

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนนิซิลลินในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS

ศิริวัฒน์ رایณะสุข สุนีย์ คณาพิพัฒน์ เสาวรี อุดมพันธ์ รัชนก ทองอ่อน

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนนิซิลลิน จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ สารแอมพิซิลลิน, สารออกซาซิลลิน, สารคลอกซาซิลลิน, สารนาฟซิลลิน, สารไดคลอกซาซิลลิน, สารอะม็อกซิซิลลิน, สารเพนนิซิลลิน จี และสารเพนนิซิลลิน วี ในอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM เตรียมตัวอย่างโดยสกัดตัวอย่างด้วย 0.01 M โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิด 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำปราศจากไอออน และอะซิโตไนไตรล์ (95:5) ใช้คอลัมน์ชนิด C₁₈ และสถานะของแมสสเปคโตรเมทรีแบบ ESI positive mode ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนนิซิลลิน พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน อยู่ในช่วง 0.9961 – 0.9998 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ เท่ากับ 0.05 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารกลุ่มเพนนิซิลลิน ที่ระดับ 0.08, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในช่วงร้อยละ 86.13 – 101.25, 87.56 – 97.72 และ 84.81 – 93.74 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน ที่ระดับ 0.08, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 2.92 – 7.85, 2.16 – 7.81 และ 1.24 – 7.07 ตามลำดับ และทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน ที่ระดับ 0.08, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 3.14 – 8.18, 2.00 – 7.41 และ 10.80 ตามลำดับ จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสารกลุ่มเพนนิซิลลินในอาหารสัตว์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารสัตว์

คำสำคัญ : แอมพิซิลลิน, ออกซาซิลลิน, คลอกซาซิลลิน, นาฟซิลลิน, ไดคลอกซาซิลลิน, อะม็อกซิซิลลิน, เพนนิซิลลิน จี, เพนนิซิลลิน วี, การทดสอบความใช้ได้, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Siriwat Rainasuk Sunee Kanapipat Saowaree Udompun Ratchanok Tong-on

Abstract

In-house method for the determination of 8 compounds of Penicillins: Ampicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin, Dicloxacillin, Amoxicillin, Penicillin G and Penicillin V in animal feed with LC-MS/MS was validated according to EURACHEM Guide. The samples were extracted with 0.01 M Potassium dihydrogen phosphate and analyzed by LC-MS/MS. The analysis was carried out using the mobile phase of 0.1 % formic acid in Deionization and acetonitrile (95:5) on a C₁₈ column and ESI positive mode of mass spectrometry condition. The results of method validation of Penicillins were found that the calibration curve at the level 0.08 - 1.00 mg/kg were good linear; correlation coefficient of Penicillins were between 0.9961 – 0.9998. Limit of Detection and Limit of Quantitation were 0.05 and 0.08 mg/kg, respectively. The mean % recovery of Penicillins at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg were between 86.13 - 101, 87.56 – 97.72 and 84.81 – 93.74, respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg of Penicillins were between 2.92 – 7.85%, 2.16 – 7.81% and 1.24 – 7.07%, respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility at the level 0.08, 0.50 and 1.00 mg/kg of Penicillins were between 3.14 – 8.18%, 2.00 – 7.41% and 2.36 – 10.80%, respectively. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of Penicillins at the level 0.08 - 1.00 mg/kg in animal feed.

Keywords : Ampicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin, Dicloxacillin, Amoxicillin, Penicillin G, Penicillin V , method validation, animal feed

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

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนิซิลลินในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS

ศิริวัฒน์ رایณะสุข สุนีย์ คณาพิพัฒน์ เสาวรี อุดมพันธ์ รัชนก ทองอ่อน

บทนำ

สารกลุ่มเพนิซิลลิน มีโครงสร้างทางเคมีที่เรียกว่า เบต้าแลคแทมริง (Beta lactam ring) โดยมีแหล่งกำเนิดมาจากเชื้อราที่ชื่อว่า *Penicillium* กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน โดยเข้าไปยับยั้งการสร้างสารเปปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งเป็นตัวประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้การสร้างผนังเซลล์ในแบคทีเรียหยุดชะงัก ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือแพร่พันธุ์ได้ ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด นิยมใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย เช่น การติดเชื้อในช่องปาก คอ ปอด หูชั้นกลาง (หูติดเชื้อ/หูน้ำหนวก) หลอดลม (หลอดลมอักเสบ) และ ระบบทางเดินอาหาร (ลำไส้อักเสบ) เป็นต้น

ยากกลุ่มนี้จะทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์แตกและแบคทีเรียจะตายทันที ยา กลุ่มนี้ จึงจัดเป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียโดยตรง (Bactericidals) ยากลุ่มนี้จะมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอ่อนแอ กว่าแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อแบคทีเรียสามารถดื้อต่อยากลุ่มเพนิซิลลินได้โดยเชื้อจะสร้างเอนไซม์เพนิซิลลินเนส (Penicillinase) ขึ้นมาทำลายยา

ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเพนิซิลลินในการเลี้ยงสัตว์ เพื่อป้องกันโรค ตลอดจนช่วยให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี โดยมีการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์หรือน้ำที่ให้สัตว์ดื่มกิน ดังนั้นเพื่อป้องกันปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งสามารถแพร่กระจายไปยังมนุษย์ได้ จึงจำเป็นต้องใช้ให้เหมาะสมตรงกับชนิดของโรคที่จะรักษา และระยะเวลาการรักษาที่ต่อเนื่องเพียงพอ จึงจะได้ผลดีช่วยยับยั้งการแพร่ของเชื้อโรคได้

ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนา และ ทดสอบ ความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนิซิลลินในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS และเพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล จึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนิซิลลิน จำนวน 8 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย สารแอมพิซิลลิน (Ampicillin), สารออกซาซิลลิน (Oxacillin), สารคลอกซาซิลลิน (Cloxacillin), สารนาฟซิลลิน (Nafcillin), สารไดคลอกซา-ซิลลิน (Dicloxacillin), สารอะม็อกซิซิลลิน (Amoxicillin), สารเพนิซิลลิน จี (Penicillin G) และสารเพนิซิลลิน วี (Penicillin V) ในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ อ้างอิงวิธีทดสอบจาก Journal of Analytica Chimica Acta 586 (2007) โดยดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM (EURACHEM, 2014) เพื่อแสดงว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธี และทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนิซิลลินในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธี และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนิซิลลิน จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ สารแอมพิซิลลิน (Ampicillin), สารคลอกซาซิลลิน (Cloxacillin), สารไดคลอกซาซิลลิน (Dicloxacillin), สารนาฟซิลลิน (Nafcillin), สารออกซาซิลลิน (Oxacillin), สารอะม็อกซิซิลลิน (Amoxicillin), สารเพนิซิลลิน จี (Penicillin G) และสารเพนิซิลลิน วี (Penicillin V) ในอาหารสัตว์ (ใช้อาหารสุกรเป็นตัวแทน) ด้วยวิธี LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีทดสอบสารกลุ่มเพนิซิลลินในอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS

3.2 ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ

ISO/IEC 17025:2017

3.3 ใช้ในการเฝ้าระวังการเข้ายาปฏิชีวนะในระบบการผลิตสินค้าปศุสัตว์ เพื่อลดปัญหาเชื้อดื้อยา

4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

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

4.1.1 ทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.08, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน 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 ทดสอบ Fortified Sample ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน ให้มีความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 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 โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 และ Ion ratio ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด หากไม่ได้ ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.2.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความ

เข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาประเมินความแม่นยำและความเที่ยงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3 การทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.3.1 ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) ของวิธีทดสอบ โดยทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified Sample ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (with-in laboratory reproducibility) ของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน ทดสอบต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน แต่ละวันจะทำการทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 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

4.4 การทดสอบ Selectivity และ Specificity

4.4.1 เตรียมตัวอย่าง Sample blank จำนวน 3 ซ้ำ

4.4.2 เตรียมตัวอย่าง Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มเพนนิซิลลิน ความเข้มข้นที่ระดับ 0.08 (LOQ) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

4.4.3 เตรียมตัวอย่าง Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มเพนนิซิลลิน ความเข้มข้นที่ระดับ 0.08 (LOQ) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มเซฟาโลสปอริน ซึ่งสงสัยว่าจะรบกวนการทดสอบ ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

4.4.4 นำตัวอย่างข้อ (4.4.1-4.4.3) วิธีทดสอบสารกลุ่มเพนนิซิลลินในอาหารสัตว์ด้วยวิธี LC-MS/MS

4.4.5 เปรียบเทียบสัญญาณของ Sample blank (ข้อ 4.4.1) และ Fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มเพนนิซิลลิน ว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใน matrix ของ Sample blank

4.4.6 เปรียบเทียบผลการทดสอบ Fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มเพนนิซิลิน กับ Spike sample (ข้อ 4.4.3) ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มเพนนิซิลิน และเติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่มเซฟาโลสปอริน ว่าพบ Peak ของสารกลุ่มเซฟาโลสปอรินที่ตำแหน่ง Retention time เดียวกันกับสารกลุ่มเพนนิซิลินหรือไม่ หรือมี Peak ของสารกลุ่มเซฟาโลสปอรินบวกรวม Peak ของสารกลุ่มเพนนิซิลินหรือไม่

แผนผังขั้นตอนการทดสอบสารกลุ่มเพนนิซิลิน ในอาหารสุกร ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

Sample 10.00 g $\pm$ 0.05 g



0.01M KH_2PO_4 50 ml

- Shake 30 min

- Centrifuge 10 min, 3,500 rpm, 25 °C

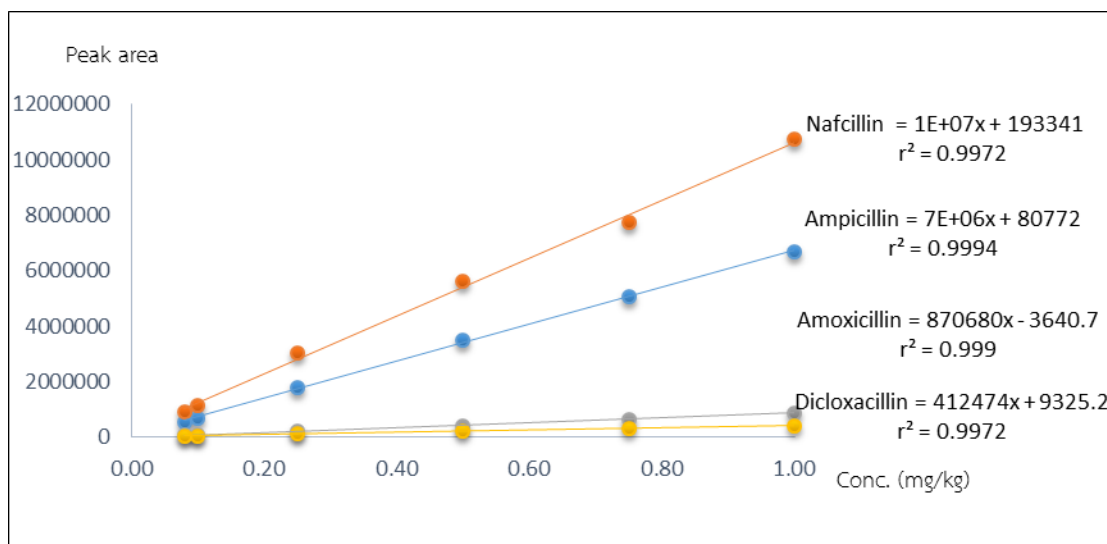


LC- MS/MS

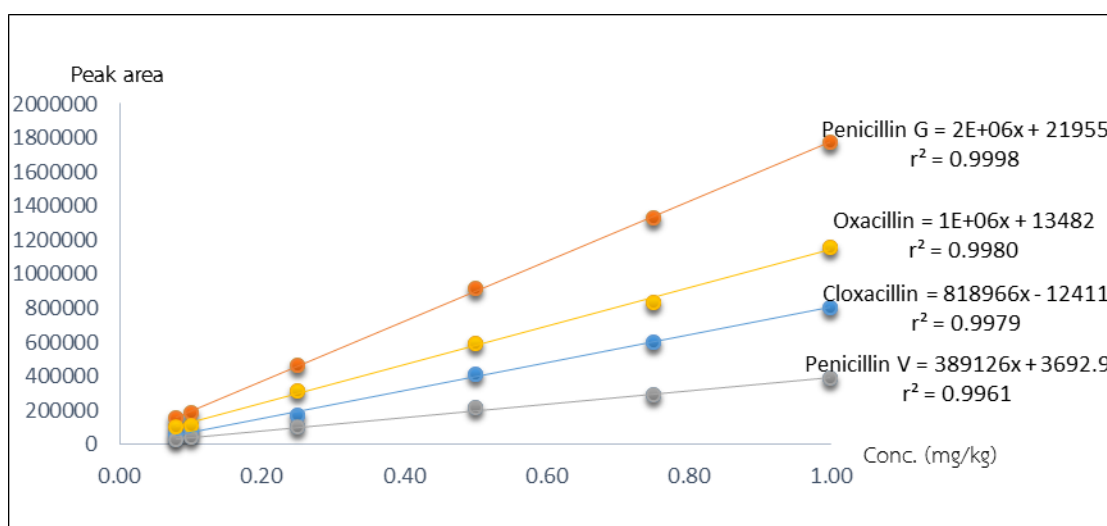
5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (Working range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนนิซิลิน ในช่วงความเข้มข้น 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample และพื้นที่ใต้พีค (Peak area) ของสารกลุ่มเพนนิซิลิน เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี เหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ดังรูปที่ 1 – 2



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ที่ 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area ของสารนาฟซิลลิน, สารแอมพิซิลลิน, สารอะม็อกซิ-ซิลลิน และสารไคลลอกซาซิลลิน



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ที่ 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area ของสารเพนนิซิลลิน จี, สารออกซาซิลลิน, สารคลอกซาซิลลิน และสารเพนนิซิลลิน วี

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

5.2.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน โดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ขั้ว คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก $LOD = 3S'_0$ และ $LOQ = 10S'_0$ พบว่ามีค่าดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารสารกลุ่มเพนนิซิลลิน

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.10 mg/kg							
	Ampicillin		Oxacillin		Cloxacillin		Nafcillin	
	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery
1	0.108	108.00	0.095	95.00	0.104	104.00	0.100	100.00
2	0.107	107.00	0.095	95.00	0.105	105.00	0.100	100.00
3	0.101	101.00	0.085	85.00	0.098	98.00	0.100	100.00
4	0.103	103.00	0.093	93.00	0.104	104.00	0.093	93.00
5	0.106	106.00	0.101	101.00	0.104	104.00	0.099	99.00
6	0.101	101.00	0.100	100.00	0.105	105.00	0.106	106.00
7	0.107	107.00	0.094	94.00	0.108	108.00	0.091	91.00
8	0.105	105.00	0.085	85.00	0.101	101.00	0.081	81.00
9	0.108	108.00	0.097	97.00	0.108	108.00	0.103	103.00
10	0.108	108.00	0.101	101.00	0.106	106.00	0.093	93.00
mean	0.105	105.40	0.095	94.60	0.104	104.30	0.097	96.60
SD	0.003		0.006		0.003		0.007	
LOD=3S ₀ '	0.006		0.009		0.014		0.004	
LOQ=10S ₀ '	0.020		0.030		0.046		0.013	

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารสารกลุ่มเพนิซิลลิน (ต่อ)

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.10 mg/kg							
	Dicloxacillin		Amoxicillin		Penicillin G		Penicillin V	
	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery
1	0.091	91.00	0.089	89.00	0.086	86.00	0.081	81.00
2	0.096	96.00	0.082	82.00	0.092	92.00	0.092	92.00
3	0.083	83.00	0.089	89.00	0.08	80.00	0.088	88.00
4	0.089	89.00	0.087	87.00	0.089	89.00	0.091	91.00
5	0.093	93.00	0.089	89.00	0.084	84.00	0.085	85.00
6	0.104	104.00	0.088	88.00	0.082	82.00	0.099	99.00
7	0.092	92.00	0.084	84.00	0.087	87.00	0.086	86.00
8	0.083	83.00	0.092	92.00	0.083	83.00	0.086	86.00
9	0.102	102.00	0.093	93.00	0.082	82.00	0.096	96.00
10	0.081	81.00	0.081	81.00	0.084	84.00	0.092	92.00
mean	0.091	91.40	0.087	87.40	0.085	84.90	0.090	89.60
SD	0.008		0.004		0.004		0.005	
LOD=3S ₀ '	0.020		0.014		0.008		0.012	
LOQ=10S ₀ '	0.066		0.046		0.026		0.038	

5.2.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน 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 ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน มีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

5.2.3 ผลการยืนยันความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ Limit of Quantitation; LOQ) ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน ที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่า %Recovery ไม่อยู่ในช่วง 80 – 110 และ %RSD ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ 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 ของสารกลุ่มเพนิซิลลิน มีค่าเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน ที่ระดับ 0.08 มิลลิกรัมต่อ

ลำดับ	LOQ (0.08 mg/kg)							
	Ampicillin		Oxacillin		Cloxacillin		Nafcillin	
	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery
1	0.066	82.50	0.070	87.50	0.074	92.50	0.067	83.75
2	0.069	86.25	0.069	86.25	0.071	88.75	0.068	85.00
3	0.067	83.75	0.072	90.00	0.079	98.75	0.065	81.25
4	0.072	90.00	0.070	87.50	0.08	100.00	0.07	87.50
5	0.068	85.00	0.069	86.25	0.082	102.50	0.067	83.75
6	0.065	81.25	0.071	88.75	0.079	98.75	0.065	81.25
7	0.066	82.50	0.074	92.50	0.082	102.50	0.066	82.50
8	0.071	88.75	0.074	92.50	0.071	88.75	0.068	85.00
9	0.072	90.00	0.068	85.00	0.077	96.25	0.066	82.50
10	0.066	82.50	0.069	86.25	0.084	105.00	0.064	80.00
mean	0.068	85.25	0.071	88.25	0.078	97.38	0.067	83.25
SD	0.003		0.002		0.005		0.002	
%RSD	3.90		3.00		5.88		2.67	
เกณฑ์ % Recovery 80-110 เกณฑ์ %RSD ไม่เกิน 15.44								

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน ที่ระดับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ต่อ)

ลำดับ	LOQ (0.08 mg/kg)							
	Dicloxacillin		Amoxicillin		Penicillin G		Penicillin V	
	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery	Conc. (mg/kg)	%Recovery
1	0.065	81.25	0.077	96.25	0.075	93.75	0.075	93.75
2	0.065	81.25	0.082	102.50	0.072	90.00	0.073	91.25
3	0.067	83.75	0.083	103.75	0.074	92.50	0.070	87.50
4	0.065	81.25	0.079	98.75	0.074	92.50	0.065	81.25
5	0.069	86.25	0.076	95.00	0.074	92.50	0.064	80.00
6	0.065	81.25	0.081	101.25	0.077	96.25	0.075	93.75
7	0.068	85.00	0.081	101.25	0.075	93.75	0.068	85.00
8	0.065	81.25	0.083	103.75	0.072	90.00	0.071	88.75
9	0.069	86.25	0.083	103.75	0.075	93.75	0.066	82.50
10	0.066	82.50	0.083	103.75	0.073	91.25	0.067	83.75
mean	0.066	83.00	0.081	101.00	0.074	92.63	0.069	86.75
SD	0.002		0.003		0.002		0.004	
%RSD	2.58		3.24		2.06		5.81	
เกณฑ์ % Recovery 80-110 เกณฑ์ %RSD ไม่เกิน 15.44								

5.3 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ

5.3.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน 3 ระดับ คือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารสารกลุ่มเพนนิซิลลิน ในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 80 - 110 ตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีทดสอบ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)							
		Ampicillin	Oxacillin	Cloxacillin	Nafcillin	Dicloxacillin	Amoxicillin	Penicillin G	Penicillin V
0.08	80 - 110	99.25	93.00	88.25	86.13	90.38	101.25	98.88	93.25
0.50	80 - 110	91.32	96.02	87.56	93.32	89.28	93.14	97.72	92.30
1.00	80 - 110	84.81	93.74	85.76	91.94	91.29	87.00	92.94	92.89

5.3.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน 3 ระดับ คือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r) ดังตารางที่ 5 และจากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability, n=10)							
		Ampicillin	Oxacillin	Cloxacillin	Nafcillin	Dicloxacillin	Amoxicillin	Penicillin G	Penicillin V
0.08	15.44	2.92	6.28	7.85	6.02	4.92	4.24	6.06	4.78
0.50	11.72	3.39	5.71	5.35	7.81	3.54	2.16	2.63	7.45
1.00	10.56	2.61	2.95	3.73	6.71	7.07	1.24	4.47	6.92

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน 3 ระดับ คือ 0.08 (LOQ), 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_R) ดังตารางที่ 6 และจากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำ

ความเข้มข้น (mg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _R	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (with-in laboratory reproducibility, n=20)							
		Ampicillin	Oxacillin	Cloxacillin	Nafcillin	Dicloxacillin	Amoxicillin	Penicillin G	Penicillin V
0.08	23.38	3.14	5.31	7.17	7.06	6.15	6.63	8.38	5.13
0.50	17.76	4.75	5.19	7.41	6.24	5.94	2.00	6.81	6.46
1.00	16.00	10.80	3.17	8.71	7.64	9.47	2.36	6.70	7.07

5.4 ผลการทดสอบ Selectivity และ Specificity

5.4.1 จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ Sample blank พบว่ามีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มเพนนิซิลลิน แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน Matrix ของ Sample

5.4.2 จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่ม เพนนิซิลลิน กับตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มเพนนิซิลลิน และเติมสารละลายมาตรฐานที่สงสัยที่จะรบกวนคือ สารกลุ่มเซฟาโลสปอริน ได้แก่ สารเซฟไตรอะซอน, สารเซฟโฟธาซิม, สารเซฟไธโอเฟอ และ สารเซฟควิโนม ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง Spike sample พบว่าไม่พบ Peak สารกลุ่มเซฟาโลสปอรินที่ตำแหน่ง Retention time เดียวกับสารกลุ่มเพนนิซิลลิน แสดงว่าสารชนิดนี้ไม่มีผลต่อวิธีทดสอบนี้

6. สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มเพนนิซิลลิน ในตัวอย่างอาหารสัตว์ ด้วยวิธี LC-MS/MS พบว่าผลการทดสอบ Linearity Range และ Working range โดยการทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มเพนนิซิลลิน ในช่วงความเข้มข้น 0.08 - 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี โดยค่า correlation coefficient (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 ค่า limit of detection (LOD) และ ค่า limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.05 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับมีค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016)

จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับทดสอบสารกลุ่มเพนนิซิลลินในอาหารสัตว์ ที่ช่วงความเข้มข้น 0.08 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

7. ข้อเสนอแนะ

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

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายวรวิษฐ์ วรอัศวปติ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสุทธิพร พิริยาน ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และนางฉันทน์ บุรณะไทย รักษาการในตำแหน่งผู้เชี่ยวชาญด้านตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ 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 S. DE Beare, Patrick De Backer .Quantitative determination of Amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. Analytical Chimica Acta.586 (2007), pp. 319-325.

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.