

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค LC-HRMS/MS

ศิริวัฒน์ رایณะสุข สุนีย์ คณาพิพัฒน์ ปิยมิตร เจ๊ะโซ๊ะ กัญฐิกา แสงสายัณห์

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในอาหารสัตว์ จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ สารซาราฟลอกซาซิน, สารเอนโรฟลอกซาซิน, สารซิโนซาซิน, สารไซโปรฟลอกซาซิน, สารนอร์ฟลอกซาซิน, สารดาโนฟลอกซาซิน, สารไมโลซาซิน, สารออฟลอกซาซิน, สารโดฟลอกซาซิน, สารอินอกซาซิน, สารฟลูมิควิน, กรดนาลิดิซิก, กรดออกโอลินิค, สารมาร์โบฟลอกซาซิน, และสารออร์บิฟลอกซาซิน ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นเองภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM เตรียมตัวอย่างโดยการสกัดตัวอย่างด้วยเมทานอลและอะซิโตนไตริล ทดสอบด้วยเครื่อง LC-HRMS/MS โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิด 0.1% กรดฟอร์มิก ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมฟอเมทในน้ำ และ 0.1% กรดฟอร์มิก ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมฟอเมทในเมทานอล ใช้คอลัมน์ชนิด C_{18} และสภาวะของแมสสเปกโตรเมตรีแบบ ESI Positive mode ผลการทดสอบความใช้ได้ พบว่ากราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 50 - 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน อยู่ในช่วง 0.9951 - 0.9986 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้เท่ากับ 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของตัวอย่างที่เติมสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ที่ระดับ 50, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในช่วงร้อยละ 88.80 - 111.40, 98.76 - 110.74 และ 85.10 - 104.31 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ที่ระดับ 50, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 2.55 - 14.94, 3.28 - 11.22 และ 3.54 - 11.13 ตามลำดับ ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ที่ระดับ 50, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในช่วงร้อยละ 3.00 - 14.95, 3.53 - 11.15 และ 3.26 - 10.74 ตามลำดับ จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ พบว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในอาหารสัตว์ ที่ระดับความเข้มข้น 50 - 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

คำสำคัญ : ซาราฟลอกซาซิน, เอนโรฟลอกซาซิน, ซิโนซาซิน, ไซโปรฟลอกซาซิน, นอร์ฟลอกซาซิน, ดาโนฟลอกซาซิน, ไมโลซาซิน, ออฟลอกซาซิน, โดฟลอกซาซิน, อินอกซาซิน, ฟลูมิควิน, กรดนาลิดิซิก, กรดออกโอลินิค, มาร์โบฟลอกซาซิน, ออร์บิฟลอกซาซิน, การทดสอบความใช้ได้, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

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

Siriwat Rainasuk Sunee Kanapipat Piyamin Jasoh Kantika Sangsayunh

Abstract

In-house method for the determination of 15 compounds of Fluoroquinolones: Sarafloxacin, Enrofloxacin, Cinoxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Danofloxacin, Miloxacin, Ofloxacin, Difloxacin, Enoxacin, Flumequine, Nalidixic acid, Oxolinic acid, Marbofloxacin and Orbifloxacin in animal feed with LC-HRMS/MS was validated according to EURACHEM Guide. The samples were extracted with methanol and acetonitrile and analyzed by LC-HRMS/MS. The analysis was carried out using the mobile phase of 0.1 % formic acid in 10 mM ammonium formate in water and 0.1 % formic acid in 10 mM ammonium formate in methanol 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 50 – 1,000 µg/kg, showed that were good linear. Coefficient of determination of Fluoroquinolones were between 0.9951 – 0.9986. Limit of Detection and Limit of Quantitation were 25 and 50 µg/kg, respectively. The mean % recovery of Fluoroquinolones the level 50, 500 and 1,000 µg/kg were between 88.80 – 111.40, 98.76 – 110.70 and 85.10 – 104.31, respectively. The relative standard deviations of the repeatability at the level 50, 500 and 1,000 µg/kg of Fluoroquinolones were between 2.55 – 14.94%, 3.28 – 11.22% and 3.54 – 11.13%, respectively and the relative standard deviations of the with-in laboratory reproducibility of Fluoroquinolones at the level 50, 500 and 1,000 µg/kg were between 3.00 – 14.95%, 3.53 – 11.15% and 3.26 – 10.74%, respectively. The results of performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of Fluoroquinolones in animal feed at the level 50 – 1,000 µg/kg.

Keywords: Sarafloxacin, Enrofloxacin, Cinoxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Danofloxacin, Miloxacin, Ofloxacin, Difloxacin, Enoxacin, Flumequine, Nalidixic acid Oxolinic acid, Marbofloxacin, Orbifloxacin, validation, Animal feed

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

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค LC-HRMS/MS

ศิริวัฒน์ رایณะสุข สุนีย์ คณาพิพัฒน์ ปิยมินทร์ เจ๊ะโซ๊ะ กัญฐิกา แสงสายัณห์

บทนำ

สารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones) เป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน ซึ่งเป็นกลุ่มยาที่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี ยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนรุ่นแรก เช่น Nalidixic acid, Oxolinic acid และ 4-quinolone ต่อมามีการเติม fluorine ในสูตรโครงสร้างเดิมของ Quinolones เรียกสารที่ได้ในกลุ่มนี้ว่า Fluoroquinolones ตัวอย่างยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ Sarafloxacin, Enrofloxacin, Cinoxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Danofloxacin, Miloxacin, Ofloxacin, Difloxacin, Enoxacin, Flumequine, Nalidixic acid, Oxolinic acid, Marbofloxacin และ Orbifloxacin เป็นต้น

โรคที่ใช้ยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนรักษา เช่น โรคติดเชื้อทางระบบสืบพันธุ์ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เป็นต้น อย่างไรก็ตามยาในกลุ่มนี้บางตัวทำให้เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์ร้ายแรง ได้แก่ เกิดพิษต่อตับ (Hepatotoxicity) มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system) ระบบผิวหนัง (Skin reaction) มีผลต่อระบบหัวใจ (Cardiovascular system) ทำให้เกิดอาการ QT interval prolongation และ dysrhythmic มีผลต่อระบบกล้ามเนื้อ (Musculoskeletal) ทำให้เกิดอาการ Arthropathy อาการ Tender disorder และ Tender rupture รวมทั้งอาจทำลายกัฏกร่อนกระดูกอ่อนได้ และมีพิษต่อไต (Nephrotoxicity) จึงเพิกถอนการใช้ยาดังกล่าวในสัตว์เพื่อการบริโภค

ดังนั้นการทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ในอาหารสัตว์จึงจำเป็นต้องใช้วิธีที่น่าเชื่อถือ แต่เนื่องจากยังไม่มีวิธีมาตรฐาน ทางห้องปฏิบัติการงานพิษวิทยาและชีวเคมีจึงได้พัฒนาวิธีทดสอบและต้องดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones) จำนวน 15 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย สารซาราฟลอกซาซิน (Sarafloxacin), สารเอนโรฟลอกซาซิน (Enrofloxacin), สารซิโนซาซิน (Cinoxacin), สารไซโปรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin), สารนอร์ฟลอก-ซาซิน (Norfloxacin), สารดาโนฟลอกซาซิน (Danofloxacin), สารไมโลซาซิน (Miloxacin), สารออฟ-ฟลอกซาซิน (Ofloxacin), สารไดฟลอกซาซิน (Difloxacin), สารอีโนกซาซิน (Enoxacin), สารฟลู-มีควิน (Flumequine), กรดนาลิดิซิก (Nalidixic acid), กรดออกโซลินิก (Oxolinic acid), สารมาร์โบ-ฟลอกซาซิน (Marbofloxacin) และสารออร์บิฟลอกซาซิน (Orbifloxacin) ในอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค LC-HRMS/MS โดยยึดแนวทางการทดสอบความใช้ได้ตามวิธีของ EURACHEM(2014)

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธี และทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในอาหารสัตว์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones) จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ สารซาราฟลอกซาซิน (Sarafloxacin), สารเอนโรฟลอกซาซิน (Enrofloxacin), สารซิโนซาซิน

(Cinoxacin), สารไซโปรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin), สารนอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin), สารดาโนฟลอกซาซิน (Danofloxacin), สารมิโลซาซิน (Miloxacin), สารออฟลอกซาซิน (Ofloxacin), สารดิฟลอกซาซิน (Difloxacin), สารอีโนกซาซิน (Enoxacin), สารฟลูมีควิน (Flumequine), กรดนาลิดิซิก (Nalidixic acid), กรดออกโซลินิก (Oxolinic acid), สารมาร์โบฟลอกซาซิน (Marbofloxacin) และสารออร์บิฟลอกซาซิน (Orbifloxacin) ในอาหารสัตว์ (ใช้อาหารไก่และอาหารสุกรเป็นตัวแทน) ด้วยเทคนิค LC-HRMS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค LC-HRMS/MS

3.2 ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น และใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017

4. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

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

4.1.1 ทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 50, 100, 250, 500, 750 และ 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.2 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนและพื้นที่ใต้พีค (Peak area)

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

4.2.1 ทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ให้มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (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 ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จาก ข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า Signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 และ Ion ratio ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.2.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารแต่ละชนิดที่คำนวณได้จาก ข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำแล้วนำความ

เข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ มาประเมินความแม่นยำและความเที่ยงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3 การทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบดังนี้

4.3.1 ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (Repeatability) ของวิธีทดสอบ โดยทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโน-โลน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 50(LOQ), 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (Within laboratory reproducibility) ของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกันทดสอบต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน แต่ละวันจะทำการทดสอบตัวอย่าง Sample blank และ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโน-โลน 3 ระดับความเข้มข้นคือ 50(LOQ), 500 และ 1,000 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 คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

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

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

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 ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มฟลูออโรควิโน-โลน ความเข้มข้นที่ระดับ 50 (LOQ) ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

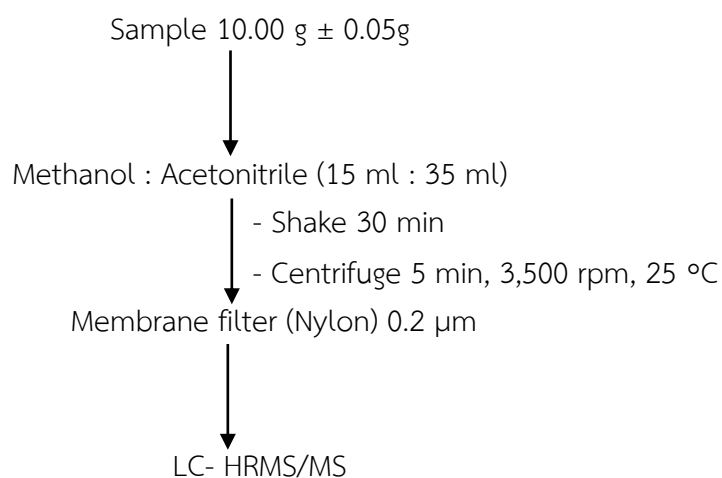
4.4.3 เตรียมตัวอย่าง Fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มฟลูออโรควิโน-โลน ความเข้มข้นที่ระดับ 50(LOQ) ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเติมสารละลายมาตรฐานสารไดเอทิล-สติลเบสทรอล (Diethylstilbestrol) ซึ่งสงสัยว่าจะรบกวนการทดสอบ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ

4.4.4 นำตัวอย่างข้อ (4.4.1-4.4.3) วิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโน-โลน ในอาหารสัตว์ด้วยวิธี LC-MS/MS

4.4.5 เปรียบเทียบสัญญาณของ Sample blank (ข้อ 4.4.1) และ Fortified sample (ข้อ 4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มฟลูออโรควิโน-โลน ว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใน matrix ของ Sample blank

4.4.6 เปรียบเทียบผลการทดสอบ Fortified sample (ข้อ4.4.2) ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่ม ฟลูออโรควิโนโลน กับ Spike sample (ข้อ4.4.3) ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่ม ฟลูออโรควิโนโลน และเติมสารละลายมาตรฐานสารไดเอทิลสตีลเบสทรอล ว่าพบ Peak ของสารไดเอทิลสตีลเบสทรอล ที่ตำแหน่ง Retention time เดียวกันกับสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน หรือไม่ หรือมี Peak ของสารไดเอทิลสตีลเบสทรอล รบกวน Peak ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน หรือไม่

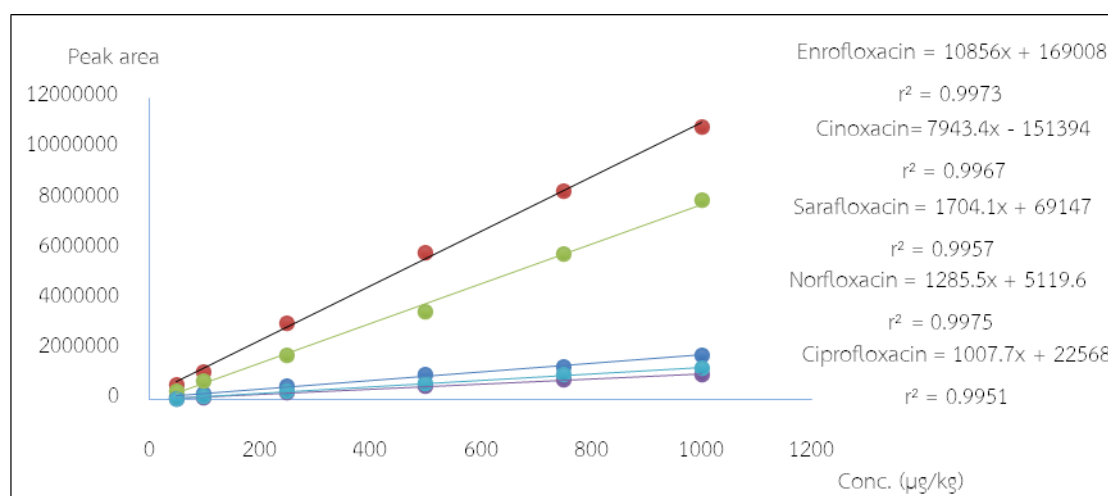
แผนผังขั้นตอนการสกัดตัวอย่างก่อนทดสอบด้วย LC-HRMS/MS



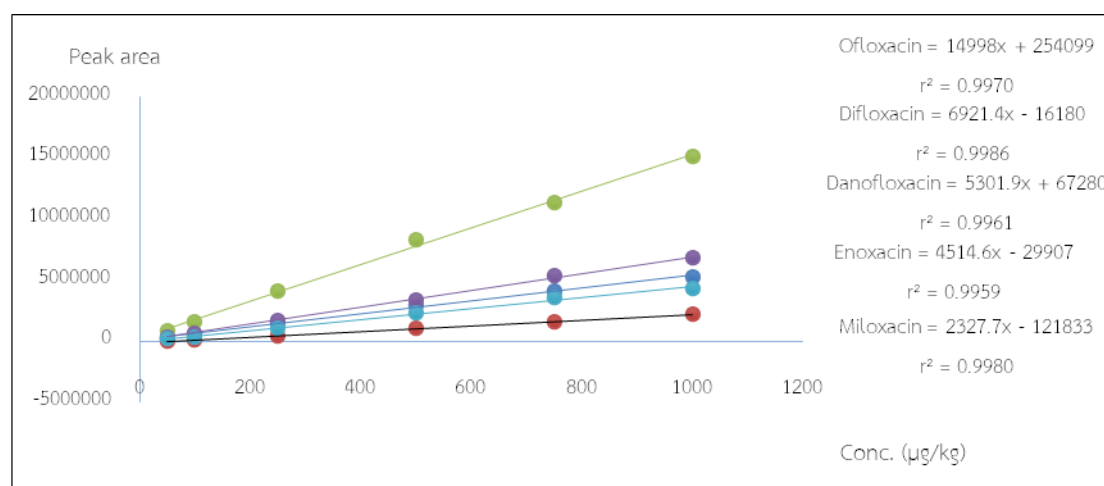
5. ผลการทดสอบ

5.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน และการทดสอบช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (Working range)

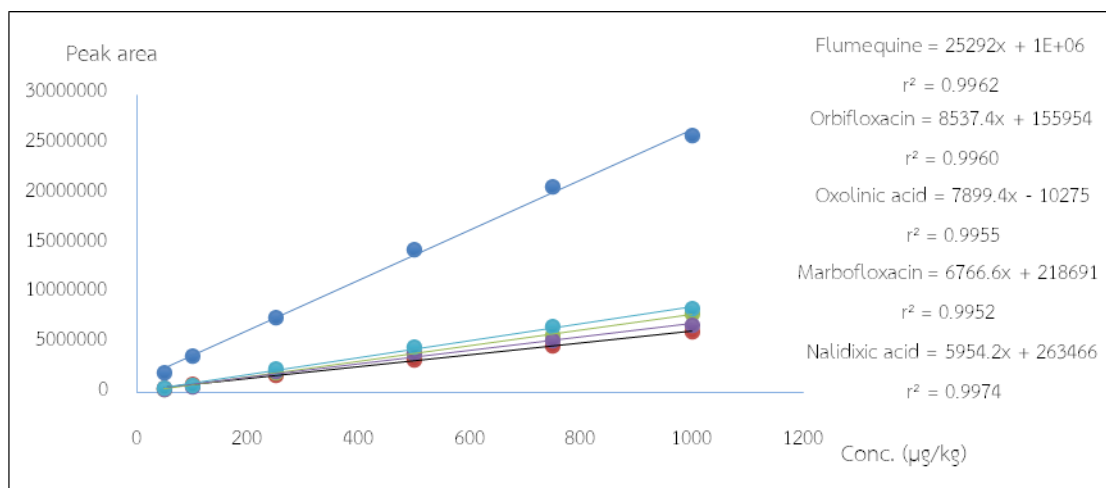
จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ในช่วงความเข้มข้น 50 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample และพื้นที่ใต้พีค (Peak area) ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of determination; r^2) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 50 – 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ดังรูปที่ 1 – 3



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างเข้มข้นของ Fortified sample ที่ 50 - 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area ของสารกลุ่ม Fluoroquinolones



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างเข้มข้นของ Fortified sample ที่ 50 - 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area สารกลุ่ม Fluoroquinolones (ต่อ)



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างเข้มข้นของ Fortified sample ที่ 50 - 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Peak area สารกลุ่ม Fluoroquinolones (ต่อ)

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

5.2.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน โดยทดสอบตัวอย่างที่เดิมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ข้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก $LOD = 3S'_0$ และ $LOQ = 10S'_0$ พบว่ามีค่าดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

ลำดับ	Sarafloxacin		Enrofloxacin		Cinoxacin	
	Conc. (µg/kg)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. (µg/kg)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. (µg/kg)	%Recovery (60 - 115%)
1	44	88	44	88	53	106
2	49	98	49	98	51	102
3	47	94	40	80	47	94
4	55	110	42	84	50	100
5	57	114	42	84	51	102
6	50	100	43	86	55	110
7	48	96	49	98	54	108
8	55	11	48	96	54	108
9	54	108	39	78	47	94
10	43	86	36	72	53	106
avg.	50.20	90.50	43.20	86.40	51.50	103.00
SD	4.87		4.39		2.84	
S'_0	3.44		3.11		2.01	
$LOD=3S'_0$	10.33		9.32		6.02	
$LOQ=10S'_0$	34.45		31.06		20.07	

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (ต่อ)

ลำดับ	Ciprofloxacin		Norfloxacin		Danofloxacin	
	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)
1	55	110	54	108	56	112
2	53	106	55	110	55	110
3	55	110	49	98	48	96
4	50	100	50	100	44	88
5	48	96	40	80	47	94
6	56	112	45	90	47	94
7	57	114	54	108	48	96
8	55	110	52	104	51	102
9	53	106	53	106	46	92
10	43	86	43	86	54	108
avg.	52.50	105.00	49.50	99.00	49.60	99.20
SD	4.33		5.19		4.14	
S_0'	3.06		3.67		2.93	
$\text{LOD}=3S_0'$	9.18		11.01		8.79	
$\text{LOQ}=10S_0'$	30.60		36.70		29.29	

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (ต่อ)

ลำดับ	Miloxacin		Ofloxacin		Difloxacin	
	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)
1	48	96	48	96	38	76
2	44	88	46	92	44	88
3	42	84	39	78	40	80
4	40	80	52	104	48	96
5	55	110	46	92	37	74
6	45	90	51	102	39	78
7	41	82	36	72	34	68
8	51	102	41	82	46	92
9	35	70	40	80	47	94
10	47	94	56	112	49	98
avg.	44.80	89.60	45.50	91.00	42.20	84.40
SD	5.77		6.43		5.25	
S_0'	4.08		4.55		3.71	
$\text{LOD}=3S_0'$	12.24		13.65		11.13	
$\text{LOQ}=10S_0'$	40.80		45.49		37.09	

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (ต่อ)

ลำดับ	Enoxacin		Flumequine		Nalidixic acid	
	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)
1	53	106	50	100	55	110
2	39	78	50	100	47	94
3	50	100	43	86	57	114
4	45	90	38	76	39	78
5	51	102	46	92	53	106
6	56	112	45	90	45	90
7	53	106	49	98	45	90
8	55	110	34	68	44	88
9	45	90	38	76	34	68
10	34	68	32	64	53	106
avg.	48.10	96.20	42.50	85.00	47.20	94.40
SD	7.23		6.64		7.35	
S_0'	5.11		4.69		5.19	
$\text{LOD}=3S_0'$	15.34		14.08		15.58	
$\text{LOQ}=10S_0'$	51.15		46.93		51.94	

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (ต่อ)

ลำดับ	Oxolinic acid		Marbofloxacin		Orbifloxacin	
	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (60 - 115%)
1	47	94	49	98	57	114
2	53	106	47	94	57	114
3	44	88	55	110	46	92
4	46	92	50	100	54	108
5	54	108	48	96	51	102
6	48	96	55	110	55	110
7	31	62	55	110	46	92
8	55	110	43	86	48	96
9	47	94	44	88	40	80
10	57	114	56	112	53	106
avg.	48.20	96.40	50.20	100.40	50.70	101.40
SD	7.47		4.83		5.58	
S_0'	5.28		3.41		3.94	
$\text{LOD}=3S_0'$	15.84		10.24		11.83	
$\text{LOQ}=10S_0'$	52.79		34.12		39.45	

5.2.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ที่ 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า $S/N < 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision จึงทำการปรับค่า LOD ที่ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า $S/N < 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision จึงทำการปรับค่า LOD อีกครั้ง ที่ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการยืนยันค่า LOD ที่ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า $S/N \geq 3$ และผลต่างร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ European Commission Decision ดังนั้นค่า LOD ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน มีค่าเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 2

5.2.3 ผลการยืนยันความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ Limit of Quantitation; LOQ) ที่ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 60 – 115 % และ %RSD ไม่เกิน 16.57 % ตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) ดังนั้นค่า LOQ ของสารกลุ่ม ฟลูออโรควิโนโลน มีค่าเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ที่ระดับ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	Sarafloxacin		Enrofloxacin		Cinoxacin		Ciprofloxacin		Norfloxacin	
	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR
1	22.06	-16.21	72.89	2.77	26.14	17.12	19.36	-16.66	65.25	-16.22
2	23.6	0.00	155.28	2.86	129.93	-10.4	47.47	4.11	19.39	-19.99
3	27.75	2.30	142.79	0.06	104.13	-5.46	15.14	-17.19	107.25	-4.15
4	19.56	-10.25	10603.63	2.96	105.52	-1.67	16.97	6.94	19.19	0.56
5	65.7	-3.44	155.54	5.44	98.55	-8.94	161.15	6.07	1950.11	-24.36
6	19.88	-6.96	123.54	1.71	17.55	-7.07	75.5	-5.4	33.17	-15.96
7	28.99	-13.96	79.54	2.24	25.88	-14.55	111.54	13.59	29.5	1.96
8	25.71	-3.17	84.54	9.54	34.55	-11.14	132.54	0.5	45.55	-18.29
9	42.55	-4.32	122.78	4.1	170.66	-6.33	17.25	-8.42	49.51	-18.59
10	32.25	-17.45	154.57	-8.84	102.3	-0.63	35.57	2.51	105.55	-4.78

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ที่ระดับ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ต่อ)

ลำดับ	Danofloxacin		Miloxacin		Ofloxacin		Difloxacin		Enoxacin	
	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR
1	96.47	-10.83	295.13	-2.58	40.49	-5.26	283.23	-3.81	170.56	12.82
2	154.82	-19.73	364.64	-9.32	123.61	-2.33	59.52	-0.50	101.96	-15.97
3	81.41	4.77	415.63	11.12	50.42	-5.4	1379.86	2.93	27.76	-5.69
4	63.32	4.77	328.59	-0.41	58.54	-2.03	34.74	8.05	33.47	-4.75

5	106.09	-12.31	398.81	13.12	78.0	-3.62	39.81	7.60	19.80	14.97
6	73.03	-11.36	269.04	-8.06	78.54	-3.05	26.5	-12.38	55.39	-8.78
7	119.27	-2.42	387.96	-4.44	109.25	-0.45	85.17	1.4	28.18	0.5
8	49.23	-0.15	374.31	8.45	100.22	4.36	39.31	-6.52	38.31	6.57
9	110.14	-10.72	492.74	8.67	98.51	5.67	33.07	0.55	42.13	22.27
10	102.28	-13.06	418.57	19.7	74.54	0.94	93.39	6.67	20.46	-8.84

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ที่ระดับ 25 ไมโครกรัม ต่อκιโลกรัม (ต่อ)

ลำดับ	Flumequine		Nalidixic acid		Oxolinic acid		Marbofloxacin		Orbifloxacin	
	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR	S/N	% IR
1	16836.02	0.97	381.89	-10.36	225.92	-9.51	26.14	-11.59	256.4	-8.67
2	1776.00	-2.78	36.85	-14.31	60.81	0.07	129.93	-11.25	47.96	-4.76
3	444.96	-5.89	154.54	-21.99	23.06	-9.33	104.13	0.27	156.36	1.92
4	1627.89	-5.33	155.55	-19.40	649.96	8.40	54.15	6.16	225.97	-2.17
5	1850.97	-5.89	754.2	-11.06	225.92	-9.48	61.75	4.55	85.01	-2.62
6	886.67	-10.06	145.2	-15.13	292.92	-15.67	19.91	-6.70	27.55	-5.10
7	210.71	0.97	78.51	-13.89	196.75	-4.44	25.71	-10.25	140.4	-3.50
8	231.22	-4.45	142.33	-20.26	264.54	-13.28	67.97	-6.23	39.23	2.26
9	554.33	-1.85	12.23	-18.84	800.44	-3.77	101.25	-11.45	1777.05	-5.56
10	1014.55	0.97	111.2	-10.36	10006.25	5.26	125.25	5.22	77.86	-2.78

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ที่ระดับ 50 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม (ต่อ)

ลำดับ	Oxolinic acid		Marbofloxacin		Orbifloxacin	
	Conc. (µg/kg)	%Recovery (60-115%)	Conc. (µg/kg)	%Recovery (60-115%)	Conc. (µg/kg)	%Recovery (60-115%)
1	44	88	56	112	50	100
2	45	90	47	94	44	88
3	33	66	54	108	49	98
4	35	70	50	100	44	88
5	50	100	56	112	54	108
6	37	74	42	84	49	98
7	38	76	41	82	57	114
8	35	70	53	106	48	96
9	38	76	51	102	47	94
10	36	72	51	102	49	98
mean	39.1	78.2	50.1	100.2	49	98
SD	5.43		5.30		4.01	
%RSD	13.88		10.58		8.19	
เกณฑ์ %Recovery 60 - 115 เกณฑ์ %RSD ไม่เกิน 16.57						

5.3 ผลการทดสอบหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบ

5.3.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธี โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน 3 ระดับ คือ 50 (LOQ), 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีทดสอบ

ความเข้มข้น (µg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)				
		Sarafloxacin	Enrofloxacin	Cinoxacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin
50	60 - 115	93.00	106.80	95.40	106.00	102.40
500	60 - 115	103.86	110.70	104.72	104.46	104.82
1,000	80 - 110	104.31	102.88	102.69	99.57	100.36

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีทดสอบ (ต่อ)

ความเข้มข้น (µg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)				
		Danofloxacin	Miloxacin	Ofloxacin	Difloxacin	Enoxacin
50	60 - 115	98.00	111.40	96.60	98.40	105.80
500	60 - 115	106.58	98.76	106.58	106.66	106.16
1,000	80 - 110	99.25	95.79	99.27	102.63	102.70

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีทดสอบ (ต่อ)

ความเข้มข้น (µg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้ของสาร (%Recovery)				
		Flumequine	Nalidixic acid	Oxolinic acid	Marbofloxacin	Orbifloxacin
50	60 - 115	89.00	91.20	88.80	101.2	106.20
500	60 - 115	100.70	107.58	105.36	105.94	104.74
1,000	80 - 110	102.27	85.10	98.01	99.88	91.97

5.3.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน 3 ระดับ คือ 50 (LOQ), 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz (%PRSD_r) ดังตารางที่ 5 และจากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ

ความเข้มข้น (µg/kg)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability, n=10)				
		Sarafloxacin	Enrofloxacin	Cinoxacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin
50	16.57	14.94	5.67	12.85	5.48	7.12
500	11.72	9.32	3.41	4.48	5.79	5.52
1,000	10.56	4.25	3.54	3.95	4.71	6.32

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ (ต่อ)

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/kg}$)	เกณฑ์การยอมรับ $\%\text{PRSD}_r$	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability, $n=10$)				
		Danofloxacin	Miloxacin	Ofloxacin	Difloxacin	Enoxacin
50	16.57	14.40	2.55	14.54	8.93	5.38
500	11.72	6.52	11.22	4.88	5.35	5.24
1,000	10.56	5.92	6.48	6.62	4.06	6.22

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำ (ต่อ)

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/kg}$)	เกณฑ์การยอมรับ $\%\text{PRSD}_r$	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Repeatability, $n=10$)				
		Flumequine	Nalidixic acid	Oxolinic acid	Marbofloxacin	Orbifloxacin
50	16.57	12.55	14.26	14.76	10.67	5.65
500	11.72	7.51	4.76	5.27	3.28	7.15
1,000	10.56	4.12	9.70	10.18	7.05	11.13

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน 3 ระดับ คือ 50 (LOQ), 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่คำนวณจากสมการ Horwitz ($\%\text{PRSD}_R$) ดังตารางที่ 6 และจากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำ

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/kg}$)	เกณฑ์การยอมรับ $\%\text{PRSD}_r$	ร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (With-in laboratory reproducibility, $n=20$)				
		Sarafloxacin	Enrofloxacin	Cinoxacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin
50	25.11	11.57	5.52	11.77	5.24	6.74
500	17.76	7.66	3.53	7.53	6.24	7.99
1,000	16.00	4.24	3.48	7.21	4.60	6.05

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำ (ต่อ)

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/kg}$)	เกณฑ์การ ยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (With-in laboratory reproducibility, n=20)				
		Danofloxacin	Miloxacin	Ofloxacin	Difloxacin	Enoxacin
50	25.11	10.98	3.00	11.03	7.35	5.85
500	17.76	7.46	9.41	5.53	5.10	7.10
1,000	16.00	5.11	6.98	7.22	3.26	6.87

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทำซ้ำ (ต่อ)

ความ เข้มข้น ($\mu\text{g/kg}$)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (With-in laboratory reproducibility, n=20)				
		Flumequine	Nalidixic acid	Oxolinic acid	Marbofloxacin	Orbifloxacin
50	25.11	14.95	12.82	12.88	9.91	5.36
500	17.76	11.15	7.24	6.56	6.52	8.25
1,000	16.00	4.70	9.60	9.83	9.95	10.74

5.4 ผลการทดสอบ Selectivity และ Specificity

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

5.4.2 จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน กับตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน และเติมสารละลายมาตรฐานที่สงสัยที่จะรบกวน คือ สารไดเอทิลstilbestrol (Diethylstilbestrol) ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง Spike sample พบว่าไม่พบ Peak สารไดเอทิลstilbestrol ที่ตำแหน่ง Retention time เดียวกับสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน แสดงว่าสารชนิดนี้ไม่มีผลต่อวิธีทดสอบนี้

6. สรุปผลการทดสอบ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในตัวอย่างอาหารสัตว์ด้วยวิธี LC-HRMS/MS พบว่าผลการทดสอบ Linearity และ Working range โดยทดสอบ Fortified sample ของสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ในช่วงความเข้มข้น 50 ถึง 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี โดยค่า correlation coefficient (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 ค่า limit of detection (LOD) และค่า limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ มีค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016)

จากผลการทดสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับทดสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ในอาหารสัตว์ ที่ช่วงความเข้มข้น 50 – 1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการทดสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและเที่ยงยิ่งขึ้น

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณนายวรวิชัย วราอศวปติ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสุทธิพร พิริยาน ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ นางฉันทน์ บุรณะไทย รักษาการในตำแหน่งผู้เชี่ยวชาญด้านตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ส่วนบริหารจัดการห้องปฏิบัติการที่ดำเนินงานจัดหาวัสดุอุปกรณ์ 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 G. Maigorzata, P. Andrzej, G. Anna. Simultaneous determination of fluoroquinolones in feed by liquid chromatography with fluorescence detection. Bull Vet Inst Pulawy 56 (2012), pp 343 - 347

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.