

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตมในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS

ภิรมภรณ์ เกื่อนถ้ำแก้ว^{1/} วิทยา สังข์ทอง^{1/} สุทธิพร พิริยาน^{1/}
ศิริวัฒน์ รายนะสุข^{1/} เสาวรี อุดมพันธ์^{1/} นพพล ดลรักรัษ^{1/}

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตม (Beta lactam) ได้แก่ สารเพนิซิลลิน จี สารอะม็อกซิซิลลิน และสารเซฟติโอเฟอร์ ในอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM เตรียมตัวอย่างโดยสกัดตัวอย่างด้วยอะซิโตไนไตรล์และโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 M (40:10) ขจัดสิ่งรบกวนด้วย Solid Phase Extraction ชนิด SCX และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิด 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำปราศจากไอออน และ 0.1% กรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ ใช้คอลัมน์ชนิด C₁₈ และสถานะของแมสสเปคโตรเมทรีแบบ ESI positive mode ผลการทดสอบความใช้ได้พบว่ากราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.08 -1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารเพนิซิลลิน จี สารอะม็อกซิซิลลิน และสารเซฟติโอเฟอร์ เท่ากับ 0.9967, 0.9985 และ 0.9955 ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ของสารเพนิซิลลิน จี สารอะม็อกซิซิลลิน และสารเซฟติโอเฟอร์ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารเพนิซิลลิน จี ที่ระดับ 0.08, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 97.00, 100.52 และ 102.82 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารอะม็อกซิซิลลิน ที่ระดับ 0.08, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 99.00, 96.10 และ 101.71 ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารเซฟติโอเฟอร์ ที่ระดับ 0.08, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 100.75, 97.48 และ 104.85 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารเพนิซิลลิน จี ที่ระดับ 0.08, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 6.08, 5.37 และ 5.50 ตามลำดับ และความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 6.14, 5.57 และ 6.05 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารอะม็อกซิซิลลิน ที่ระดับ 0.08,

0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 6.94, 8.16 และ 8.91 ตามลำดับ และความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 6.86, 9.57 และ 7.54 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารเซฟติโอเฟอร์ ที่ระดับ 0.08, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 5.33, 4.18 และ 5.23 ตามลำดับ และความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 5.30, 7.39 และ 4.57 ตามลำดับ จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์สารเพนิซิลลิน จี สารอะม็อกซิซิลลิน และสารเซฟติโอเฟอร์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 -1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารสัตว์

คำสำคัญ : เพนิซิลลิน จี อะม็อกซิซิลลิน เซฟติโอเฟอร์ การทดสอบความใช้ได้ อาหารสัตว์

^{1/} กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000 โทรศัพท์ 0-2967-9750

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

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

Abstract

In-house method for the determination of Penicillin G, Amoxicillin and Ceftiofur in animal feed with LC-MS/MS was validated according to EURACHEM Guide. The samples were extracted with acetonitrile and 0.1 M potassium dihydrogenphosphate (40:10), using a solid phase extraction SCX and analyzed by LC-MS/MS. The analysis was carried out using the mobile phase of 0.1% formic acid in deionized water and 0.1% formic acid in acetonitrile on a C₁₈ column and ESI positive mode of mass spectrometry condition. The results of method validation were found that the calibration curve at the level 0.08 -1.00 mg/kg were good linear ; correlation coefficient of Penicillin G, Amoxicillin and Ceftiofur were 0.9967, 0.9985 and 0.9955 respectively. Limit of Detection of Penicillin G, Amoxicillin and Ceftiofur were 0.05 mg/kg, respectively and Limit of Quantitation of Penicillin G, Amoxicillin and Ceftiofur were 0.08 mg/kg, The mean %recovery of Penicillin G at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg were 97.00, 100.52 and 102.82, respectively. The mean %recovery of Amoxicillin at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg were 99.00, 96.10 and 101.71, respectively. The mean %recovery of Ceftiofur at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg were 100.75, 97.48 and 104.85, respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg of Penicillin G were 6.08, 5.37 and 5.50%, respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility were 6.14, 5.57 and 6.05%, respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg of Amoxicillin were 6.94, 8.16 and 8.91%, respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility were 6.86, 9.57 and 7.54%, respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg of

Ceftiofur 5.33, 4.18 and 5.23%, respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility 5.30, 7.39 and 4.57%, respectively. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of Penicillin G, Amoxicillin and Ceftiofur at the level 0.08 -1.00 mg/kg in animal feed.

Keywords : Penicillin G Amoxicillin Ceftiofur, method validation, animal 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.

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตม ในอาหารสุกร ด้วยวิธี LC-MS/MS

ภิรมภรณ์ เกื่อนถ้ำแก้ว^{1/} วิทยา สังข์ทอง^{1/} สุทธิพร พิริยาน^{1/}
ศิริวัฒน์ รายนะสุข^{1/} เสาวรี อุดมพันธ์^{1/} นพพล ดลรักษ์^{1/}

บทนำ

สารกลุ่มเบต้าแลคแตม (Beta lactam) จัดเป็นยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและตายลงในที่สุด จึงเป็นเหตุผลของฤทธิ์ในการรักษาตามสรรพคุณ สามารถแบ่งสารกลุ่มเบต้าแลคแตมได้หลายกลุ่ม เช่น กลุ่มสารเพนิซิลลิน (Penicillins) สารกลุ่มเซฟาโรสปอริน (Cephalosporins) เป็นต้น

สารกลุ่มเพนิซิลลิน มีโครงสร้างทางเคมีที่เรียกว่า เบต้าแลคแตมริง (Beta lactam ring) โดยมีแหล่งกำเนิดมาจากเชื้อราที่ชื่อว่า Penicillium กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน โดยเข้าไปยับยั้งการสร้างสารเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งเป็นตัวประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้การสร้างผนังเซลล์ในแบคทีเรียหยุดชะงัก ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือแพร่พันธุ์ได้ ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด นิยมใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย เช่น การติดเชื้อในช่องปาก คอ ปอด หูชั้นกลาง (หูติดเชื้อ/หูน้ำหนวก) หลอดลม (หลอดลมอักเสบ) และระบบทางเดินอาหาร (ลำไส้อักเสบ) เป็นต้น

สารกลุ่มเซฟาโรสปอริน มีสูตรโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์คล้ายกับกลุ่มเพนิซิลลิน ซึ่งประกอบด้วย เบต้าแลคแตมริง โดยมีแหล่งกำเนิดมาจากเชื้อราที่ชื่อว่า Cephalosporium สามารถทนต่อเอ็นไซม์เพนิซิลลินเนส ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายยาปฏิชีวนะในกลุ่มเพนิซิลลิน จึงใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาเพนิซิลลิน นิยมใช้รักษาโรคในระบบทางเดินหายใจและทางเดินปัสสาวะ รวมถึงใช้รักษาต้านมะเร็ง เป็นต้น

ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้าแลคแตมในการเลี้ยงสัตว์ เพื่อป้องกันโรค ตลอดจนช่วยให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี โดยมีการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์หรือน้ำที่ให้สัตว์ดื่มกิน ดังนั้นเพื่อป้องกันปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งสามารถแพร่กระจายไปยังมนุษย์ได้ จึงจำเป็นต้องใช้ให้เหมาะสมตรงกับชนิดของโรคที่จะรักษา และระยะเวลาการรักษาที่ต่อเนื่องเพียงพอ จึงจะได้ผลดี ช่วยยับยั้งการแพร่ของเชื้อโรคได้

ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตม ในอาหารสัตว์ และเพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล จึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตม ซึ่งประกอบไปด้วย สารกลุ่มเซฟาโรสปอริน เช่น เซฟติโอเฟอร์ (Ceftiofur) และสารกลุ่มเพนิซิลลิน เช่น เพนิซิลลิน จี (Penicillin G), อะม็อกซิซิลลิน (Amoxicillin) ในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ อ้างอิงวิธีวิเคราะห์จาก Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 85, 2013 โดยดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014) เพื่อแสดงว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตมในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS และเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธี และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตม ได้แก่ สารกลุ่มเซฟาโรสปอริน เช่น เซฟติโอเฟอร์ และสารกลุ่มเพนิซิลลิน เช่น เพนิซิลลิน จี, อะม็อกซิซิลลิน ในอาหารสุกร ด้วยวิธี LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตมในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS
2. เพื่อนำผลทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ให้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025

4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

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

4.1.1 วิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคเตม จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.08, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคเตม และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า correlation coefficient (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995

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

4.2.1 วิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคเตม ให้มีความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) 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 ของสารกลุ่มเบต้าแลคเตม ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 และ Δ Ion ratio ตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.2.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคเตม ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาประเมินความแม่นยำและความเที่ยงว่าอยู่ใน

เกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3 การทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

4.3.1 ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) ของวิธีวิเคราะห์ โดยวิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (with-in laboratory reproducibility) ของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์เดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิเคราะห์ต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คนแต่ละวันจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

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

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

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

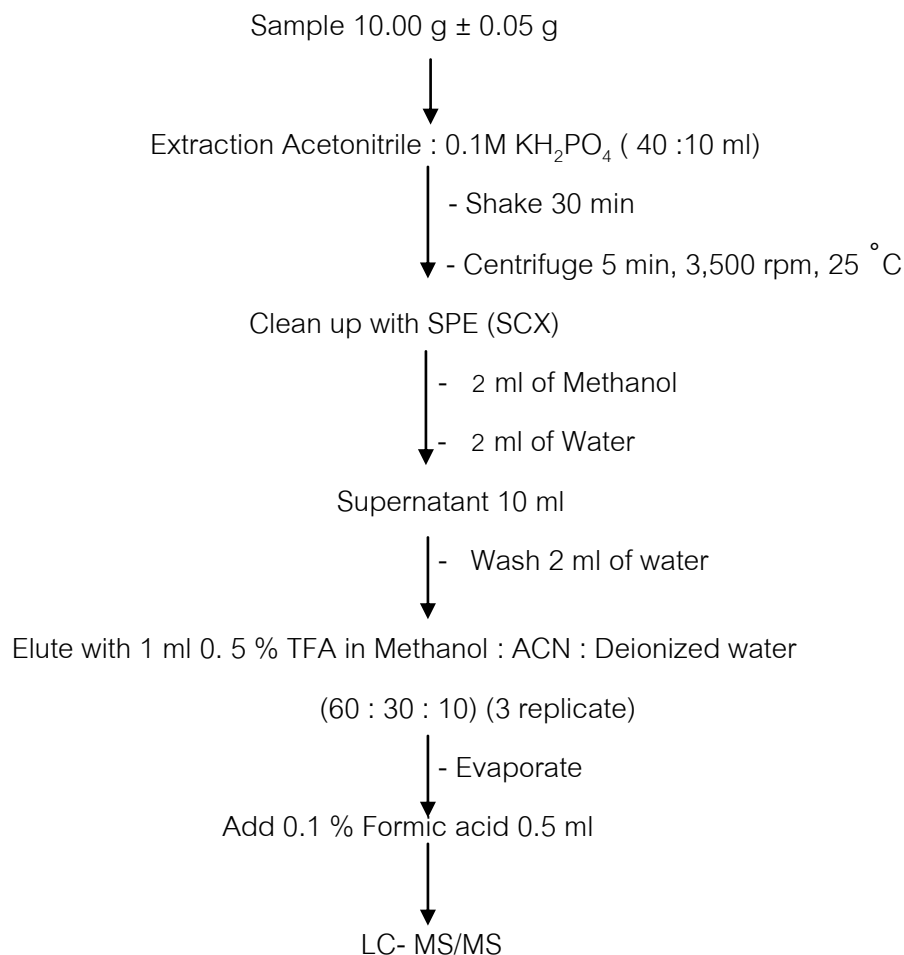
เมื่อ C คือความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

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

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

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตม ในอาหารสุกร ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

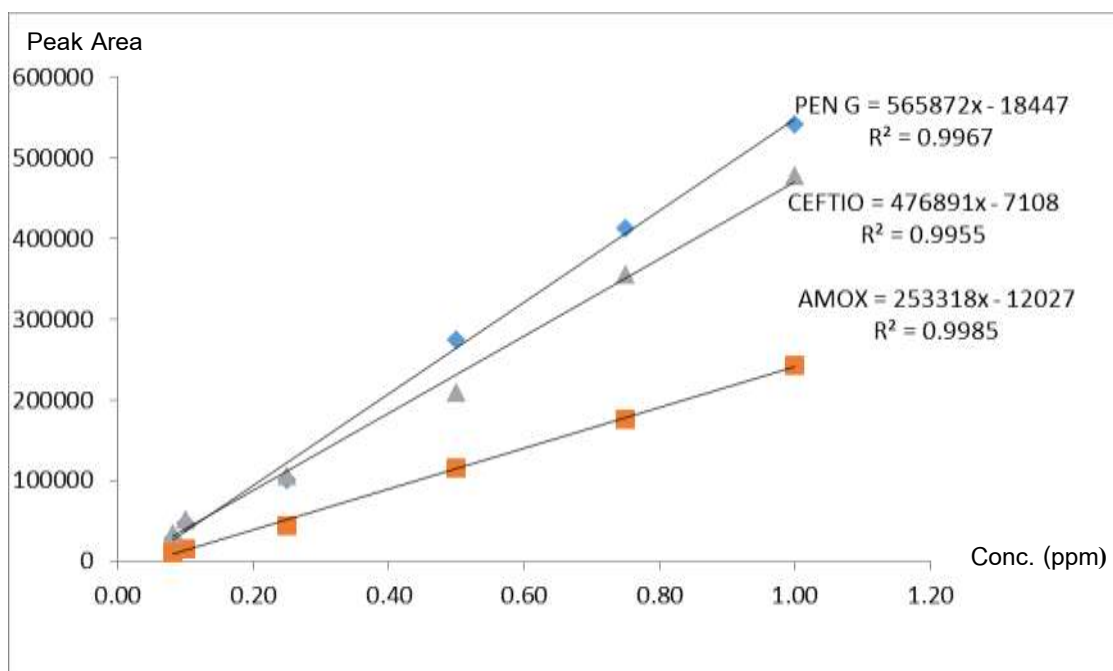


5. ผลการทดสอบ

5.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (Working range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม ในช่วงความเข้มข้น 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(ppm) และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified Sample และพื้นที่ใต้พีค (Peak area) ของสารเพนิซิลลิน จี สารอะม็อกซิซิลลิน และสารเซฟติโอเพอร์ ตามลำดับ ในช่วงพบว่าได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง และเมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) มีค่าเท่ากับ 0.9967 0.9985 และ 0.9955 ตามลำดับ

พบว่าค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี เหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Fortified Sample ที่ 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area ของสาร

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

5.2.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 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 ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม

ลำดับ	Penicillin G		Amoxicillin		Ceftiofur	
	Conc. (mg/kg)	%Recovery (80 - 110%)	Conc. (mg/kg)	%Recovery (80 - 110%)	Conc. (mg/kg)	%Recovery (80 - 110%)
1	0.205	102.50	0.176	88.00	0.183	91.50
2	0.202	101.00	0.174	87.00	0.190	95.00
3	0.199	99.50	0.182	91.00	0.190	95.00
4	0.180	90.00	0.186	93.00	0.183	91.50
5	0.184	92.00	0.174	87.00	0.191	95.50
6	0.209	104.50	0.203	101.50	0.205	102.50
7	0.195	97.50	0.201	100.50	0.205	102.50
8	0.195	97.50	0.206	103.00	0.202	101.00
9	0.198	99.00	0.179	89.50	0.190	95.00
10	0.194	97.00	0.190	95.00	0.182	91.00
avg.	0.196	98.05	0.187	93.55	0.192	96.05
SD	0.008		0.012		0.008	
S_0'	0.006		0.008		0.006	
$LOD=3S_0'$	0.02		0.02		0.02	
$LOQ=10S_0'$	0.06		0.08		0.06	

5.2.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) ที่ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า $S/N < 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน พบว่ามีค่า $S/N \geq 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision ดังนั้นค่า LOD ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม มีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

5.2.3 ผลการยืนยันความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ Limit of Quantitation; LOQ) ของสารสารเพนิซิลลิน จี และสารเซฟติโอเฟอร์ ที่ 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %Recovery ไม่อยู่ในช่วง 80 – 110% และ %RSD เกินเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) จึงทำการปรับค่า LOQ ที่ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %Recovery อยู่ในช่วง 80 – 110% และ %RSD ไม่เกิน 15.44% ตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) และตามเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz ตามลำดับ ดังนั้นค่า LOQ ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม มีค่าเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์นี้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม ที่ระดับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	Penicillin G		Amoxicillin		Ceftiofur	
	S/N	% ΔIR	S/N	% ΔIR	S/N	% ΔIR
1	78.84	1.78	39.70	-3.51	398.40	4.81
2	67.40	-4.16	49.94	4.22	405.15	-0.13
3	48.05	3.98	65.68	3.17	464.71	8.25
4	68.69	4.13	39.98	7.01	406.74	-0.80
5	72.15	5.76	22.73	-10.86	309.49	-6.72
6	82.51	5.73	28.00	9.68	183.90	-3.46
7	86.09	-3.40	44.66	6.09	530.74	-1.26
8	64.06	6.77	59.32	3.99	278.02	0.63
9	91.34	-0.90	24.32	2.07	388.50	-5.86
10	82.07	-3.07	50.17	-16.03	239.77	0.25

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม ที่ระดับ 0.08 มิลลิกรัม ต่อκιโลกรัม

ลำดับ	Penicillin G		Amoxicillin		Ceftiofur	
	Conc. (mg/kg)	%Recovery (80-110%)	Conc. (mg/kg)	%Recovery (80-110%)	Conc. (mg/kg)	%Recovery (80-110%)
1	0.084	105.00	0.086	107.50	0.079	98.75
2	0.081	101.25	0.087	108.75	0.079	98.75
3	0.087	108.75	0.085	106.25	0.084	105.00
4	0.085	106.25	0.083	103.75	0.079	98.75
5	0.081	101.25	0.085	106.25	0.079	98.75
6	0.085	106.25	0.083	103.75	0.088	110.00
7	0.075	93.75	0.073	91.25	0.070	87.50
8	0.078	97.50	0.082	102.50	0.075	93.75
9	0.084	105.00	0.078	97.50	0.081	101.25
10	0.08	100.00	0.084	105.00	0.074	92.50
mean	0.082	102.50	0.080	100.00	0.080	100.00
SD	0.003		0.004		0.005	
%RSD	4.26		4.97		6.02	
เกณฑ์ %Recovery 80 - 110 เกณฑ์ %RSD ไม่เกิน 15.44						

5.3 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

5.3.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม 3 ระดับ คือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า สารเพนิซิลลิน จี มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้เท่ากับ 97.00, 100.52 และ 102.82 ตามลำดับ สารอะม็อกซิซิลลิน มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้เท่ากับ 99.00, 96.10 และ 101.71 ตามลำดับ

สารเซฟติโอเฟอร์ มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้เท่ากับ 100.75, 97.48 และ 104.85 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม ในช่วง 80 – 110 ตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)		
		Penicillin G	Amoxicillin	Ceftiofur
0.08	80 - 110	97.00	99.00	100.75
0.50	80 - 110	100.52	96.10	97.48
1.00	80 - 110	102.82	101.71	104.85

5.3.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม 3 ระดับ คือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสารเพนิซิลลิน จี มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 6.08, 5.37 และ 5.50 ตามลำดับ สารอะม็อกซิซิลลิน มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 6.94, 8.16 และ 8.91 ตามลำดับ สารเซฟติโอเฟอร์ มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 5.33, 4.18 และ 5.23 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r) ดังตารางที่ 5 และจากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability, n=10)		
		Penicillin G	Amoxicillin	Ceftiofur
0.08	15.44	6.08	6.94	5.33
0.50	11.72	5.37	8.16	4.18
1.00	10.56	5.50	8.91	5.23

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม 3 ระดับ คือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า สารเพนิซิลลิน จี มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 6.14, 5.57 และ 6.05 ตามลำดับ สารอะม็อกซิซิลลิน มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 6.86, 9.57 และ 7.54 ตามลำดับ สารเซฟติโอเฟอร์ มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 5.30, 7.39 และ 4.57 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r) ดังตารางที่ 6 และจากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (with-in laboratory reproducibility, n=20)		
		Penicillin G	Amoxicillin	Ceftiofur
0.08	23.38	6.14	6.86	5.30
0.50	17.76	5.57	9.57	7.39
1.00	16.00	6.05	7.54	4.57

6. สรุปผลการทดสอบ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตม ในตัวอย่างอาหาร สุกด้วยวิธี LC-MS/MS พบว่าผลการทดสอบ Linearity Range และ Working range โดยการวิเคราะห์ Fortified Sample ของสารกลุ่มเบต้าแลคแตม ในช่วงความเข้มข้น 0.08 ถึง 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี โดยค่า correlation coefficient (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 ค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ มีค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016)

จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าแลคแตม ในอาหารสัตว์ ที่ช่วงความเข้มข้น 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการทดสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและเที่ยงยิ่งขึ้น และควรให้ศึกษาการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเบต้าแลคแตม สารอื่นเพิ่มเติม เพื่อขยายขอบข่ายของวิธีทดสอบ

8. กิตติกรรมประกาศ

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

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 M.P.Hermo, P. Gómez-Rodríguez, J. Barbosa, D. Barrón. Metabolomic assays of amoxicillin, cephapirin and ceftiofur in chicken muscle : Application to treated chicken sample by liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 85, 2013, p.169-178.

9.4 European Commission Decision 2002/65/EC of 22 December 2009 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.