

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ในอาหารไก่ ด้วยวิธี LC-MS/MS

ภิรมภรณ์ เกื่อนถ้ำแก้ว^{1/} วิทยา สังข์ทอง^{1/} เสาวรี อุดมพันธ์^{1/}
นพพล คลวัชร^{1/} สุทธิพร พิริยาน^{1/}

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ในอาหารไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM เตรียมตัวอย่างโดยสกัดตัวอย่างด้วย 80% อะซิโตไนโตรล์ ขจัดสิ่งรบกวนด้วย Solid Phase Extraction ชนิด Alumina neutral ขจัดไขมันด้วยเฮกเซน จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิด 0.1% กรดฟอสฟอริก และอะซิโตไนโตรล์ (85:15) ใช้คอลัมน์ชนิด C₁₈ และสถานะของแมสสเปคโตรเมตรีแบบ ESI negative mode ผลการทดสอบความใช้ได้พบว่ากราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 7 - 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารคลอแรมฟินิคอล เท่ากับ 0.9987 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ของสารคลอแรมฟินิคอล เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เท่ากับ 7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารคลอแรมฟินิคอล ที่ระดับ 7, 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 87.09, 98.40 และ 98.81 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารคลอแรมฟินิคอล ที่ระดับ 7, 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 4.44, 3.32 และ 4.83 ตามลำดับ และความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 4.34, 3.50 และ 9.99 ตามลำดับ จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ที่ระดับความเข้มข้น 7 - 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารไก่

คำสำคัญ : คลอแรมฟินิคอล การทดสอบความใช้ได้ อาหารไก่

^{1/} กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for determination of Chloramphenicol in layer poultry feed by LC-MS/MS

Piromporn Tuantumkaew^{1/} Witaya Sungthong^{1/} Saowaree Udompun^{1/}
Noppon Donrak^{1/} Sutthiporn Phiriyayon¹

Abstract

In-house method for the determination of chloramphenicol in layer poultry feed with LC-MS/MS was validated according to EURACHEM Guide. The samples were extracted with 80% acetonitrile, purified using a solid phase extraction Alumina neutral extraction fat by Hexane and analyzed by LC-MS/MS. The analysis was carried out using the mobile phase of 0.1 % formic acid and acetonitrile (85:15) on a C₁₈ column and ESI negative mode of mass spectrometry condition. The results of method validation were found that the calibration curve at the level 7-100 µg/kg were good linear; correlation coefficient of chloramphenicol were 0.9987. Limit of Detection of chloramphenicol were 2 µg/kg and Limit of Quantitation of chloramphenicol 7 µg/kg, The mean %recovery of chloramphenicol at the level 7, 40 and 100 µg/kg were 87.09, 98.40 and 98.81 %, respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 7, 40 and 100 µg/kg of chloramphenicol were 4.44, 3.32 and 4.83%, respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility were 4.34, 3.50 and 9.99 %, respectively. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of chloramphenicol at the level 7-100 µg/kg in layer poultry feed.

Keywords : Chloramphenicol , method validation, layer poultry feed

^{1/} Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products. Tiwanont Rd. Bangkadi Subdistrict, Muang District, Patumthani Province. Thailand. 12000 Tel. 0-2967-9750.

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ในอาหารไก่ ด้วยวิธี LC-MS/MS

ภิรมภรณ์ เกื่อนถ้ำแก้ว^{1/} วิทยา สังข์ทอง^{1/} เสาวรี อุดมพันธ์^{1/}

นพพล ดลรักษ์^{1/} สุทธิพร พิริยาน^{1/}

บทนำ

Chloramphenicol เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด และยังออกฤทธิ์ต่อ rickettsia และไวรัสขนาดใหญ่ (เช่น psittacosis-lymphogranuloma group) ด้วยแต่อาจทำให้เกิดอาการพิษต่อระบบการสร้างเม็ดเลือดได้ โดยกดไขกระดูกทำให้เกิดโลหิตจางแบบ aplastic anemia จึงทำให้มีการใช้ยานี้ในคนน้อยลง และถึงขนาดที่ห้ามใช้ในคนในบางประเทศ ส่วนในสัตว์นั้น ไม่ควรที่จะใช้กับสัตว์เศรษฐกิจเพราะยาตกค้างในเนื้อสัตว์จะมีผลต่อคนที่บริโภคเนื้อสัตว์นั้นได้ ถึงแม้ว่า Chloramphenicol ทำให้เกิดโลหิตจางได้ แต่มีข้อดีคือออกฤทธิ์กว้างนั้น จึงได้มีการค้นหาอนุพันธ์ของยานี้ที่ออกฤทธิ์กว้าง แต่ไม่ทำให้เกิดอาการพิษดังกล่าว

ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ในอาหารไก่ และเพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล จึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ด้วยวิธี LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการอ้างอิงวิธีวิเคราะห์จาก Journal of Analytica Chimica Acta 483, 2003 โดยดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014) เพื่อแสดงว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอลในอาหารไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ให้เกิดความเชื่อมั่นและยอมรับในวิธีวิเคราะห์ และเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ให้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทยและผลักดันให้เป็นวิธีกลางระหว่างประเทศ หรือเป็นวิธีที่ใช้ระหว่างประเทศ เพื่อขจัดการกีดกันทางการค้าอันเนื่องมาจากวิธีตรวจวิเคราะห์

2. ขอบข่าย

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอลในอาหารไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอลในอาหารไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3.2 ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น และใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2005

4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

4.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (Working range) ดังนี้

4.1.1 วิเคราะห์ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 7, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า correlation coefficient ไม่น้อยกว่า 0.995

4.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ) ดังนี้

4.2.1 วิเคราะห์ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล ให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหาค่า 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

4.2.2 ทำการยืนยันค่า LOD โดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 และ Δ Ion ratio ไม่เกิน $\pm 20\%$ หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.2.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาประเมินความแม่นยำและความเที่ยงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3 การทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

4.3.1 ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) ของวิธีวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารกลุ่มคลอแรมฟินิคอล 3 ระดับความเข้มข้น คือ 7 (LOQ), 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility) ของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์เดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิเคราะห์ต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน แต่ละวันจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล 3 ระดับความเข้มข้นคือ 7(LOQ), 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.3 ประเมินความแม่นยำ โดยการคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนได้ (%Recovery) ของแต่ละความเข้มข้นว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016)

4.3.4 ประเมินความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD_r) ของความเข้มข้นสารที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r)

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

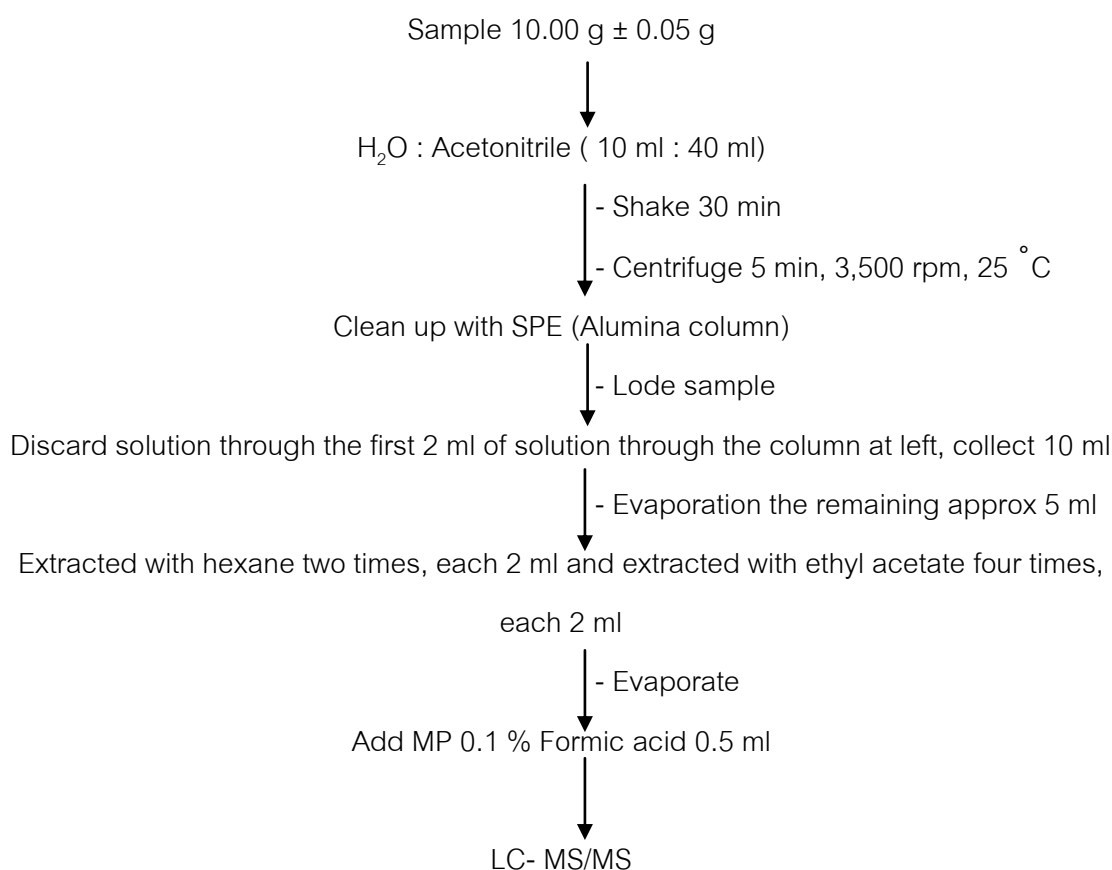
เมื่อ C คือความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

4.3.5 ประเมินความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD_R) ของความเข้มข้นสารที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งต้องไม่เกินค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากสมการ Horwitz (% PRSD_R)

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

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์สารคลอแรมเฟนิคอล ในอาหารไก่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS



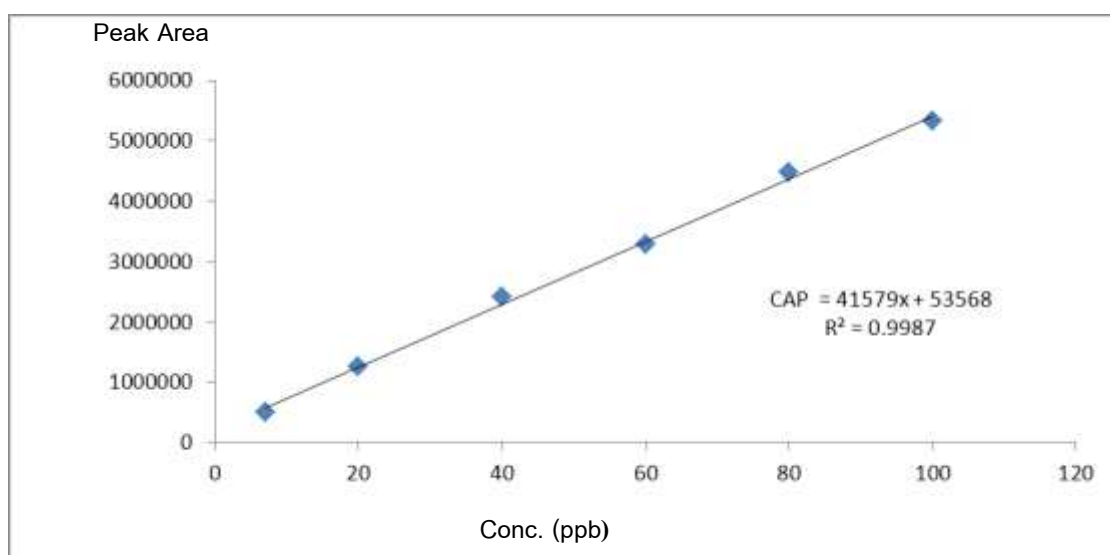
4.4 การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test)

นำวิธีที่พัฒนา และทดสอบความใช้ได้ แล้วเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานภายนอก (Proficiency Test) ในรายการ Chloramphenicol and Coccidiostats in Animal Feed กับหน่วยงาน Fapas[®]

5. ผลการทดสอบ

5.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (Working range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล ในช่วงความเข้มข้น 7 - 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified Sample และพื้นที่ใต้พีค (Peak area) ของสารคลอแรมฟินิคอล ในช่วงพบว่าได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง และเมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) มีค่าเท่ากับ 0.9987 พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 7 – 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี เหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Fortified Sample ที่ 7 – 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area ของสาร

5.2 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ)

5.2.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารคลอแรมฟินิคอล โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก $LOD = 3S'_0$ และ $LOQ = 10S'_0$ พบว่ามีค่าดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารคลอแรมฟินิคอล

ลำดับ	Chloramphenicol (µg/kg)	%Recovery (60-115%)
1	48.99	97.99
2	48.76	97.52
3	51.06	102.13
4	51.84	103.68
5	49.67	99.34
6	49.88	99.76
7	50.05	100.10
8	50.33	100.67
9	51.55	103.11
10	51.48	102.96
Mean	50.36	100.72
SD, S_0	1.03	
n	2	
S'_0	0.73	
$LOD=3S'_0$	2.18	
$LOD=10S'_0$	7.28	

5.2.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ Limit of Quantitation; LOQ)

ผลการยืนยันค่า LOD ที่ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า $S/N \geq 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision ส่วนผลการหาค่า LOQ ที่ 7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %Recovery อยู่ในช่วง 60 – 115 % และ %RSD ไม่เกิน 22.28 % ตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) ดังนั้นค่า LOD และ LOQ ของสารคลอแรมฟินิคอลมีค่าเท่ากับ 2 และ 7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีวิเคราะห์นี้ ดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารคลอแรมฟินิคอลที่ระดับ 2 ไมโครกรัม ต่อกลีโกรัม

ลำดับ	Chloramphenicol	
	S/N	% ΔIR
1	295.13	2.67
2	364.64	-0.49
3	415.63	-1.00
4	328.59	0.49
5	398.81	2.25
6	269.04	1.16
7	387.96	2.15
8	374.31	1.23
9	492.74	-0.93
10	418.57	0.58

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารคลอแรมฟินิคอล ที่ระดับ 7 ไมโครกรัม ต่อกลีโกรัม

ลำดับ	Chloramphenicol	
	Conc.	% Recovery
1	6.891	98.44
2	6.898	98.54
3	6.010	85.86
4	6.182	88.31
5	6.199	88.56
6	6.903	98.61
7	7.022	100.31
8	6.509	92.99
9	6.599	94.27
10	6.089	86.99
Mean	6.530	93.29
SD	0.367	
%RSD	5.62	
เกณฑ์ %Recovery 60-115 เกณฑ์ %RSD ไม่เกิน 22.28		

5.3 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

5.3.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยวิธีวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล 3 ระดับ คือ 7 (LOQ), 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารคลอแรมฟินิคอล ในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 60 - 115 ตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้น (µg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)
		Chloramphenicol
7	60 - 115	87.09
40	60 - 115	98.40
100	60 - 115	98.81

5.3.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยวิธีวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล 3 ระดับ คือ 7 (LOQ), 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมพบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r) ดังตารางที่ 5 และจากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ

ความเข้มข้น (µg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability, n=10)
		Chloramphenicol
7	22.28	4.44
40	17.14	3.32
100	14.93	4.83

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารคลอแรมฟินิคอล 3 ระดับ คือ 7 (LOQ), 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมพบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_R) ดังตารางที่ 6 และจากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำ

ความเข้มข้น (µg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _R	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (with-in laboratory reproducibility, n=20)
		Chloramphenicol
7	33.75	4.34
40	25.97	3.50
100	22.62	9.99

5.4 ผลการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test)

5.4.1 จากการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) กับหน่วยงาน Fapas[®] พบว่า ผลที่ได้มีค่า Z-Score อยู่ในช่วง $|Z| \leq 2$ ซึ่งสรุปได้ว่า ผ่านเกณฑ์การประเมิน ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) กับหน่วยงาน Fapas[®]

analyte	Assigned value µg/kg	Result value µg/kg	Z-Score	สรุปผลการประเมิน
Chloramphenicol	26.3	20.82	-0.9	ผ่าน

พิจารณาเกณฑ์การประเมินผลจากค่า Z-Score ดังนี้

$ Z \leq 2$	ผลเป็นที่น่าพอใจ (satisfactory)	= ผ่านเกณฑ์
$2 < Z < 3$	ผลเป็นที่น่าสงสัย (questionable)	= ผ่านเกณฑ์
$ Z \geq 3$	ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ (unsatisfactory)	= ไม่ผ่านเกณฑ์

6. สรุปผลการทดสอบ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ในตัวอย่างอาหารไก่ ด้วยวิธี LC-MS/MS พบว่าผลการทดสอบ Linearity Range และ Working range โดยการวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มคลอแรมฟินิคอล ในช่วงความเข้มข้น 7 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี โดยค่า correlation coefficient (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 ค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่า limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับมีค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) ผลการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) กับหน่วยงาน Fapas[®] ค่า Z-Score มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ซึ่งแสดงว่าห้องปฏิบัติการมีความสามารถในการทดสอบเป็นที่น่าพอใจ

จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ในอาหารไก่ ที่ช่วงความเข้มข้น 7 – 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

7. ข้อเสนอแนะ

ให้ศึกษาการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารคลอแรมฟินิคอล ในอาหารสัตว์ ชนิดอื่นๆ เช่น อาหารโค และควรทำการศึกษาสารเพิ่มเติม เพื่อขยายขอบข่ายของวิธีทดสอบ

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายไพโรจน์ อารังโสภา ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสุทธิพร พิริยาน ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ส่วนบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ ที่ดำเนินงานจัดหาวัสดุอุปกรณ์ ในการปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี(สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษานี้สำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

9.1 Appendix F: AOAC Guidelines for standard Method Performance requirements. AOAC official method of analysis(2016).

9.2 EURACHEM Guide, The fitness for purpose of analytical methods, 2nd ed.2014.

9.3 Alex Gantverg, Isaac Shishani, Michael Hoffman.Determination of Chloramphenicol in animal tissues and urine Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry. Analytical Chimica Acta.483(2003)125-135.

9.4 European Commission Decision 2002/65/EC of 12 August 2002 Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical method and the interpretation of results. Official journal of the European communities. 2002 L221/8.