

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

มัทนา บุญภักดี ประภาพร แยบดี รัตติยา สบู่ทอง ธารา ทิพมาน อภิขญา สังข์ทอง

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ โดยออกแบบและดำเนินการตามแนวทางของ Commission Decision 2002/657/EC วิธีนี้สามารถวิเคราะห์แยกชนิดและระบุปริมาณยาสัตว์ตกค้าง Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Flubendazole, Levamisole, Oxfendazole และ Thiabendazole ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งานที่มีความเป็นเส้นตรงผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดย Flubendazole อยู่ในช่วง 25 - 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Levamisole อยู่ในช่วง 5 - 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Oxfendazole และ Thiabendazole อยู่ในช่วง 1 - 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิธีวิเคราะห์นี้มีความไวเพียงพอที่จะวัดปริมาณสารแต่ละชนิดตามค่าเกณฑ์การตัดสินใจผลทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ($cc\alpha$) ของสาร Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Flubendazole, Levamisole, Oxfendazole, และ Thiabendazole เท่ากับ 0.25, 0.27, 0.26, 54.70, 11.80, 0.24 และ 0.37 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่าความแม่นยำและความเที่ยงของยากกลุ่ม Benzimidazoles ผ่านตามเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของ Commission Decision 2002/657/EC วิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้ในการตรวจตามแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ โดยตรวจยืนยันชนิดและปริมาณของสารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

คำสำคัญ: การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Benzimidazoles
กล้ามเนื้อสัตว์ปีก LC-MS/MS

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์
กรมปศุสัตว์

Method Validation of Benzimidazoles in Poultry muscle by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Mathana Boonpakdee Prapaporn Yabdee Rattiya Saboothong Tara Tipman
Apichaya Sungthong

Abstract

The confirmatory method of benzimidazoles in Poultry muscle by LC-MS/MS was validated according to Commission Decision 2002/657/EC which could distinguish and quantify 8 compounds in benzimidazoles group including albendazole, febantel, fenbendazole, flubendazole, levamisole, oxfendazole and thiabendazole. Working range with correlation coefficient greater than 0.995 for all compounds as followed: 25 - 100 microgram per kilogram of flubendazole, 5 – 20 microgram per kilogram of levamisole, 1 – 2.5 microgram per kilogram for albendazole, febantel, fenbendazole, oxfendazole and thiabendazole, respectively. The decision limit of the method at 99 % confidence level for albendazole, febantel, fenbendazole, flubendazole, levamisole, oxfendazole, and thiabendazole were 0.25, 0.27, 0.26, 54.70, 11.80, 0.24 and 0.37 microgram per kilogram, respectively. Precision and accuracy of method were satisfied according to Commission Decision 2002/657/EC criteria. This method can be applied to national residues monitoring program of Department of Livestock Development for determination and quantitatively confirmatory of benzimidazoles in poultry muscle, which fulfils the objective of this experiment.

Keywords: Method Validation of Benzimidazoles Poultry muscle LC-MS/MS

Veterinary public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of livestock Products,
Department of Livestock Development

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม Benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

มัทนา บุญภักดี ประภาพร แยมบัติ รัตติยา สุปุทอง ธารา ทิพมาน อภิขญา สังข์ทอง

บทนำ

สารตกค้าง benzimidazoles จัดอยู่ในกลุ่ม anthelmintics เป็นยาถ่ายพยาธิ ในทางปศุสัตว์ ด้านการรักษาสัตว์ปีก เมื่อผู้บริโภคได้รับสารตกค้างของยา อาจเกิดอันตรายมายังผู้บริโภคได้ โดยมีผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร อาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย ผลจากการทำงานของตับ หากได้รับยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานๆ สามารถก่อให้เกิดภาวะตับอักเสบชนิด granulomatous hepatitis ผลต่อระบบเลือด/ระบบโลหิตอาจเกิดภาวะโลหิตจาง ผลต่อผิวหนัง อาจมีอาการผื่นคัน ลมพิษ ผลต่อระบบประสาท สามารถพบอาการอ่อนแรง และง่วงนอน อาจมีอาการชักเกิดขึ้นได้แต่น้อยราย อย่างไรก็ตามควรให้ความสำคัญกับการให้ความรู้ในการใช้ยาแก่เกษตรกรและให้อยู่ในการกำกับดูแลของสัตวแพทย์อย่างใกล้ชิดเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาสารตกค้างมาสู่ผู้บริโภค โดยกรมปศุสัตว์ได้ออกประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่องกำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์ซึ่งระบุปริมาณสารตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) ที่กำหนดให้พบได้ในสินค้าปศุสัตว์ สำหรับฟลูเบนดาโซล ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสลิวามิโซลในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549) สำหรับสหภาพยุโรป ซึ่งเป็นกลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าปศุสัตว์ไทยรายสำคัญ ได้กำหนดมาตรฐานสารตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ไว้เช่นกันซึ่งมีค่าเท่ากับที่ระบุไว้ในประกาศกรมปศุสัตว์ (European Commission, 2009)

ดังนั้น งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ เห็นความสำคัญในการตรวจสอบสารตกค้างยาสัตว์ benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก จึงได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่มีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้าง เพื่อนำไปใช้เป็นวิธีในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังและตรวจติดตามการตกค้างของยากลับ benzimidazoles ในแผนการเฝ้าระวังประจำปี

1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ว่ามีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้าง และผ่านเกณฑ์ตามแนวมติคณะกรรมการมาตรฐานยุโรป 2002/657/EC

2. ขอบข่าย

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 16 สาร รายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 1 สารมาตรฐาน และ Internal standard กลุ่ม benzimidazoles

ลำดับ	สารมาตรฐาน (Standard)	Internal standard
1	albendazole	albendazole-D ₃
2	febantel	febantel-D ₆
3	fenbendazole	fenbendazole-D ₃
4	flubendazole	flubendazole-D ₃
5	levamisole	levamisole-D ₅
6	mebendazole	mebendazole-D ₃
7	oxfendazole	oxfendazole-D ₃
8	thiabendazole	thiabendazole ¹³ C ₆

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้ทดสอบวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ว่ามีความเหมาะสมในการใช้ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้าง

3.2 สามารถนำวิธีวิเคราะห์ ไปใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมต่างๆ ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ควบคุมการทำงานด้วยโปรแกรม Analyst software ซึ่งประกอบด้วย

- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 20A ประกอบด้วย pump, degasser, autosampler, column oven และ controller

- Detector ประเภท Triple Quadrupole Mass Spectrometer ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น API 4000

4.1.2 เฟสคงที่ (HPLC column) ยี่ห้อ Phenomenex Luna C18 ขนาด 4.60 x 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร พร้อม Guard Column

4.2 สารเคมี

4.2.1 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ acetonitrile (ACN) และ methanol (MeOH)

4.2.2 สารเคมีเกรด AR ได้แก่ sodium hydroxide (NaOH), ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH), hexane, ethanol(EtOH), dimethyl sulphoxide (DMSO) และ formic acid

4.3 น้ำจัดไอออน (Deionized water หรือ น้ำDI)

4.4 สารมาตรฐาน

4.4.1 สารมาตรฐาน กลุ่ม benzimidazoles ได้แก่ albendazole (ความบริสุทธิ์ 99.00%), febantel (ความบริสุทธิ์ 99.00%), fenbendazole (ความบริสุทธิ์ 98.50%), flubendazole (ความบริสุทธิ์ 99.87%), levamisole hydrochloride (ความบริสุทธิ์ 99.00%), mebendazole (ความบริสุทธิ์ 99.70%), oxfendazole (ความบริสุทธิ์ 98.00%) และ thiabendazole (ความบริสุทธิ์ 98.89%) สารทุกตัวยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ยกเว้นสาร mebendazole ยี่ห้อ Fluka

4.4.2 Internal standard เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ได้แก่ Albendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.30%), febantel-D₆ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.80%), fenbendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.00%), flubendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.00%), levamisole hydrochloride-D₅ (ยี่ห้อ TRC; ความบริสุทธิ์ 98.00%), mebendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.00%), oxfendazole-D₃ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.70%) และ thiabendazole-¹³C₆ (ยี่ห้อ Witega; ความบริสุทธิ์ 99.00%)

4.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (stock solution) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมในตัวทำละลาย dimethyl sulphoxide และเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน (intermediate solution และ working solution) เตรียมโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานตั้งต้นให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ด้วยตัวทำละลาย ethanol โดยการเตรียมสารละลายทุกครั้งจะทำการเจือจางไม่เกิน 100 เท่าและนำสารละลายของแต่ละสาร มาเตรียมโดยแบ่งกลุ่มสารมาตรฐานดังนี้

กลุ่มที่ 1 สารที่มี MRL: levamisole ความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 สารที่มี MRL: flubendazole ความเข้มข้น 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 สารที่ไม่มี MRL: thiabendazole ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 สารที่ไม่มี MRL: albendazole, febantel, fenbendazole, mebendazole และ oxfendazole ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4.6 ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างกล้ำเนื้อไก่ปลอดสาร (blank sample) คือตัวอย่างกล้ำเนื้อไก่ที่ไม่พบสัญญาณในช่วง retention time ของสารกลุ่ม benzimidazoles ทั้งนี้ใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างกล้ำเนื้อสัตว์ปีก

4.7 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

เมื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้ตามเกณฑ์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการยืนยันประสิทธิภาพของวิธี โดยการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ออกแบบและดำเนินการตามขั้นตอนของแนวมติ คณะกรรมาธิการยุโรป Commission Decision 2002/657/EC ข้อ 4.7.1.1-4.7.1.8 และ 4.7.1.10 และตามเกณฑ์ของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ข้อ 4.7.1.9

โดย 1 ชุดการทดสอบประกอบด้วย ตัวอย่างกล้ำเนื้อไก่ปลอดสาร 7 ตัวอย่างที่ไม่ซ้ำกัน นำมาเติมสาร กลุ่ม benzimidazoles ตัวอย่างละ 5 ระดับ ความเข้มข้น 0 MRL/0 PL, 0.5 MRL/1.0 PL, 1.0 MRL/1.5 PL, 1.5 MRL/2.0 PL และ 2.0 MRL/2.5 PL (0, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร levamisole (0, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร flubendazole, (0, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร albendazole, febantel, fenbendazole, mebendazole, oxfendazole และ thiabendazole เพื่อให้ครอบคลุมค่า MRL และเติม internal standard ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ (1ชุด/วัน) รวมเป็นระดับความเข้มข้นละ 21 จำนวนความเข้มข้นของสาร กลุ่ม benzimidazoles ในแต่ละตัวอย่างกล้ำเนื้อไก่ เทียบกับตัวอย่างกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ำเนื้อไก่ (matrix-matched calibration curve) ที่สกัดในชุดการทดสอบเดียวกัน ระดับความเข้มข้นความเข้มข้น 0 MRL/0 PL, 0.5 MRL/1.0 PL, 1.0 MRL/1.5 PL, 1.5 MRL/2.0 PL, 2.0 MRL/2.5 PL, 4 MRL/3 PL และ 8 MRL/6 PL (0, 5, 10, 15, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร levamisole (0, 25, 50, 75, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร flubendazole, (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 และ 6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร albendazole, febantel, fenbendazole, mebendazole, oxfendazole และ thiabendazole เพื่อให้ครอบคลุมค่าปริมาณสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่าง และทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ และเติม internal standard ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

4.7.1 การคำนวณและประเมินตามเกณฑ์ของแต่ละพารามิเตอร์ได้กำหนดในการทดสอบความใช้ได้ ตามแนวนมติยุโรป Commission Decision 2002/657/EC ได้แก่

4.7.1.1 เกณฑ์การตัดสินผลทดสอบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ที่ค่าความคลาดเคลื่อนอัลฟา หรือ $CC\alpha$)

- กรณีสารที่มีค่า MRL (Levamisole และ Flubendazole)

หาโดยการนำค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ 1.0 MRL ทั้ง 21 ซ้ำมาคำนวณดังนี้

$$CC\alpha = \text{ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบ} + 1.64 \times SD$$

4.7.1.2 ค่าความสามารถในการตรวจของวิธีทดสอบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ที่ค่าความคลาดเคลื่อนเบต้า หรือ $CC\beta$)

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64 \times SD$$

- กรณีสารที่ไม่มีค่า MRL (thiabendazole, oxfendazole, mebendazole, albendazole, fenbendazole และ febantel)

หาโดยการสร้างกราฟเส้นตรงของตัวอย่าง และคำนวณ $CC\alpha$ ดังนี้

$$CC\alpha = \mu B + 2.33 \times SD$$

โดย μB = ความเข้มข้นที่กำหนดขึ้นเพื่อหาค่า a_0

a_0 = ค่าความเข้มข้นบนแกน y ที่ลากเส้นกราฟไปตัด (y-axis intercept)

4.7.1.3 ค่าความแม่นยำ (accuracy) พิจารณาจากร้อยละการกลับคืน (recovery)

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (ไม่โครกรัมต่อกิโลกรัม)}}{\text{ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (ไม่โครกรัมต่อกิโลกรัม)}} \times 100$$

4.7.1.4 ค่าความเที่ยง (Precision) ของค่าการทวนซ้ำของการวัด (repeatability) พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ในชุดการทดสอบเดียวกัน (7 ซ้ำ)

4.7.1.5 ค่าความเที่ยง (Precision) ของค่าการทวนซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility) พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ (21 ซ้ำ)

4.7.1.6 ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน linearity of calibration curve) และค่าความเข้มข้นช่วงที่ใช้งาน (working range)

พิจารณาเลือกช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient หรือ r) มากกว่า 0.995 (สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์, 2555) เพื่อ

กำหนดเป็นค่าความเข้มข้นช่วงที่ใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ดังการเตรียมกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ำมเนื้อไก่ 7 ระดับความเข้มข้น ที่กล่าวข้างต้น

4.7.1.7 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (Specificity)

เลือกเติมสารมาตรฐานกลุ่ม carbadox & olaquinox metabolies (เนื่องจากสารมาตรฐานกลุ่ม carbadox & olaquinox metabolies มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับสารกลุ่ม benzimidazoles) โดยเติมสารกลุ่ม carbadox & olaquinox metabolies ทั้งหมด 2 สารลงในตัวอย่างกล้ำมเนื้อไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ถ้าวิธีวิเคราะห์ความจำเพาะต่อสารกลุ่ม benzimidazoles ที่ทำการตรวจวิเคราะห์อยู่ ต้องไม่พบสัญญาณรบกวนของสารมาตรฐานอื่นๆ บริเวณ retention time ของสารกลุ่ม benzimidazoles ทั้ง 8 สาร

4.7.1.8 ความเสถียร (stability) ของสารกลุ่ม benzimidazoles

4.7.1.8.1 ความเสถียรของสารกลุ่ม benzimidazoles ในกล้ำมเนื้อไก่

เตรียมตัวอย่างกล้ำมเนื้อไก่ปลอดสาร 1 ตัวอย่าง น้ำหนัก 1.0 กรัม จำนวน 10 หลอด เติมสารมาตรฐานกลุ่ม benzimidazoles ที่ระดับความเข้มข้น 0.5MRL/1PL (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร levamisole, (ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร flubendazole และ (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับสาร albendazole, febantel, fenbendazole, mebendazole, oxfendazole และ thiabendazole เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ครั้งละ 2 หลอดในสัปดาห์ที่ 0 (วิเคราะห์ทันทีหลังจากเตรียมตัวอย่างเสร็จ) สัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 4 และ สัปดาห์ที่ 20 โดยให้มีค่าความเข้มข้นของสัปดาห์ที่ 0 มีค่าร้อยละการกลับคืนเป็น 100 และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ำมเนื้อไก่ ที่สกัดในชุดการทดสอบเดียวกัน บันทึกค่าความเข้มข้นที่ได้ และคำนวณหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เหลือ โดยพิจารณาว่ามีความเสถียรเมื่อค่าความแม่นยำ (accuracy) จากค่าร้อยละการกลับคืนผ่านเกณฑ์ตามตารางที่ 2

4.7.1.8.2 ความเสถียรของสารกลุ่ม benzimidazoles ในสารละลาย

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นที่เป็น Working solution เตรียมปริมาณมากพอที่จะแบ่งเป็นขวดย่อยได้ประมาณ 40 ขวด ทำการติดฉลากและนำมาทดสอบตามสภาวะและเวลาที่กำหนด ดังตารางที่ 3 เมื่อถึงกำหนดเวลานำสารมาตรฐานที่เก็บไว้ มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ความเข้มข้น 0.5 MRL/1.0 PL (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับสาร levamisole, (ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับสาร flubendazole และ (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับสาร albendazole, febantel, fenbendazole, mebendazole, oxfendazole และ thiabendazole และหาความเข้มข้นที่เหลือเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลายมาตรฐาน ที่เตรียมใหม่วันต่อวัน ระดับความเข้มข้นความเข้มข้น 0

MRL/0 PL, 0.5 MRL/1.0 PL, 1.0 MRL/1.5 PL, 1.5 MRL/2.0 PL, 2.0 MRL/2.5 PL, 4 MRL/3 PL และ 8 MRL/6 PL (0, 5, 10, 15, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับสาร Levamisole (0, 25, 50, 75, 100, 200 และ 400 ต่อมิลลิลิตร) สำหรับสาร flubendazole, (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับสาร albendazole, febantel, fenbendazole, mebendazole, oxfendazole และ thiabendazole ทำการวิเคราะห์ในชุดทดสอบเดียวกันโดยพิจารณาว่ามีความเสถียร เมื่อค่าความแม่นยำ (accuracy) จากค่าร้อยละการกลับคืนผ่านเกณฑ์ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์การประเมินสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ตามแนวมติคณะกรรมการยุโรป
Commission Decision 2002/657/EC

ความเข้มข้นของสาร ในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัม)	ค่าความแม่นยำ (accuracy) ช่วงการยอมรับของ ค่าเฉลี่ยการกลับคืน (ร้อยละ)	ค่าความเที่ยง (precision) (ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน, % CV)	
		ค่าการทวนซ้ำ ของการวัด (repeatability)	ค่าการทำซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility)
น้อยกว่า 1	50-120	ต่ำสุดเท่าที่จะเป็นไปได้	ต่ำสุดเท่าที่จะเป็นไปได้
มากกว่า 1 ถึง 10	70-110	ต่ำสุดเท่าที่จะเป็นไปได้	ต่ำสุดเท่าที่จะเป็นไปได้
10 ถึง 100	80-110	15	23
100 ถึง 1000	80-110	11	16

หมายเหตุ อ้างอิงจากคู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางมติคณะกรรมการยุโรป 2002/657/EC. สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์ .2555 .หน้า 66 -67.

ตารางที่ 3 แผนการทดลองเพื่อศึกษาความเสถียรของสารที่สนใจในรูปสารละลาย

การเก็บรักษา	ระยะเวลาการเก็บรักษา	จำนวนขวด (ขวด)		
		- 20 °C	4 °C	25 °C
เก็บที่มีด	หลังจากเตรียมใหม่	2	2	2
	สัปดาห์ที่ 1	2	2	2
	สัปดาห์ที่ 2	2	2	2
	สัปดาห์ที่ 4	2	2	2
	สัปดาห์ที่ 20	2	2	2
เก็บที่สว่าง	หลังจากเตรียมใหม่	-	-	2
	สัปดาห์ที่ 1	-	-	2
	สัปดาห์ที่ 2	-	-	2
	สัปดาห์ที่ 4	-	-	2
	สัปดาห์ที่ 20	-	-	2

หมายเหตุ จะทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 4 °C เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ใช้เก็บสารมาตรฐานระดับ Stock Solution, Intermediate Solution และ Working Solution

4.7.1.9 การคำนวณและประเมินตามเกณฑ์ของแต่ละพารามิเตอร์ที่ได้กำหนดในการทดสอบความใช้ได้ ตามเกณฑ์ของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ อ้างอิงจาก (Corley, 2003)

4.7.1.9.1 ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจชนิดสารได้ (Minimum Detection Limit หรือ MDL)

หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) ของความเข้มข้นที่ระดับ MRL ของ 3 ชุดการทดสอบ (ทั้งหมด 21 ซ้ำ) และ คำนวณสถิติโดยใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

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

4.7.1.9.2 ค่าต่ำสุดที่สามารถยืนยันปริมาณ (Minimum Quantitation Limit หรือ MQL)

$$MQL = 3 \times MDL$$

4.7.1.10 ทดสอบความทนทานของวิธีทดสอบ (Ruggedness; major change) โดยใช้วิธีวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อไก่ ไปวิเคราะห์ตัวอย่างกล้ามเนื้อเปิดหลอดสาร (Blank sample) จำนวน 7 ตัวอย่าง ที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 1 MRL/1 PL จากนั้นทดสอบหาความแตกต่างทางสถิติของทั้งสองตัวอย่าง โดยใช้ F-test และ t-test

5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ยืนยันชนิดและปริมาณของสารตกค้างกลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีกได้ 7 ชนิด ได้แก่ albendazole, febantel, fenbendazole, flubendazole, levamisole, oxfendazole และ thiabendazole โดยมีความจำเพาะต่อสารทั้ง 7 ชนิด สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ต่ำสุด (MDL) เท่ากับ 0.17, 0.15, 0.18, 3.48, 1.01, 0.13 และ 0.19 µg/kg ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการตัดสินใจว่าสารตกค้างที่ตรวจพบผ่านมาตรฐานหรือไม่ (decision limit, CC_α) เท่ากับ 0.25, 0.27, 0.26, 54.70, 11.80, 0.24 และ 0.37 µg/kg ตามลำดับ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพื่อประเมินความเป็นเส้นตรงของ calibration curve ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ($r \geq 0.995$) ช่วงที่ใช้งาน (working range) Flubendazole อยู่ในช่วง 25 - 100 µg/kg, Levamisole อยู่ในช่วง 5 - 20 µg/kg, Albendazole, Febantel, Fenbendazole, Oxfendazole และ Thiabendazole อยู่ในช่วง 1 - 2.5 µg/kg

ความเสถียรของสารกลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อไก่ พบว่าสาร febantel, fenbendazole, flubendazole, oxfendazole และ thiabendazole สามารถเก็บอยู่ในตัวอย่างที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา 20 สัปดาห์ (5 เดือน) ส่วนสาร albendazole และ levamisole สามารถเก็บอยู่ในตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (1 เดือน)

ความเสถียรของสารกลุ่ม benzimidazoles ในสารละลายพบว่าสาร albendazole, febantel, fenbendazole, flubendazole, levamisole, oxfendazole และ thiabendazole สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา 20 สัปดาห์ (5 เดือน) ส่วนสาร flubendazole ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง ก่อนเติมลงในตัวอย่างเพื่อทำการสกัด เนื่องจากช่วงสัปดาห์ที่ 1-4 % ความเข้มข้นของสารละลายลดลงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสัปดาห์ที่ 0

6.สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ค่าที่วัดได้ทุกพารามิเตอร์ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากลของสหภาพยุโรป CD2002/657/EC วิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพบรรลุตามวัตถุประสงค์ สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์กลุ่ม benzimidazoles ในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS ในการเฝ้าระวังสารตกค้างของกรมปศุสัตว์ได้

7.ข้อเสนอแนะ

วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในครั้งนี้ ยังไม่ครอบคลุม metabolites ของสารในกลุ่มนี้ ดังนั้นควรมีการพัฒนาวิธีเพื่อนำวิธีที่ได้มาทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารให้ครอบคลุม metabolites ของสาร และควรทดสอบความเสถียรของสารให้ครอบคลุมทุกช่วงอุณหภูมิตามแผนที่กำหนดไว้

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์วรวิชัย วรอำศวปติ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานและบุคลากรของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์. 12 กรกฎาคม 2549.

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติ คณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผล และวิธีคัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. ปทุมธานี.

Corley, J. 2003. Best Practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. John Wiley & Sons, New York.

European Commission. 2009. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification

regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union L15:1-79.

H. De Ruyck, E.Daeseleire, K.Grijspeerdt, H, De Ridder, R.Van Renterghem G.Huyghebaert. 2001. Determination of Flubendazole and its metabolites in eggs and Poultry muscle with Liquid chromatography - Tandem Mass Spectrometry.J.Agric.Food Chem., 49(2), P. 610-617.