	189.17	190.30	-	127.95	4.58	190.00	-	128.00	4.63
11		Ronidazole-D_3	RNZ-D_3	203.17	204.23	-	143.10	5.73	204.10	-	143.10	5.70
12		HMMNI-D_3	HMMNI-D_3	160.15	161.30	-	143.10	5.36	160.90	-	143.10	5.37
13		Ipronidazole-D_3	IPZ-D_3	172.18	173.25	-	127.15	9.56	173.10	-	127.20	9.44
14		Ipronidazole-OH-D_3	IPZ-OH-D_3	188.20	189.26	-	171.15	7.65	189.10	-	171.20	7.56

4.2. สารเคมี สารมาตรฐาน และวัสดุอุปกรณ์ ดังนี้

4.2.1 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ Acetonitrile (ACN), Formic acid และ Deionized water

4.2.2 สารเคมีเกรด AR หรือ reagent ได้แก่ Ethanol, Ethyl acetate, Methanol, Hydrochloric acid, Ammonia และ Hexane

4.2.3 สารมาตรฐาน และ Internal standard ของสารตกค้าง 7 สาร มีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 95%

4.2.4 Strong Cation Exchange SPE Cartridge 150 mg/6 ml

4.2.5 Centrifuge tube ขนาด 50 ml

4.2.6 Pasteur pipette ขนาด 150 mm

4.2.7 Vial สีชาพร้อม insert และฝา crimp cap ขนาด 400 µl

4.2.8 Filter Nylon ขนาด 0.2 µm และ PVDF ขนาด 0.2 µm

4.2.9 HPLC Columns: ยี่ห้อ Agilent รุ่น ZORBAX ชนิด SB-C18 ขนาด Diameter 4.6 mm, Length 150 mm, Particle size 3 µm

4.2.10 เครื่องมือและอุปกรณ์ ดังนี้ เครื่อง LC-MS/MS ซึ่งประกอบด้วย

4.2.10.1. HPLC: Pump, Degasser, Autosampler, Column oven, Controller ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 20 A series (DLD5) และ HPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 40 A series (DLD12)

4.2.10.2. Detector: Triple Quadrupole Mass Spectrometer detector ยี่ห้อSCIEX รุ่น API 4000 (DLD5) ยี่ห้อ SCIEX รุ่น Triple quad 6500+ (DLD12)

4.3. เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ SCIEX รุ่น API 4000 (DLD5) และ รุ่น Triple quad 6500+ (DLD12) ได้สภาวะที่เหมาะสม ดังนี้

4.3.1 HPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 20 A series, Detector ยี่ห้อ SCIEX รุ่น API 4000 (DLD5)

4.3.1.1 HPLC conditions

- Columns: ยี่ห้อ Agilent รุ่น ZORBAX ชนิด SB-C18 ขนาด Diameter 4.6 mm, Length 150 mm, Particle size 3 µm
- Flow rate: 0.6 ml/min
- Injection volume: 25 µl
- Run time: 13 min
- Mobile phase: Line A: Deionized water
  Line B: Acetonitrile

ตารางที่ 2 LC gradient schedule

Step	Total time (min)	Flow rate (ml/min)	Mobile phase Line A (%)	Mobile Phase Line B (%)
1	0.00	0.6	90	10
2	4.00	0.6	70	30
3	6.00	0.6	60	40
4	8.00	0.6	5	95
5	10.00	0.6	5	95
6	10.50	0.6	90	10
7	13.00	0.6	90	10

4.3.1.2 Mass Spectrometer method properties

Period : 1
Duration : 13.027 min
Cycle time : 1.5602 secs
Delay time : 0.0 secs
Scan type : MRM
Polarity : Positive
Resolution Q1 : UNIT
Resolution Q3 : UNIT
Intensity Threshold : 0 cps
MCA : No
Gas 1 : 65
Gas 2 : 50
Curtain Gas (CUR) : 20
Collision Gas (CAD) : 6
Ion Spray Voltage (IS) : 5000.0
Temperature (TEM) : 500.0
Entrance potential : 10

ตารางที่ 3 Mass schedule DLD5 ยี่ห้อ SCIEX รุ่น API 4000 (DLD5)

Compound	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	Time (msec)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
DMZ	142.15	81.10	60	40	37	4
	142.15	95.90	60	40	24	5
DMZ-D3	145.15	99.10	60	41	23	6
MNZ	172.25	82.15	60	35	36	4
	172.25	128.05	60	35	19	7
MNZ-$^{13}C_2$, $^{15}N_2$	176.10	132.00	60	50	20	8
MNZ-OH	188.30	122.95	60	32	14	8
	188.30	125.95	60	32	24	8
MNZ-OH-D2	190.300	127.95	60	32	24	8
RNZ	201.23	55.16	60	20	37	2
	201.23	140.10	60	20	19	8
RNZ-D3	204.23	143.10	60	16	17	8
HMMNI	158.00	55.10	60	51	29	3
	158.00	143.10	60	31	17	8
HMMNI-D3	161.30	143.10	60	31	19	10
IPZ	170.25	109.20	60	41	25	6
	170.25	124.10	60	41	25	8
IPZ-D3	173.25	127.15	60	31	27	8
IPZ-OH	186.27	122.00	60	31	33	18
	186.27	168.15	60	31	19	10
IPZ-OH-D3	189.26	171.15	60	36	19	10

4.3.2 HPLC: ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 40 A series, Detector: ยี่ห้อ SCIEX รุ่น Tripple quad 6500+ (DLD12)

4.3.2.1 HPLC conditions

- Columns: ยี่ห้อ Agilent รุ่น ZORBAX ชนิด SB-C18 ขนาด Diameter 4.6 mm, Length 150 mm, Particle size 3 µm
- Flow rate: 0.6 ml/min
- Injection volume: 5 µl
- Run time: 13 min
- Mobile phase: Line A: Deionized water
  Line B: Acetonitrile

ตารางที่ 4 LC gradient schedule

Step	Total time (min)	Flow rate (ml/min)	Mobile phase Line A (%)	Mobile Phase Line B (%)
1	0.00	0.6	90	10
2	4.00	0.6	70	30
3	6.00	0.6	60	40
4	8.00	0.6	5	95
5	10.00	0.6	5	90
6	10.50	0.6	90	10
7	13.00	0.6	90	10

4.3.2.2 Mass Spectrometer method properties

Period	:	1
Duration	:	7.294 min
Cycle time	:	1.4302 secs
Delay time	:	0.0 secs
Scan type	:	MRM
Polarity	:	Positive
Resolution Q1	:	UNIT
Resolution Q3	:	UNIT
Intensity Threshold	:	0 cps
MCA	:	No
Gas 1	:	60
Gas 2	:	60
Curtain Gas (CUR)	:	35
Collision Gas (CAD)	:	8
Ion Spray Voltage (IS)	:	5500.0
Temperature (TEM)	:	500.0
Entrance potential	:	10

ตารางที่ 5 Mass schedule ยี่ห้อ SCIEX รุ่น Tripple quad 6500+ (DLD12)

Compound	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	Time (msec)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
DMZ	142.00	81.20	60	30	35	10
	142.00	96.10	60	30	23	11
DMZ-D3	144.90	99.30	60	41	23	12
MNZ	172.00	82.10	60	30	33	15
	172.00	128.00	60	30	20	7
MNZ$^{13}C_2$,15N2	175.25	131.20	60	31	21	8
MNZ-OH	188.00	123.20	60	35	23	12
	188.00	126.00	60	35	24	8
MNZ-OH-D2	190.00	128.00	60	26	23	18
RNZ	201.00	54.90	60	20	28	6
	201.00	140.20	60	20	17	13
RNZ-D3	204.10	143.10	60	26	16	17
HMMNI	158.00	55.30	60	20	25	9
	158.00	140.20	60	20	16	9
HMMNI-D3	160.90	143.10	60	45	18	17
IPZ	170.00	109.10	60	50	25	13
	170.00	124.10	60	50	24	14
IPZ-D3	173.10	127.20	60	60	26	17
IPZ-OH	186.20	122.00	60	40	28	14
	186.20	168.10	60	40	19	15
IPZ-OH-D3	189.10	171.20	60	40	19	22

4.4. ขั้นตอนการสกัดสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS ดังนี้

Flow chart : การสกัดสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

Weigh 5.0±0.05 g in to centrifuge tube 50 ml, spike STD and IS, let stand for 10 min before extract

↓

Add 20 ml ethyl acetate, vortex ~1 min

↓

Centrifuge 9,000 rpm 5 min 4 °C, transfer supernatant to centrifuge tube 50 ml

↓

Sample repeat again with 10 ml ethyl acetate

↓

Evaporate to dryness with nitrogen 38±2 °C

↓

Reconstitute by adding 5 ml 0.1M HCl vortex ~1 min

↓

Add 10 ml n-hexane, shaking hand 50 times

↓

Centrifuge 12,000 rpm 5 min 4 °C, upper hexane layer discarded

↓

Solid Phase Extraction:	SPE, ชนิด Strong cation exchange, 6 ml
Conditioning:	5 ml MeOH
	5 ml Water

↓

Sample Loading:	Load sample

↓

Washing:	5 ml 0.1M HCl
	5 ml MeOH
	5 ml 5% NH_3 in water

↓

Elution:	5 ml 5% NH_3 in water: MeOH (20:80)

↓

Evaporate to dryness by nitrogen 38±2 °C

↓

Reconstitute the sample with 0.05% formic acid in water 400 µl

↓

Filter with nylon membrane filter 0.22 µm

↓

Inject to LC-MS/MS

4.5. ศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ เพื่อกำหนดระดับความเข้มข้นที่จะตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ พบว่าให้ผลการทดสอบแสดงตามตารางที่ 6 ซึ่ง EURLs ได้กำหนด Minimum Method Performance Requirements (MMPR) ของสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazoles ได้แก่ Dimetridazole (DMZ), Metronidazole (MNZ), Metronidazole-hydroxy (MNZ-OH), Ronidazole (RNZ), 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI), Ipronidazole (IPZ) และ Ipronidazole-hydroxy (IPZ-OH) เท่ากับ 1 µg/kg ในตัวอย่างไข่ จึงกำหนดระดับความเข้มข้นที่ต้องการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบดังแสดงในตารางที่ 7 โดยอ้างอิงจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ (Lowest calibrated level)

ตารางที่ 6 ค่า Lowest calibrated level (LCL), Molecular weight, Precursor ion และ Product ion ของสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles

ลำดับ	ชื่อสาร	ชื่อย่อ	LCL (µg/kg)	Molecular weight (g/mol)	Precursor ion	Product ion	
						1°	2°
1	Dimetridazole	DMZ	0.2	141.13	142.20	95.90	81.10
2	Metronidazole	MNZ	0.2	171.15	172.30	128.10	82.20
3	Metronidazole-hydroxy	MNZ-OH	0.2	187.15	188.30	125.90	122.90
4	Ronidazole	RNZ	0.2	200.15	201.20	140.10	55.20
5	HMMNI	HMMNI	0.4	157.10	158.00	140.10	55.10
6	Ipronidazole	IPZ	0.2	169.18	170.30	124.10	109.20
7	Ipronidazole-hydroxy	IPZ-OH	0.2	185.18	186.30	168.10	122.00

ตารางที่ 7 กำหนดระดับการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับ คือ 1 LCL, 2 LCL และ3 LCL และระดับการเติมสารมาตรฐานกลุ่ม Nitroimidazoles แยกตามชนิดสาร

ลำดับ	ชื่อสาร	ชื่อย่อ	LCL (µg/kg)	ความเข้มข้น (µg/kg)		
				1 LCL	2 LCL	3 LCL
1	Dimetridazole	DMZ	0.20	0.20	0.40	0.60
2	Metronidazole	MNZ	0.20	0.20	0.40	0.60
3	Metronidazole-hydroxy	MNZ-OH	0.20	0.20	0.40	0.60
4	Ronidazole	RNZ	0.20	0.20	0.40	0.60
5	HMMNI	HMMNI	0.40	0.40	0.80	1.20
6	Ipronidazole	IPZ	0.20	0.20	0.40	0.60
7	Ipronidazole-hydroxy	IPZ-OH	0.20	0.20	0.40	0.60

4.6. ดำเนินการตามแนวทางของมาตรฐานสากลสหภาพยุโรป Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 โดยกำหนดพารามิเตอร์ที่จะตรวจสอบความใช้ได้ ดังนี้

4.6.1 Identification

4.6.1.1 Identification points (IP)

4.6.1.2 Retention Time (Rt) / Relative Retention Time (RRt)

4.6.1.3 Signal-to noise (S/N) ratio

5.1.4 Ion ratio

4.6.2 Quantification

4.6.2.1 Calibration curves (Linearity และ Working range)

4.6.2.2 Trueness (Accuracy)

4.6.2.3 Precision (Repeatability และ Within-laboratory reproducibility)

4.6.2.4 MDL & MQL

4.6.2.5 CCα

4.6.3 Selectivity/ Specificity

4.6.4 Ruggedness

4.6.5 Relative matrix effects

4.6.6 Stability in solution and matrix

4.7. วิธีดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

4.7.1 เตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจำนวน 21 ตัวอย่าง

4.7.2 เตรียมตัวอย่างไข่ไก่ 1 ตัวอย่าง สำหรับทำ Standard matrix calibration curve 6 ระดับ ระดับละ 1 หลอดโดยเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 LCL, 1.0 LCL, 2.0 LCL, 4.0 LCL, 8.0 LCL และ 10.0 LCL ตามตารางที่ 8

4.7.3 เตรียม Reagent Blank (RB) 1 หลอด

4.7.4 เตรียมตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับความเข้มข้นที่สนใจ คือ 0.0 LCL, 1.0 LCL, 2.0 LCL และ 3.0 LCL ระดับละ 7 หลอด โดยแต่ละหลอดเป็นตัวอย่างที่แตกต่างกัน (4 ระดับ x 7 หลอด = 28 หลอด) ในที่นี้คือ กำหนดระดับความเข้มข้น Group 1 ที่ 0.0, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 และ 2.00 µg/kg ระดับความเข้มข้น Group 2 ที่ 0.0, 0.40, 0.80, 1.60, 3.20 และ 4.00 µg/kg ตามตารางที่ 8

4.7.5 ทำการทดสอบตามวิธีทดสอบสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

ตารางที่ 8 การเติมสารละลายมาตรฐาน (Standard และ Internal standard) กลุ่ม Nitroimidazoles ลงในตัวอย่างไข่ 5 กรัม

หลอดที่	ชุดการทดสอบ	น้ำหนักตัวอย่าง 5.00 ± 0.05 (g)	ความเข้มข้น (µg/kg)		ปริมาตร STD ที่เติม (µl)	ปริมาตร IS ที่เติม (µl)
			STD (Mixed) 6 สาร (Group 1)	STD 1 สาร (Group 2)	STD (Mixed) 7 สาร	IS (Mixed) 7 สาร
1	STD(M) 0.0 LCL	5.00	0.0	0.0	ไม่เติม	100
2	STD(M) 1.0 LCL	5.00	0.20	0.40	20	100
3	STD(M) 2.0 LCL	5.00	0.40	0.80	40	100
4	STD(M) 4.0 LCL	5.00	0.80	1.60	80	100
5	STD(M) 8.0 LCL	5.00	1.60	3.20	160	100
6	STD(M) 10.0 LCL	5.00	2.00	4.00	200	100
7	RB	-	-		ไม่เติม	ไม่เติม
8-14	Sample Blank (0.0 LCL)	5.00	0.0	0.0	ไม่เติม	100
15-21	Spike sample 1 (1.0 LCL)	5.00	0.20	0.40	20	100
22-28	Spike sample 2 (2.0 LCL)	5.00	0.40	0.80	40	100
29-35	Spike sample 3 (3.0 LCL)	5.00	0.60	1.20	60	100

หมายเหตุ: * STD (Mixed) solution 7 compounds ประกอบด้วย สารมาตรฐาน 2 กลุ่ม จำแนกตามความเข้มข้น ดังนี้

Group 1 คือ DMZ, MNZ, MNZ-OH, RNZ, IPZ และ IPZ-OH ความเข้มข้น 50 ng/ml

Group 2 คือ HMMNI ความเข้มข้น 100 ng/ml

** IS (Mixed) solution 7 compounds ประกอบด้วย สารมาตรฐาน DMZ-D_3, MNZ-$^{13}C_2$, $^{15}N_2$, MNZ-OH-D_2, RNZ-D_3, HMMNI-D_3, IPZ-D_3, และ IPZ-OH-D_3, ความเข้มข้น 100 ng /ml

4.7.6. การหาพารามิเตอร์ Identification

4.7.6.1 Identification points (IP)

คะแนน Identification points ตามเกณฑ์สหภาพยุโรป (Commission Implementing Regulation (CIR) (EU) 2021/808 of 22 March 2021) กำหนดให้สารที่ห้ามใช้ ต้องใช้วิธีที่ได้คะแนน Identification points อย่างน้อย 5 คะแนน โดยคะแนน Identification points แต่ละวิธีแสดงตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การคิดคะแนน Identification points per technique

Technique	Identification points (IP)
Separation (mode GC, LC, SFC, CE)	1
LR-MS ion	1
Precursor ion selection at <±0.5 Da mass range	1 (indirect)
LR-MS^n product ion	1.5
HR-MS ion	1.5
HR-MS^n product ion	2.5

การคำนวณ IP โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม Nitroimidazoles

LC technique = 1 IP

1 precursor ion = 1 IP

2 product ions = 3 IP (2 × 1.5 IP)

รวมทั้งหมด identification points = 5 IP ถือว่าผ่านตามเกณฑ์

4.7.6.2 Retention Time (Rt)/ Relative Retention Time (RRt)

Retention Time (Rt) ของ Peak analyte ของตัวอย่าง ต้องอยู่ในช่วง ± 0.1 min เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ย Rt ของชุด Standard calibration curve และวิธีนี้มีการใช้ Internal Standard จึงต้องคำนวณอัตราส่วนของ Rt ของ Peak analyte ต่อ Rt ของ Peak internal Standard (RRt) ซึ่งต้องอยู่ในช่วง ±1% เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ย RRt ของชุด Standard calibration curve

4.7.6.3 Signal-to-noise (S/N) ratio

อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือความสูงของพีค (peak height) ที่ได้จาก Product Ions ของสารที่สนใจกับสัญญาณรบกวน (S/N ratio) จะต้องมีค่า ≥3:1

4.7.6.4 Ion ratio

อัตราส่วนไอออนระหว่างพื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือความสูงของพีค (peak height) ของ Secondary ion (2^o) กับ Primary ion (1^o) โดยมีค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้ไม่เกิน ±40% เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ย Ion ratio ของชุด Standard calibration curve

4.7.7. คำนวณหาค่าพารามิเตอร์ Quantification

4.7.7.1 Calibration curves (Linearity และ Working range)

Linearity (r) และ Working range ของวิธีทดสอบสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC–MS/MS ซึ่งหาได้จากการวิเคราะห์ Standard matrix calibration curve 1 ตัวอย่าง 6 ระดับความเข้มข้น ระดับความเข้มข้นละ 1 หลอด ตามตารางที่ 8 แล้วนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ของโครมาโตแกรม เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r)

4.7.7.2 Trueness (Accuracy) การทดสอบนี้จะใช้ Fortified sample (Spiked sample) โดยนำตัวอย่างปลอดสารมาเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 1.0 LCL, 2.0 LCL และ 3.0 LCL ในที่นี้คือ กำหนดระดับความเข้มข้น Group 1 ที่ 0.20, 0.40 และ 0.60 µg/kg และระดับความเข้มข้น Group 2 ที่ 0.40, 0.80 และ 1.20 µg/kg โดยในแต่ละระดับความเข้มข้นทำการวิเคราะห์ 7 ตัวอย่าง แล้วคำนวณหาค่า คำนวณหาค่า % recovery โดยใช้เกณฑ์การยอมรับตาม ตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เกณฑ์การประเมิน Accuracy (Trueness) by Recovery ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป (CIR (EU) 2021/808 of 22 March 2021)

Mass fraction	Range
≤ 1 µg/kg	-50% to +20% (50-120%)
> 1 µg/kg - 10 µg/kg	-30% to +20% (70-120%)
≥ 10 µg/kg	-20% to +20% (80-120%)

4.7.7.3 Precision

1) Repeatability

เติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับเดียวกับที่ใช้หา Trueness ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 1.0 LCL, 2.0 LCL และ 3.0 LCL วิเคราะห์ระดับละ 7 ตัวอย่าง ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ ทำการวิเคราะห์คำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean), Standard Deviation (SD) และ % Coefficient of Variance (% CV) ของตัวอย่างทุกระดับความเข้มข้น โดยความเข้มข้นที่ระดับ 2.0 LCL จะคงสภาวะเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง เช่น ใช้ผู้วิเคราะห์ที่ระดับ 2.0 LCL เพียงคนเดียวทั้ง 3 ชุด คำนวณหา Overall ค่าเฉลี่ย (Mean), Standard Deviation (SD) และ % Coefficient of Variance (% CV) ของการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง โดยใช้เกณฑ์การยอมรับตาม ตารางที่ 11

2) Within-laboratory reproducibility

เติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับเดียวกับที่ใช้หา Trueness ที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 1.0 LCL, 2.0 LCL และ 3.0 LCL วิเคราะห์ระดับละ 7 ตัวอย่าง 3 ชุดการทดสอบ โดยความเข้มข้นที่ระดับ 1.0 LCL จะมีการเปลี่ยน Condition ต่างๆ ให้ได้มากที่สุด (รายละเอียดการเปลี่ยน Condition ในการทดสอบทั้ง 3 ชุดการทดสอบ ที่ระดับ 1.0 LCL ตามตารางที่ 11) เช่น เปลี่ยน Lot. สารเคมี, เปลี่ยน Matrix blank, เปลี่ยนผู้วิเคราะห์ หรือเปลี่ยน Lot. สารมาตรฐาน เป็นต้นอีกทั้งทำการเปลี่ยนเครื่อง LC-MS/MS โดยในการทดสอบชุดที่ 1 และ 2 จะทำการฉีดด้วยเครื่อง LC-MS/MS DLD12 ส่วนการทดสอบชุดที่ 3 ฉีดด้วยเครื่อง LC-MS/MS DLD5 คำนวณหา Overall ค่าเฉลี่ย (Mean), Standard Deviation (SD) และ % Coefficient of Variance (% CV) ของการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง โดยใช้เกณฑ์การยอมรับตามตารางที่ 12

ตารางที่ 11 รายละเอียดการเปลี่ยน Condition ในการทดสอบทั้ง 3 ชุดการทดสอบ ที่ระดับ 1.0 LCL

การทดสอบ	เครื่อง LC-MS/MS	สารเคมี	ยี่ห้อ	Lot
การทดสอบชุดที่ 1	DLD12	Ethyl acetate(AR)	Loba Chemie	B44899T2302
		n-Hexane (AR)	RCI Labscan	23080045
การทดสอบชุดที่ 2	DLD12	Ethyl acetate(AR)	RCI Labscan	24070363
		n-Hexane (AR)	RCI Labscan	25030227
การทดสอบชุดที่ 3	DLD5	Ethyl acetate(AR)	Scharlau	21365107
		n-Hexane (AR)	RCI Labscan	24030390

ตารางที่ 12 เกณฑ์การประเมิน Precision ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป (CIR (EU) 2021/808 of 22 March 2021)

Mass fraction	Reproducibility (% CV)	Repeatability (% CV)**
> 1000 µg/kg	16	11
> 120 - 1000 µg/kg	22	15
10 - 120 µg/kg	25*	17
< 10 µg/kg	30*	20

หมายเหตุ * เป็นเพียง Guide line และควรต่ำสุดเท่าที่จะทำได้

** Repeatability ควรเป็น 2/3 ของ reproducibility หรือต่ำกว่า และ repeatability ต้องต่ำกว่า reproducibility

4.7.7.4 MDL & MQL

นำตัวอย่างไข่ไก่ปลอดสารกลุ่ม Nitroimidazoles มาเติมสารมาตรฐานทั้ง 7 สาร ที่ระดับ 1.0 LCL โดยที่ LCL ของสาร Dimetridazole, Metronidazole, Metronidazole-hydroxy, Ronidazole, Ipronidazole และ Ipronidazole-hydroxy ที่ระดับ 1.0 LCL เท่ากับ 0.20 µg/kg ส่วน HMMNI ที่ระดับ 1.0 LCL เท่ากับ 0.40 µg/kg ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ ชุดละ 7 ตัวอย่าง รวมเป็น 21 ตัวอย่าง วิเคราะห์หาความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่าง หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อไปคำนวณค่า MDLและ MQL ดังนี้

ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจชนิดสารได้ (Minimum Detection Limit หรือ MDL)

$$MDL = t_{99\,(n-1)} \times SD \text{ (เมื่อ Degree of freedom = (n-1))}$$

ค่าต่ำสุดที่สามารถยืนยันปริมาณของสารได้ (Minimum Quantitation Limit หรือ MQL)

$$MQL = 3 \times MDL$$

4.7.7.5 Decision limit (CCα)

นำตัวอย่างไข่ไก่ปลอดสารมาเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 1.0, 2.0 และ 3.0 LCL มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่าง หาค่า SD ของ within-laboratory reproducibility ที่ระดับ LCL ไปคำนวณค่า CCα โดยที่ LCL ของสาร Dimetridazole, Metronidazole, Metronidazole-hydroxy, Ronidazole, Ipronidazole และ Ipronidazole-hydroxy ที่ระดับ 1.0 LCL เท่ากับ 0.20 µg/kg ส่วน HMMNI ที่ระดับ 1.0 LCL เท่ากับ 0.40 µg/kg

ค่าเกณฑ์การตัดสิน (Decision limit หรือ CCα)

<u>สูตรคำนวณหา CCα สำหรับ Unauthorised substance</u>

CCα = LCL + k(one-side, 99%) x (Combined) Standard Measurement Uncertainty at LCL

; k (one-side, 99%) = 2.33

; (combined) standard measurement uncertainty at LCL= SD within–lab reproducibility at LCL

4.7.8 Selectivity / Specificity

วิเคราะห์ตัวอย่างปลอดสารอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง (n≥20) จากต่างแหล่งที่มาหรือชนิดสัตว์ แล้วทดสอบว่ามี Interfere รบกวนการวิเคราะห์หรือไม่ (โดยใช้ Sample Blank 7 ตัวอย่าง จำนวน 3 ชุดทดสอบ รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง) หากวิธีทดสอบมีความจำเพาะต่อสารกลุ่ม Nitroimidazoles ต้องไม่พบสัญญาณ (Peak) ของสารมาตรฐานชนิดอื่น ขึ้นในบริเวณ Retention Time (Rt) ของสารกลุ่ม Nitroimidazoles ทั้ง 7 สาร

4.7.9 Ruggedness

ศึกษาความทนทานของวิธีทดสอบ โดยทดสอบการเปลี่ยนแปลง Condition ต่างๆ ของวิธีการทดสอบ จำนวน 3 factor และเปลี่ยนแปลงชนิดตัวอย่างของวิธีทดสอบ จำนวน 1 factor โดยเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับ 2.0 LCL เพิ่มไปในการวิเคราะห์ชุดทดสอบที่ 3 (Batch 3) จำนวน Factor ละ 2 ซ้ำ รวมทั้งหมด 8 หลอด ดังนี้

4.7.9.1 อุณหภูมิในขั้นตอน Centrifuge ทั้ง 2 รอบ เปลี่ยนจาก 4 °C เป็น 25 °C

4.7.9.2 อุณหภูมิในการระเหยแห้งทั้ง 2 ครั้ง เปลี่ยนจาก 38 °C เป็น 45 °C

4.7.9.3 Filter Nylon ขนาด 0.2 µm เปลี่ยนเป็น PVDF ขนาด 0.2 µm

4.7.9.4 ชนิดตัวอย่างไข่ไก่ เปลี่ยนเป็น ไข่เป็ด และไข่นกกระทา

โดย %Recovery และ % Coefficient of Variance (% CV; Reproducibility) ของผลการทดสอบที่ได้ต้องไม่เกิน เกณฑ์การประเมินตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป (CIR (EU) 2021/808 of 22 March 2021) ตามตารางที่ 10 และ 12

4.7.10 Stability

4.7.10.1 Stability in solution

การศึกษาความคงตัวของสารกลุ่ม Nitroimidazoles ในรูปสารละลาย อ้างอิงจาก BVL, EU and National Reference Lab, Confirmatory method for the determination of nitroimidazoles in muscle and plasma with LC-MS/MS NIIM.009.Version 2 of 30 July 2019. พบว่า ใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลายสารกลุ่ม Nitroimidazoles

1) Stock solutions เมื่อจัดเก็บที่อุณหภูมิ -20 ℃ มีความคงตัวอย่างน้อย 2 ปี

2) Standard solution

- ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/µl, 10 ng/µl และ 1 ng/µl เมื่อจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 ℃ มีความคงตัวอย่างน้อย 1 ปี (Intermediate solution)

- ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ng/µl และความเข้มข้นที่ต่ำกว่า เมื่อจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 ℃ มีความคงตัวอย่างน้อย 6 เดือน (Working solution)

3) Internal Standards ที่มีการติดฉลากไอโซโทป สามารถใช้ได้จนกว่าจะแสดงสัญญาณของการสลายตัว

4.7.10.2 Stability in matrix

4.7.10.2.1 การศึกษาความคงตัวของสารกลุ่ม Nitroimidazoles ในตัวอย่างไข่ โดยนำตัวอย่างไข่ไก่ที่ปลอดสารมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วแบ่งออกเป็น 5 ส่วน โดยที่น้ำหนักแต่ละส่วนต้องเพียงพอต่อการวิเคราะห์ตามระยะเวลาที่ต้องการศึกษาความคงทนของสารในตัวอย่างไข่ไก่ ในที่นี้อุณหภูมิและระยะเวลาที่ต้องการศึกษามีดังนี้

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

ศึกษาทั้งหมด 3 ช่วงเวลา คือ วิเคราะห์ทันที, 3 วัน และ 7 วัน ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม Nitroimidazoles ต้องใช้ตัวอย่าง 5 ± 0.05 g ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่างแต่ละส่วนจะต้องไม่น้อยกว่า 15 กรัม แล้วเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ความเข้มข้นระดับ 2.0 LCL ในที่นี้ คือ Group 1 คือ 0.40 µg/kg และ Group 2 คือ 0.80 µg/kg ทั้ง 5 ส่วน

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C

ศึกษาทั้งหมด 3 ช่วงเวลา คือ วิเคราะห์ทันที, 3 วัน และ 7 วัน ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม Nitroimidazoles ต้องใช้ตัวอย่าง 5 ± 0.05 g ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่างแต่ละส่วนจะต้องไม่น้อยกว่า 15 กรัม แล้วเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ความเข้มข้นระดับ 2.0 LCL ในที่นี้ คือ Group 1 คือ 0.40 µg/kg และ Group 2 คือ 0.80 µg/kg

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

ความคงตัวของสารกลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ไก่ อ้างอิงตาม Vokuev, M.et al. (2024). “Storage stability study of metronidazole and hydroxymetronidazole in chicken eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry.” Food Chemistry: X.25, P.1-8. พบว่า จากการศึกษาความคงตัวของ Metronidazole (MNZ) and hydroxymetronidazole (MNZ-OH) ที่วิเคราะห์ในไข่ไก่ มีความคงตัวเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 °C

4.7.10.2.2 หลังจากนั้น นำตัวอย่างปลอดสาร ที่แบ่งออกเป็น 5 ส่วน มาชั่งตามน้ำหนักที่ต้องการวิเคราะห์ คือ 5 ± 0.05 g เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารทันที จะได้ผลการวิเคราะห์ทันที 5 ข้อมูล นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่า % CV เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการแปลผล Stability

4.7.10.2.3 จากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 5 ส่วน แบ่งใส่หลอดทดลองตามน้ำหนักที่ต้องการวิเคราะห์ คือ 5 ± 0.05 g นำไปเก็บรักษาไว้ตามตามระยะเวลาที่ต้องการศึกษา ดังนี้

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ชั่งส่วนละ 3 หลอด ตามระยะเวลาที่ต้องการศึกษา ได้ทั้งหมด 15 หลอด (5 ส่วน x 3 หลอด) แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ตามระยะเวลาที่กำหนด (Short term, Mid-long term และ Long term storage)

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C ชั่งส่วนละ 3 หลอด ตามระยะเวลาที่ต้องการศึกษา ได้ทั้งหมด 15 หลอด (5 ส่วน x 3 หลอด) แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ตามระยะเวลาที่กำหนด (Short term, Mid-long term และ Long term storage)

4.7.10.2.4 เมื่อถึงเวลาที่กำหนด นำตัวอย่างที่เก็บไว้ของทั้ง 5 ส่วนออกมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย (ห้องปฏิบัติการกำหนดเองให้เป็นช่วงเวลาที่ใช้ได้จริง)

4.7.10.2.5 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารที่เหลืออยู่ (Analyte remaining (%)) โดยเทียบกับผลวิเคราะห์ของตัวอย่างที่เตรียมใหม่ๆ

ตามสูตร Analyte remaining (%) = $C_i \times 100/C_{fresh}$

$C_{i(n=5)}$ = ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่วิเคราะได้ ณ.เวลาที่ต้องการศึกษา

$C_{fresh(n=5)}$ = ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่วิเคราะทันที

โดยความเข้มข้นของสารที่เหลืออยู่ (% Analyte remaining) ที่คำนวณได้แต่ละช่วงเวลา เมื่อเทียบกับความเข้มข้นในตัวอย่างที่วิเคราะห์ทันที ผลต่างของความเข้มข้นที่ได้ ($\%_{diff}$) ต้องไม่เกิน % CV Within–lab reproducibility ($\%CV_{wLR}$) ที่ได้จากผล validation

ตารางที่ 13 แผนการทดลองเพื่อศึกษาความเสถียรของสารในตัวอย่างไข่ไก่ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 25 °C

ระยะเวลาการเก็บ		หลอดที่				
		ส่วน 1	ส่วน 2	ส่วน 3	ส่วน 4	ส่วน 5
วิเคราะห์ทันที		1/1	2/1	3/1	4/1	5/1
4 °C	3 วัน	1/2	2/2	3/2	4/2	5/2
	7 วัน	1/3	2/3	3/3	4/3	5/3
25 °C	3 วัน	1/4	2/4	3/4	4/4	5/4
	7 วัน	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5

4.7.11 Relative matrix effects

4.7.11.1 วิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่ปลอดสารอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง จากต่างแหล่งที่มา (โดยที่ตัวอย่างไม่ซ้ำกับ 3 ชุดทดสอบที่ผ่านมา)

4.7.11.2 ทำการสกัดตัวอย่างปลอดสารในหัวข้อ 6.11.1 จนถึงขั้นตอนก่อน Make volume แล้วเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับ 2.0 LCL (ในที่นี้คือระดับความเข้มข้น Group 1 ที่ 0.40 µg/kg, Group 2 ที่ 0.80 µg/kg) และ Internal Standard แล้วจึง Make volume ด้วย Reconstitute Solution ปริมาตร 400 µl โดยมีการวิเคราะห์ Standard solution ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันควบคู่ไปด้วย จำนวน 1 หลอด คำนวณหา Overall ค่าเฉลี่ย (Mean), Standard Deviation (SD) และ % Coefficient of Variance (% CV) ของ MF (Standard normalized for IS) โดย % Coefficient of Variance (% CV) ของ MF (Standard normalized for IS) ไม่เกิน %CV ของ Reproducibility ตามตารางที่ 12

5. ผลการทดลอง

5.1 Identification

5.1.1 Identification points (IP)

การคำนวณ IP โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ในการวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles

LC technique	= 1 IP
1 precursor ion	= 1 IP
2 product ions	= 3 IP (2 × 1.5 IP)

รวมทั้งหมด Identification points = 5 IP ถือว่าผ่านตามเกณฑ์

5.1.2 Retention Time (Rt) / Relative Retention Time (RRt) และ Ion ratio

ตารางที่ 12 แสดงค่า Rt (min), RRt, Ion ratio และ S/N (Secondary ion)

Analyte	Conc. (µg/kg)	Rt (±0.10 min)		RRt (±1%)		% Ion ratio (± 40%)		S/N ≥3
		ช่วงเกณฑ์การยอมรับ	ช่วงผลที่ได้	ช่วงเกณฑ์การยอมรับ	ช่วงผลที่ได้	ช่วงเกณฑ์การยอมรับ	ช่วงผลที่ได้	ช่วงผลที่ได้
DMZ	0.2	6.88-7.18	6.97-7.10	1.004-1.016	0.994-1.007	16.55-39.94	25.00-30.42	17.1-34
	0.4	6.88-7.18	6.97-7.10	1.004-1.016	0.994-1.007	16.55-39.94	26.07-28.86	37.7-68.7
	0.6	6.88-7.18	6.97-7.10	1.004-1.016	0.994-1.007	16.55-39.94	24.92-29.20	59.7-122.3
MNZ	0.2	5.39-5.68	5.47-5.60	0.994-1.015	1.002-1.005	23.28-56.53	35.99-43.77	127.5-245
	0.4	5.39-5.68	5.47-5.59	0.994-1.015	1.002-1.005	23.28-56.53	36.15-42.24	204.1-436.3
	0.6	5.39-5.68	5.48-5.60	0.994-1.015	1.002-1.005	23.28-56.53	36.99-43.20	442.5-825.7
MNZ-OH	0.2	4.43-4.77	4.51-4.69	0.994-1.015	1.002-1.007	44.41-133.78	69.51-96.85	50.8-254.9
	0.4	4.43-4.77	4.52-4.68	0.994-1.015	1.002-1.007	44.41-133.78	66.40-97.52	110.5-831.6
	0.6	4.43-4.77	4.51-4.69	0.994-1.015	1.002-1.007	44.41-133.78	69.17-98.87	104.9-1813.1
RNZ	0.2	5.55-5.85	5.63-5.77	0.993-1.015	1.002-1.005	7.66-19.49	11.59-15.95	7.5-42.9
	0.4	5.55-5.85	5.64-5.77	0.993-1.015	1.002-1.007	7.66-19.49	11.29-14.72	20.3-120.7
	0.6	5.55-5.85	5.63-5.77	0.993-1.015	1.002-1.005	7.66-19.49	12.51-15.16	28.8-197.5
HMMNI	0.4	5.20-5.51	5.28-5.44	0.993-1.015	1.002-1.006	9.42-29.66	14.91-21.16	14.2-156.4
	0.8	5.20-5.51	5.28-5.43	0.993-1.015	1.002-1.006	9.42-29.66	15.25-22.19	25.7-344.4
	1.2	5.20-5.51	5.29-5.43	0.993-1.015	1.002-1.006	9.42-29.66	15.05-21.78	53.8-443
IPZ	0.2	9.36-9.63	9.44-9.53	0.991-1.013	1.001-1.003	23.82-58.72	36.29-45.00	9.3-661
	0.4	9.36-9.63	9.42-9.53	0.991-1.013	1.001-1.003	23.82-58.72	35.92-44.74	22.5-191.3
	0.6	9.36-9.63	9.43-9.54	0.991-1.013	1.001-1.003	23.82-58.72	35.69-42.92	34.4-547.5
IPZ-OH	0.2	7.50-7.75	7.59-7.68	0.993-1.014	1.003-1.005	7.74-47.67	11.55-37.88	51.3-145.1
	0.4	7.50-7.75	7.58-7.67	0.993-1.014	1.001-1.005	7.74-47.67	12.72-36.67	99.3-411.2
	0.6	7.50-7.75	7.58-7.67	0.993-1.014	1.003-1.005	7.74-47.67	12.18-38.38	137.5-346.1

ดังนั้น จากผลการทดสอบสรุปได้ว่า ค่าพารามิเตอร์ (Identification) Retention Time (Rt), Relative Retention Time (RRt) และ Ion ratio ที่ได้จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากลของสหภาพยุโรป (CIR (EU) 2021/808 of 22 March 2021)

5.2. Quantification

5.2.1 Linearity และ Working range

Linearity (r) และ Working range ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles โดยเทคนิค LC-MS/MS ในไข่ ซึ่งหาได้จากการวิเคราะห์ Standard matrix calibration curve จำนวน 1 ตัวอย่าง ความเข้มข้น 6 ระดับ ระดับละ 1 หลอด ดังนี้ 0.0 LCL, 1.0 LCL, 2.0 LCL, 4.0 LCL, 8.0 LCL และ 10.0 LCL แล้วนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้ peak เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) โดยวิธีทดสอบนี้มีค่า $r > 0.995$ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ และมีช่วงการใช้งาน (Working range) อย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้นที่มีระยะห่างเป็นลำดับขั้น โดยรวม Zero level (สหภาพยุโรป (CIR (EU) 2021/808 of 22 March 2021) ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงค่า ค่า Correlation coefficient (r), linearity และ working range ของวิธีทดสอบสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่

Compounds	Linearity (1°) (Correlative coefficient; r) เกณฑ์การยอมรับ r ≥ 0.995			Linearity (µg/kg)	Working range (µg/kg)
	Batch 1	Batch 2	Batch 3		
DMZ	0.9997	0.9996	0.9995	0.20 – 2.00	0.20 – 1.60
MNZ	0.9993	0.9986	0.9998	0.20 – 2.00	0.20 – 1.60
MNZ-OH	1.0000	0.9992	0.9999	0.20 – 2.00	0.20 – 1.60
RNZ	0.9997	0.9991	0.9997	0.20 – 2.00	0.20 – 1.60
HMMNI	0.9997	0.9999	0.9999	0.40 – 4.00	0.20 – 1.60
IPZ	0.9993	0.9991	0.9997	0.20 – 2.00	0.20 – 1.60
IPZ-OH	0.9996	0.9973	0.9998	0.20 – 2.00	0.20 – 1.60

5.2.2 CCα, MDL, MQL, Trueness (Accuracy) และ Precision (Repeatability และ Within-laboratory reproducibility)

5.2.2.1 วิเคราะห์ตัวอย่าง Sample blank ที่เติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ระดับความเข้มข้นที่ใช้ คือ ระดับ 1 LCL, 2 LCL และ 3 LCL ระดับความเข้มข้นละ 7 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ 3 ชุดการทดสอบ ไม่ซ้ำวัน วิเคราะห์หาความเข้มข้นและคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของแต่ละตัวอย่าง ผ่านเกณฑ์การยอมรับของสหภาพยุโรป (CIR (EU) 2021/808) ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ค่า CCα, MDL, MQL, Trueness, Repeatability (%CV) และ Within-laboratory Reproducibility (%CV) ของสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่โดยเทคนิค LC-MS/MS

Compound	MDL (µg/kg)	MQL (µg/kg)	CCα (µg/kg)	Concentration (µg/kg)	Trueness (%Recovery)	Repeatability (%CV)	Within-laboratory Reproducibility (%CV)
DMZ	0.02	0.05	0.22	0.2	98.81	2.63	3.36
				0.4	99.17	1.56	1.70
				0.6	99.44	0.73	0.84
MNZ	0.02	0.07	0.22	0.2	99.76	3.46	3.81
				0.4	99.52	1.93	1.98
				0.6	100.24	1.34	1.37
MNZ-OH	0.01	0.03	0.21	0.2	98.57	2.39	2.45
				0.4	99.40	1.85	1.96
				0.6	99.37	1.10	1.13
RNZ	0.01	0.04	0.21	0.2	100.71	2.50	2.98
				0.4	99.17	1.88	2.06
				0.6	99.76	1.23	1.25

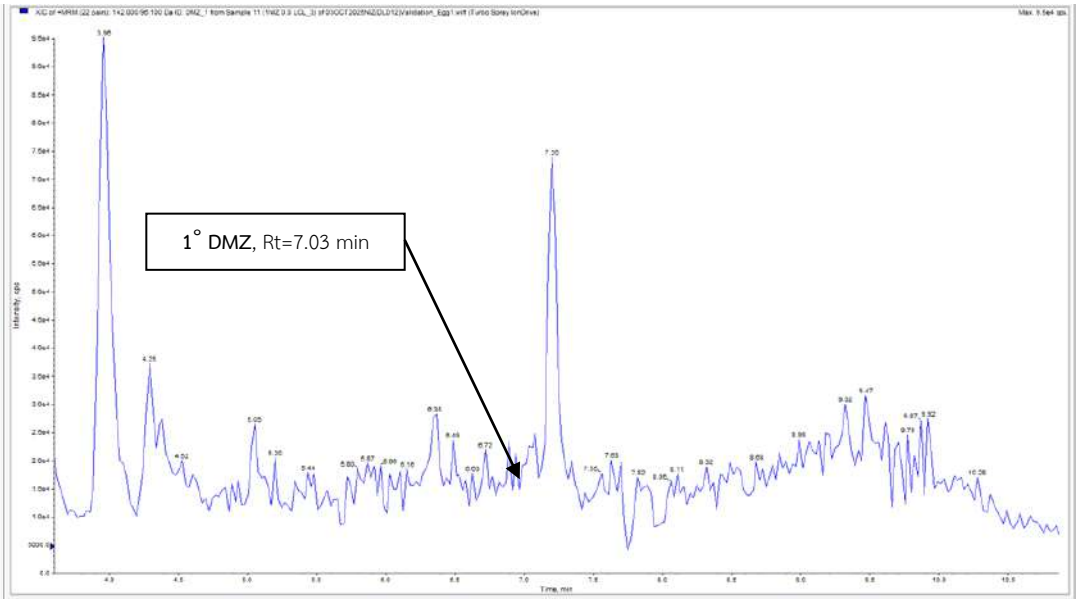
ตารางที่ 14 (ต่อ) ค่า CCα, MDL, MQL, Trueness, Repeatability (%CV) และ Within-laboratory Reproducibility (%CV) ของสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่โดยเทคนิค LC-MS/MS

Compound	MDL (µg/kg)	MQL (µg/kg)	CCα (µg/kg)	Concentration (µg/kg)	Trueness (%Recovery)	Repeatability (%CV)	Within-laboratory Reproducibility (%CV)
HMMNI	0.02	0.06	0.42	0.4	99.88	1.67	1.93
				0.8	99.94	0.61	0.63
				1.2	99.92	0.53	0.53
IPZ	0.02	0.05	0.22	0.2	100.24	4.22	4.49
				0.4	100.61	1.85	2.36
				0.6	99.68	1.94	2.05
IPZ-OH	0.02	0.06	0.22	0.2	99.52	3.58	4.40
				0.4	100.12	3.22	3.33
				0.6	99.60	1.05	1.22

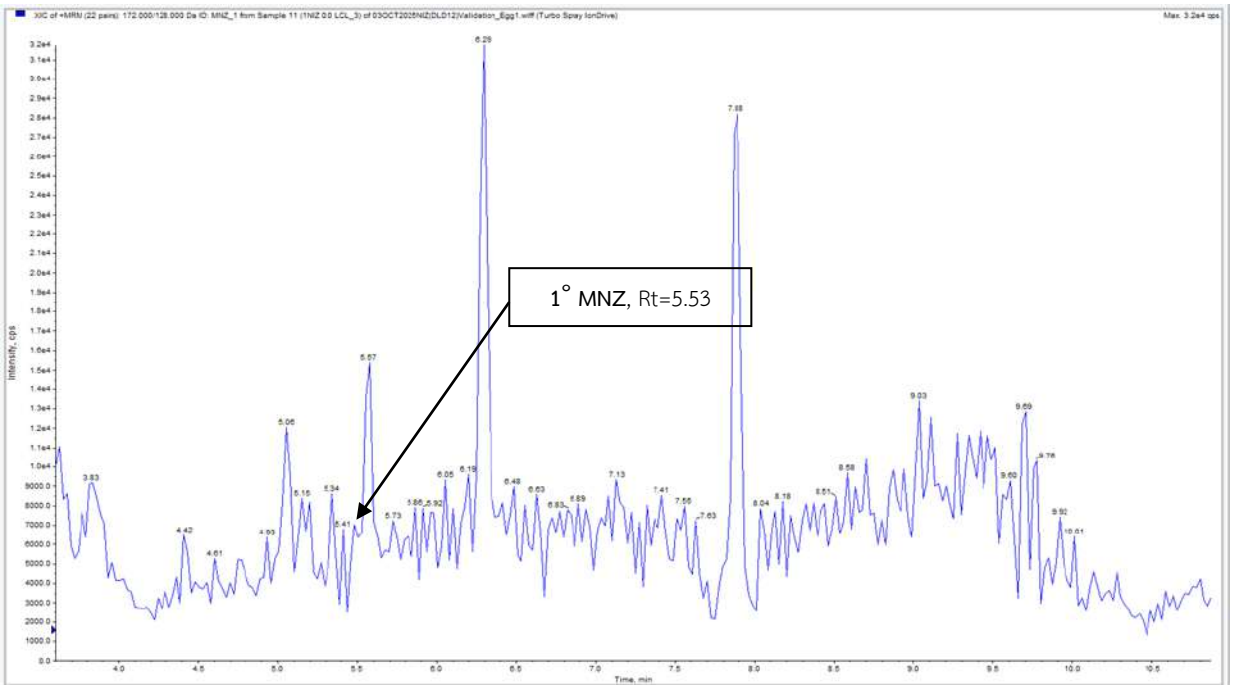
จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC–MS/MS) ค่า CCα, Trueness, Repeatability (%CV) และ Within-laboratory Reproducibility (%CV) ผ่านเกณฑ์การประเมินที่กำหนดขึ้นโดยสหภาพยุโรป (CIR (EU) 2021/808 of 22 March 2021)

5.3. Selectivity/Specificity

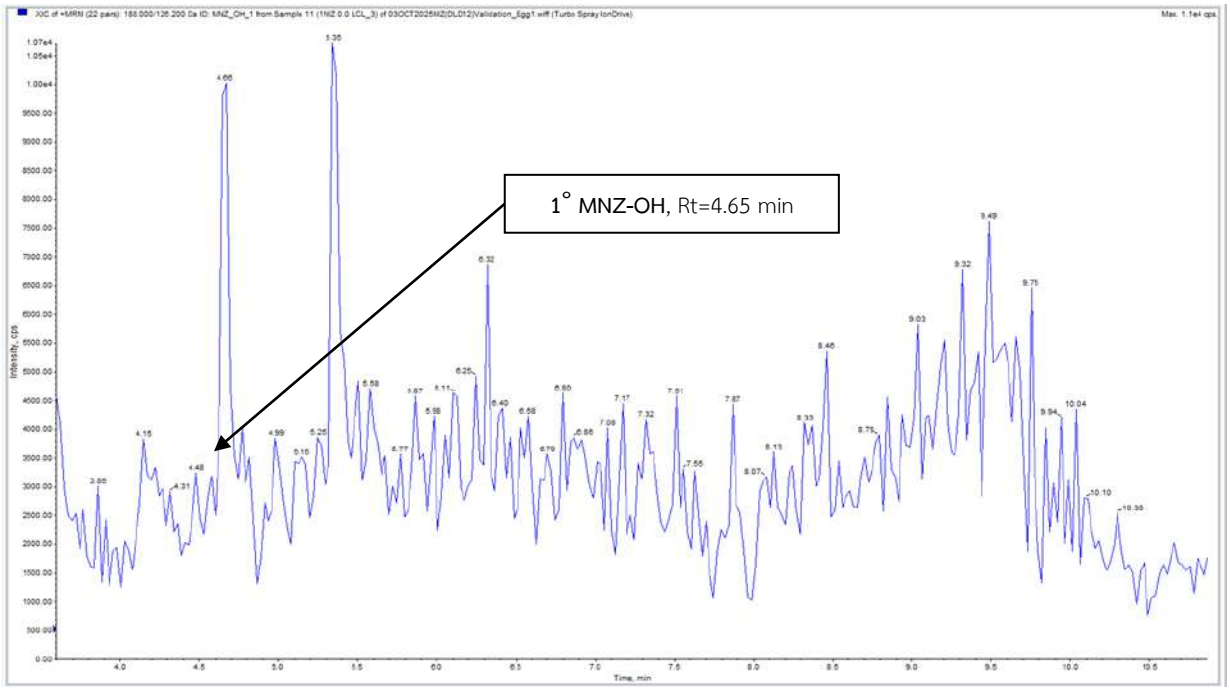
จากการทดสอบความจำเพาะของวิธีทดสอบ (Specificity test) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่ปลอดสารทั้ง 21 ตัวอย่าง ไม่พบสัญญาณรบกวนบริเวณ Rt ของทั้ง 7 สาร สรุปได้ว่า วิธีทดสอบนี้มีความจำเพาะต่อสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles จำนวน 7 สาร คือ สารตกค้าง Dimetridazole (DMZ), Metronidazole (MNZ), Metronidazole-hydroxy (MNZ-OH), Ronidazole (RNZ), 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI), Ipronidazole (IPZ) และ Ipronidazole-hydroxy (IPZ-OH) ผลการทดสอบแสดงดังโครมาโตแกรม ที่ 1-7



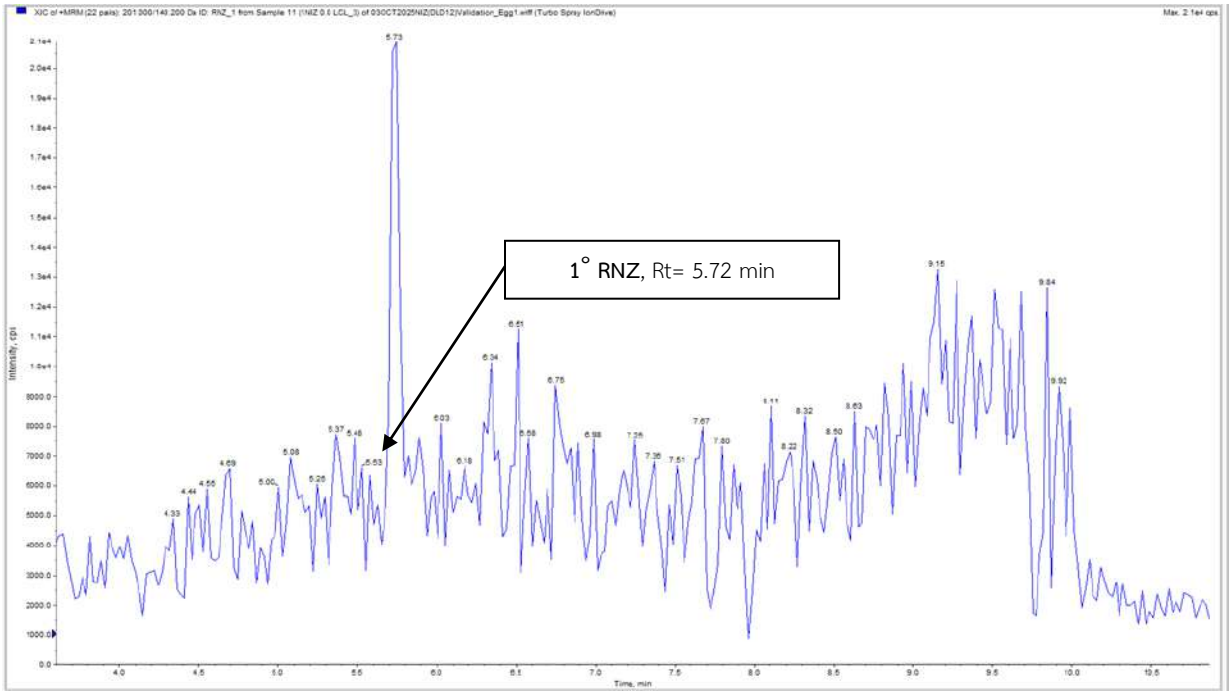
โครมาโตแกรมที่ 1 โครมาโตแกรมของสาร Dimetridazole (DMZ), Rt 7.03 min



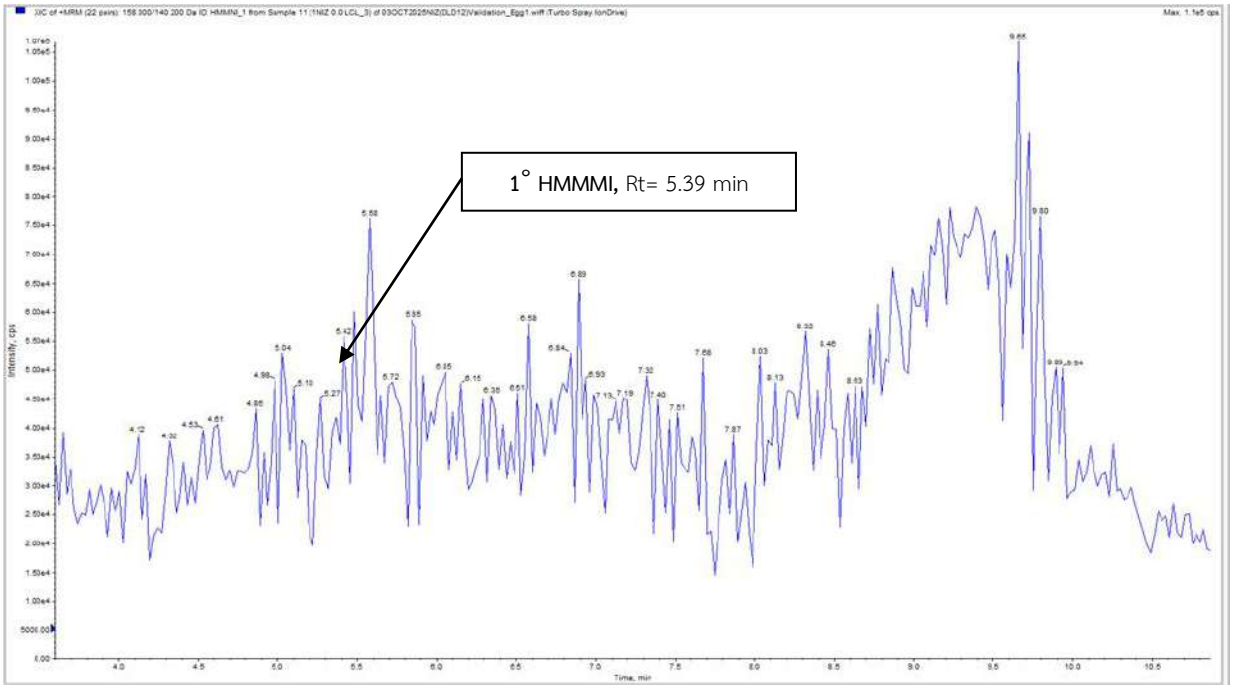
โครมาโตแกรมที่ 2 โครมาโตแกรมของสาร Metronidazole (MNZ), Rt 5.53 min



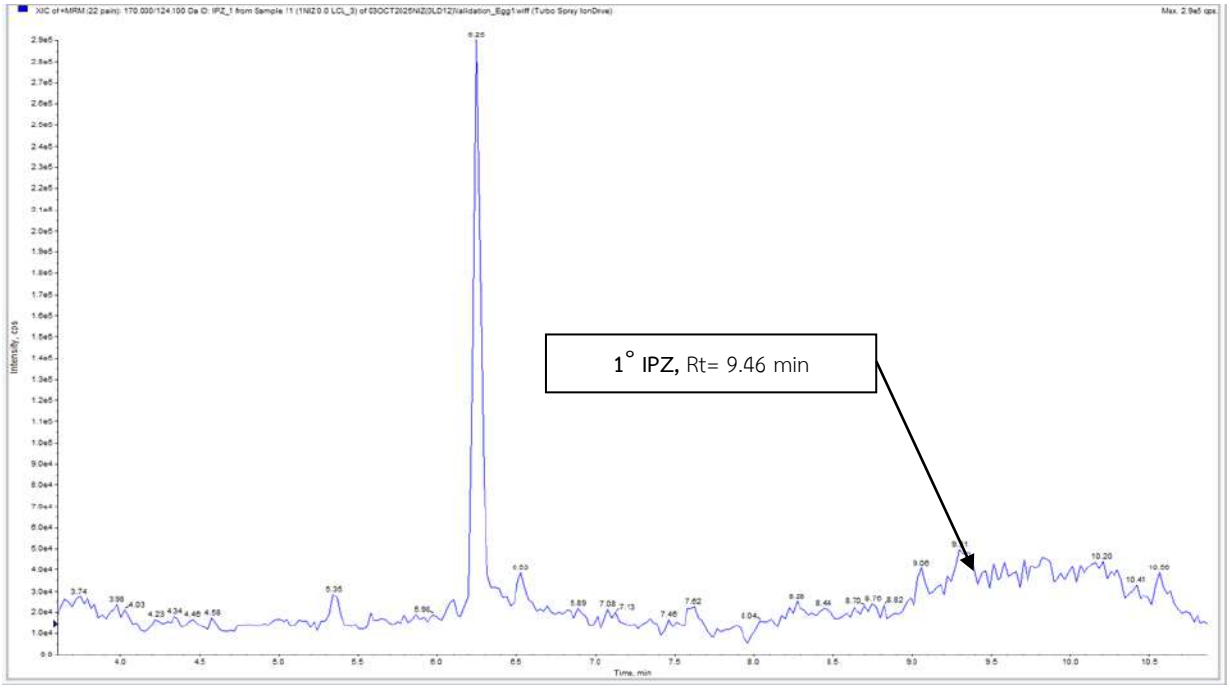
โครมาโตแกรมที่ 3 โครมาโตแกรมของสาร Metronidazole-hydroxy (MNZ-OH), Rt 4.65 min



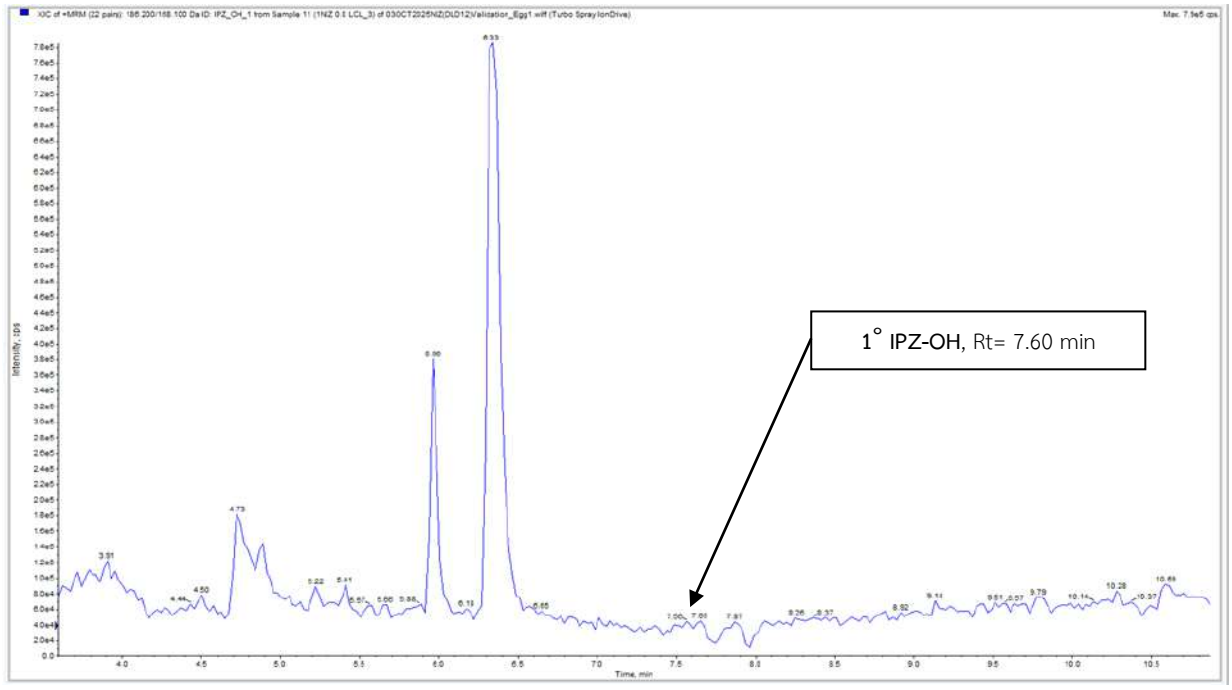
โครมาโตแกรมที่ 4 โครมาโตแกรมของสาร Ronidazole (RNZ), Rt 5.72 min



โครมาโตแกรมที่ 5 โครมาโตแกรมของสาร HMMNI, Rt 5.39 min



โครมาโตแกรมที่ 6 โครมาโตแกรมของสาร Ipronidazole (IPZ), Rt 9.46 min



โครมาโตแกรมที่ 7 โครมาโตแกรมของสาร Ipronidazole-hydroxy (IPZ-OH), Rt 7.60 min

5.4 Ruggedness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลง Condition ต่างๆ ของวิธีทดสอบที่เป็น Minor change จำนวน 3 factor และเปลี่ยนแปลงชนิดตัวอย่างของวิธีทดสอบเป็น Major change จำนวน 2 factor

Factor 1 ปรับอุณหภูมิ Centrifuge จาก 4 °C เป็น 25 °C

Factor 2 ปรับอุณหภูมิในการระเหยแห้ง จาก 38 °C เป็น 45 °C

Factor 3 เปลี่ยน Filter Nylon ขนาด 0.2 µm เป็น PVDF ขนาด 0.2 µm

Factor 4 ไข่ไก่ เป็น ไข่เป็ด

Factor 5 ไข่ไก่ เป็น ไข่นกกระทา

โดยเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับ 2.0 LCL เพิ่มไปในการวิเคราะห์ชุดทดสอบที่ 3 (Batch 3) จำนวน Factor ละ 2 ซ้ำ รวมทั้งหมด 10 หลอด ผลการวิเคราะห์ทั้ง 10 หลอด ค่า % Recovery และ %CV แสดงดังตารางที่ 15-16

ตารางที่ 15 %Recovery และ %CV ของการทดสอบการเปลี่ยนแปลง Condition ต่างๆ ของสารกลุ่ม Nitroimidazoles

Compounds	ความเข้มข้นระดับ 2.0 LCL (µg/kg)	Factor 1 : ปรับอุณหภูมิ Centrifuge จาก 4 °C เป็น 25 °C				Factor 2 : ปรับอุณหภูมิในการระเหยแห้ง จาก 38 °C เป็น 45 °C				Factor 3 : เปลี่ยน Filter Nylon ขนาด 0.2 µm เป็น PVDF ขนาด 0.2 µm			
		Mean Conc. (µg/kg)	% Recovery	%CV	สรุปผล	Mean Conc. (µg/kg)	% Recovery	%CV	สรุปผล	Mean Conc. (µg/kg)	% Recovery	%CV	สรุปผล
DMZ	0.40	0.400	100	0.00	Pass	0.410	102.50	0.00	Pass	0.410	102.50	0.00	Pass
MNZ	0.40	0.400	100	3.54	Pass	0.390	97.50	0.00	Pass	0.390	97.50	0.00	Pass
MNZ-OH	0.40	0.385	96.25	1.84	Pass	0.390	97.50	0.00	Pass	0.390	97.50	0.00	Pass
RNZ	0.40	0.395	98.75	1.79	Pass	0.395	98.75	1.79	Pass	0.405	101.25	1.75	Pass
HMMNI	0.80	0.800	100.00	0.00	Pass	0.800	100.00	0.00	Pass	0.800	100.00	0.00	Pass
IPZ	0.40	0.405	101.25	1.75	Pass	0.400	100.00	0.00	Pass	0.405	101.25	1.75	Pass
IPZ-OH	0.40	0.395	98.75	1.79	Pass	0.410	102.50	0.00	Pass	0.400	100.00	3.54	Pass

ตารางที่ 16 %Recovery และ %CV ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงชนิดตัวอย่างของสารกลุ่ม Nitroimidazoles

Compounds	ความเข้มข้นระดับ 2.0 LCL (µg/kg)	Factor 4 : เปลี่ยนชนิดตัวอย่าง จาก ไข่ไก่ เป็น ไข่เป็ด				Factor 5 : เปลี่ยนชนิดตัวอย่าง จาก ไข่ไก่ เป็น ไข่นกกระทา			
		Mean Conc. (µg/kg)	% Recovery	%CV	สรุปผล	Mean Conc. (µg/kg)	% Recovery	%CV	สรุปผล
DMZ	**0.40**	0.410	102.50	0.00	**Pass**	0.400	100.00	0.00	**Pass**
MNZ	**0.40**	0.405	101.25	1.75	**Pass**	0.395	98.75	1.79	**Pass**
MNZ-OH	**0.40**	0.395	98.75	1.79	**Pass**	0.400	100.00	0.00	**Pass**
RNZ	**0.40**	0.410	102.50	0.00	**Pass**	0.395	98.75	1.79	**Pass**
HMMNI	**0.80**	0.800	100.00	0.00	**Pass**	0.790	98.75	0.00	**Pass**
IPZ	**0.40**	0.400	100.00	0.00	**Pass**	0.395	98.75	1.79	**Pass**
IPZ-OH	**0.40**	0.395	98.75	1.79	**Pass**	0.405	101.25	1.75	**Pass**

จากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆ Factor 1-5 ของวิธีทดสอบ พบว่าทั้ง 7 ชนิดสาร ให้ค่า % Recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 50-120 % ตามตารางที่ 10 และ %CV จากผลการทดสอบที่ได้ ไม่เกิน %CV ของ Reproducibility เกณฑ์การประเมิน Precision ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป (CIR (EU) 2021/808 of 22 March 2021) ตามตารางที่ 11

สรุป การเปลี่ยนแปลง condition ต่างๆ และการเปลี่ยนแปลงชนิดตัวอย่างจากไข่ไก่เป็นไข่เป็ด และไข่นกกระทา ไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบสารกลุ่ม Nitroimidazoles ดังนั้นวิธีการทดสอบสารกลุ่ม Nitroimidazoles นี้ มีความทนทาน และสามารถตรวจในไข่เป็ด ไข่นกกระทาได้

5.5 Relative matrix effects

วิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่ ปลอดสารอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง จากต่างแหล่งที่มา โดยทำการสกัดตัวอย่างปลอดสารจนถึงขั้นตอนก่อน Make volume แล้วเติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่ระดับ 2.0 LCL (ในที่นี้คือระดับความเข้มข้น Group 1 ที่ 0.40 µg/kg, Group 2 ที่ 0.80 µg/kg) และ Internal Standard แล้วจึง Make volume ด้วย Reconstitute Solution ปริมาตร 400 µl โดยมีการวิเคราะห์ Standard solution ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันควบคู่ไปด้วย จำนวน 1 หลอด ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบ Relative matrix effect ของสารกลุ่ม Nitroimidazoles

Compound	MF (standard normalized for IS)		
	Mean	SD	%CV
DMZ	0.91	0.07	7.73
HMMNI	1.10	0.05	4.94
MNZ	0.97	0.09	9.16
MNZ-OH	1.04	0.13	12.54
IPZ	1.04	0.14	13.24
IPZ-OH	0.91	0.13	14.66
RNZ	0.99	0.09	9.37

จากผลการทดสอบ Relative matrix effects ของสารกลุ่ม Nitroimidazoles พบว่า %CV ของ MF (standard normalized for IS) ของตัวอย่างทดสอบไม่เกิน Precision เกณฑ์การประเมินสมรรถนะของวิธีทดสอบของสหภาพยุโรป CIR (EU) 2021/808 of 22 March 2021 ตามเกณฑ์การประเมินตารางที่ 11 ทุกชนิดสาร ชนิดไข่ไม่มีผลต่อการทดสอบ การใช้ IS และ Matrix calibration curve ช่วยลด matrix effect ได้ ดังนั้น ในวิธี Routine ต้องใช้ IS และ Matrix calibration curve

5.6. Stability

5.6.1 Stability in solution

จากเอกสารอ้างอิงจาก BVL, EU and National Reference Lab, Confirmatory method for the determination of nitroimidazoles in muscle and plasma with LC-MS/MS NIIM.009.Version 2 of 30 July 2019. พบว่า ใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลายสารกลุ่ม Nitroimidazoles

- Stock solutions (ระดับความเข้มข้น 1.0 mg/ml) เมื่อจัดเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C มีความคงตัวอย่างน้อย 2 ปี
- Standard solution
    - ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/µl, 10 ng/µl และ 1 ng/µl เมื่อจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C มีความคงตัวอย่างน้อย 1 ปี
    - ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ng/µl และความเข้มข้นที่ต่ำกว่า เมื่อจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C มีความคงตัวอย่างน้อย 6 เดือน
- Internal Standards ที่มีการติดฉลากไอโซโทป สามารถใช้ได้จนกว่าจะแสดงสัญญาณของการสลายตัว

5.6.2 Stability in matrix

5.6.2.1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

จากเอกสารอ้างอิงตาม Vokuev, M.et al. (2024). “Storage stability study of metronidazole and hydroxymetronidazole in chicken eggs by liquid chromatography

tandem mass spectrometry." Food Chemistry: X.25, P.1-8. พบว่า จากการศึกษาความคงตัวของ Metronidazole (MNZ) and hydroxymetronidazole (MNZ-OH) ที่วิเคราะห์ในไข่ไก่ มีความคงตัวเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 °C

5.6.2.2 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 25 °C

จากการศึกษาความคงตัวของสารกลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ไก่ โดยนำตัวอย่างไข่ไก่ที่ปลอดสารมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารกลุ่ม Nitroimidazoles 7 ชนิด ที่ระดับ 2 LCL แบ่งออกเป็น 5 ส่วน แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 3 ช่วงเวลา คือ วิเคราะห์ทันที, 3 วัน และ 7 วัน แล้วคำนวณหา % ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เหลืออยู่เทียบกับความเข้มข้นในตัวอย่างที่ทดสอบทันที โดยผลต่างของความเข้มข้นที่ได้ ($\%_{diff}$) ต้องไม่เกิน % CV Within–lab reproducibility ($\%CV_{wLR}$) ที่ได้จากผล validation ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 18-19

ตารางที่ 18 %ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เหลืออยู่เทียบกับความเข้มข้นในตัวอย่างที่ทดสอบทันทีของสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazoles เมื่อทดสอบผ่านไปแต่ละช่วงเวลาของไข่ไก่ ที่อุณหภูมิ 4 °C

ลำดับ	ชื่อสารมาตรฐาน	ช่วงเวลาที่ทดสอบ	ความเข้มข้นที่ทดสอบได้เฉลี่ย µ)g/kg(	ความเข้มข้นของสารที่เหลืออยู่)Analyte remaining(%))	ผลต่างของเข้มข้นที่ได้เทียบความเข้มข้นที่ทดสอบทันที ($\%_{diff}$)	%CV)Within - laboratory reproducibility; wLR(	ผลทดสอบความเสถียร ($\%_{diff}$< $\%CV_{wLR}$)
1	DMZ	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0.00	1.70	Pass
		วันที่ 3	0.39	98.99	1.01		Pass
		วันที่ 7	0.36	91.41	7.58		Fial
2	MNZ	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0.00	1.98	Pass
		วันที่ 3	0.40	100.00	0.00		Pass
		วันที่ 7	0.37	93.47	6.53		Fial
3	MNZ-OH	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0.00	1.96	Pass
		วันที่ 3	0.40	99.50	0.50		Pass
		วันที่ 7	0.41	102.00	-2.00		Fial
4	RNZ	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0.00	2.06	Pass
		วันที่ 3	0.40	100.00	0.00		Pass
		วันที่ 7	0.40	100.51	-0.51		Pass
5	HMMNI	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.79	100	0.00	0.63	Pass
		วันที่ 3	0.81	101.77	-1.77		Fial
		วันที่ 7	0.80	101.01	0.76		Fial
6	IPZ	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0.00	2.36	Pass
		วันที่ 3	0.39	98.48	1.52		Pass
		วันที่ 7	0.40	100.00	0.00		Pass
7	IPZ-OH	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.39	100	0.00	3.33	Pass
		วันที่ 3	0.40	100.51	-0.51		Pass
		วันที่ 7	0.40	100.51	-0.51		Pass

สรุป จากการทดสอบความทนทานสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่อุณหภูมิ 4 °C ทั้ง 7 ชนิดสาร ในตัวอย่างไข่ไก่ พบว่า RNZ, IPZ และ IPZ-OH สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ได้เป็นระยะเวลา 7 วัน DMZ, MNZ และ MNZ-OH สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ได้เป็นระยะเวลา 3 วัน ยกเว้น สาร HMMNI ที่ไม่ผ่านการทดสอบความคงตัว ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน

ตารางที่ 19 %ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เหลืออยู่เทียบกับความเข้มข้นในตัวอย่างที่ทดสอบทันทีของสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazoles เมื่อทดสอบผ่านไปแต่ละช่วงเวลาของไข่ไก่ ที่อุณหภูมิ 25 °C

ลำดับ	ชื่อสารมาตรฐาน	ช่วงเวลาที่ทดสอบ	ความเข้มข้นที่ทดสอบได้เฉลี่ย µ)g/kg(	ความเข้มข้นของสารที่เหลืออยู่)Analyte remaining(%))	ผลต่างของเข้มข้นที่ได้เทียบความเข้มข้นที่ทดสอบทันที ($\%_{diff}$)	%CV)Within - laboratory reproducibility; wLR(	ผลทดสอบความเสถียร ($\%_{diff} < \%CV_{wLR}$)
1	DMZ	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0	1.70	Pass
		วันที่ 3	0.04	11.11	88.89		Fial
		วันที่ 7	0.00	0.00	100.00		Fial
2	MNZ	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0	1.98	Pass
		วันที่ 3	0.05	12.56	87.44		Fial
		วันที่ 7	0.00	0.00	100.00		Fial
3	MNZ-OH	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0	1.96	Pass
		วันที่ 3	0.02	4.50	95.50		Fial
		วันที่ 7	0.00	0.00	100.00		Fial
4	RNZ	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0	2.06	Pass
		วันที่ 3	0.03	7.58	92.42		Fial
		วันที่ 7	0.00	0.00	100.00		Fial
5	HMMNI	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.79	100	0	0.63	Pass
		วันที่ 3	0.03	3.28	96.72		Fial
		วันที่ 7	0.00	0.00	100.00		Fial
6	IPZ	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.40	100	0	2.36	Pass
		วันที่ 3	0.07	17.68	82.32		Fial
		วันที่ 7	0.00	0.00	100.00		Fial
7	IPZ-OH	วิเคราะห์ทันที (0 วันที่)	0.39	100	0	3.33	Pass
		วันที่ 3	0.04	10.15	89.85		Fial
		วันที่ 7	0.00	0.00	100.00		Fial

สรุป จากการทดสอบความทนทานสารกลุ่ม Nitroimidazoles ที่อุณหภูมิ 25 °C ทั้ง 7 สาร ในตัวอย่างไข่ไก่ พบว่า ทั้ง 7 สาร ได้แก่ DMZ, MNZ, MNZ-OH, RNZ, HMMNI, IPZ และ IPZ-OH ไม่ผ่านการทดสอบความคงตัวที่ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน

6. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Nitroimidazoles ในไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS ได้ พบว่า วิธีทดสอบนี้สามารถใช้เป็นวิธีทดสอบยืนยันชนิดและปริมาณของสารตกค้างกลุ่ม Nitroimidazoles ในตัวอย่างไข่ ทั้งหมด 7 สาร คือ Dimetridazole (DMZ), Metronidazole (MNZ), Metronidazole-hydroxy (MNZ-OH), Ronidazole (RNZ), 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI), Ipronidazole (IPZ) และIpronidazole-hydroxy (IPZ-OH) โดยมีความจำเพาะต่อสารทั้ง 7 ชนิด มีความเป็นเส้นตรงผ่านเกณฑ์การยอมรับ ($r \geq 0.995$) มีระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการตัดสินว่าค่าสารตกค้างที่ตรวจพบผ่านมาตรฐานหรือไม่ (decision limit, CCα) เท่ากับ 0.22, 0.22, 0.21, 0.21, 0.42, 0.22 และ 0.22 µg/kg ตามลำดับ สามารถตรวจยืนยันชนิด และปริมาณของสารตกค้างได้ในไข่ไก่

ไข่เป็ด และไข่นกกระทา โดยทุกพารามิเตอร์ที่ทำการตรวจสอบผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมกรรมาธิการยุโรป CIR (EU) 2021/808 บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ และสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมต่างๆ ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory comparison) เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่า วิธีที่พิสูจน์ความใช้ได้ผ่านนี้สามารถนำมาใช้งานได้จริง

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายจิรภัทร อินทร์สุข ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง (References)

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. คู่มือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผล และวิธีคัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ปทุมธานี.

Corley J (2002). Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals. ©2003 John Wiley & Sons Ltd., 1-18.

Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021. Official Journal of the European Union, No. L180, 84-109.

Commission Delegated Regulation (EU) 2022/1644 of 7 July 2022 supplementing Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council with specific requirements for the performance of official controls on the use of pharmacologically active substances authorised as veterinary medicinal products or as feed additives and of prohibited or unauthorised pharmacologically active substances and residues thereof. Official Journal of the European Union, No L 248/3-17.

European Commission. Eurl Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) for specific pharmacoloGically active substances in specific animal matrices, (2020), p.1-8.

BVL, EU and National Reference Lab, Nitroimidazoles in muscle and plasma by LC-MS/MS short description (01.07.05) NIIM_009. Version 2 of 30 July 2019.

Council Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animalorigin.

Vokuev, M.et al. (2024). “Storage stability study of metronidazole and hydroxymetronidazole in chicken eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry”. Food Chemistry: X.25, P.1-8.