

**การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารแอสตาแซนทินและแคนทาแซนทิน
ในอาหารสัตว์ปีกโดยเทคนิค high performance liquid chromatography**

ศิริวัฒน์ رایณะสุข* วรัญญา แก้วทิพย์

บทคัดย่อ

สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) และแคนทาแซนทิน (canthaxanthin) ใช้เป็นสารเติมแต่งด้านสีในอาหารสัตว์ปีก ซึ่งจำเป็นต้องควบคุมปริมาณให้อยู่ในระดับที่อนุญาตให้ใช้ เพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบสาร astaxanthin และ canthaxanthin ในอาหารสัตว์ปีกโดยเทคนิค HPLC โดยเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง ผลการศึกษานี้พบว่า การเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดตัวอย่างด้วยอะซิโตน แล้วทดสอบด้วยเครื่อง HPLC-UV ที่ 480 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลและอะซิโตนไตรลเป็นสารละลายเฟสเคลื่อนที่ และใช้คอลัมน์ชนิด C₁₈ โดยมีค่า recovery อยู่ในเกณฑ์ 80-110% และ %RSD < 11 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ จากนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM Guide 2025 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ astaxanthin และ canthaxanthin พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 1.00 mg/kg มีความเป็นเส้นตรงดี ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) ของ astaxanthin และ canthaxanthin เท่ากับ 0.99757 และ 0.99731 ตามลำดับ มีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณเป็น 0.03 และ 0.05 mg/kg ตามลำดับ มีความแม่นยำจากค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 87.03 – 106.63 มีความเที่ยงของการทวนซ้ำโดยพิจารณาจากค่า %RSD_r เฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.47 – 7.53 และการทำซ้ำมีค่า %RSD_r เฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.26 – 8.78 จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบ astaxanthin และ canthaxanthin ในอาหารสัตว์ปีกที่ระดับความเข้มข้น 0.05 - 200 mg/kg นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก จำนวน 20 ตัวอย่าง พบ canthaxanthin 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60 แต่ไม่เกินเกณฑ์ปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ของสหภาพยุโรป จึงควรมีการเฝ้าระวังเพื่อป้องกันการตกค้างในสินค้าปศุสัตว์

คำสำคัญ : การพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ แอสตาแซนทิน แคนทาแซนทิน อาหารสัตว์ปีก HPLC

เลขทะเบียนวิชาการ : 68(2)-0304-033

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 1200

*ผู้รับผิดชอบ, e-mail: siriwat5854@gmail.com

Method development and validation for the determination of astaxanthin and canthaxanthin in poultry feed by high performance liquid chromatography

Siriwat Rainasuk*

Wanranya Kaewtip

Abstract

Astaxanthin and canthaxanthin are used as color additives in poultry feed, and the levels are controlled within the permitted limits to prevent harmful side effects on human and animal health. Therefore, the aim of this study was to develop and validate an analytical method of astaxanthin and canthaxanthin in poultry feed by HPLC. The study evaluated the effectiveness of the solvents used for sample extraction. The results of this study showed that the sample was extracted with acetone and analyzed by HPLC-UV at 480 nm. The analysis was carried out using the mobile phase of methanol and acetonitrile on a C₁₈ column with recovery in the range of 80-110% and %RSD <11 within the acceptable criteria. Then it was validated in accordance with the guidelines of EURACHEM Guide 2025. The results of method validation of astaxanthin and canthaxanthin found that the calibration curve at the level of 0.05 - 1.00 mg/kg was good and linear; the correlation of determination (r^2) of astaxanthin and canthaxanthin were 0.99757 and 0.99731 respectively. The limits of detection and quantitation were 0.03 and 0.05 mg/kg, respectively. The mean recovery accuracies ranged from 87.03 – 106.63%, repeatability precision (RSD_r) ranged from 1.47 – 7.53% and intermediate precision (RSD_p) ranged from 2.26 – 8.78%. The results of the performance characteristic were within the acceptable criteria. Thus, this method was suitable for determination of astaxanthin and canthaxanthin in poultry feed at the level of 0.05 - 200 mg/kg. Additionally, the method was applied to analyze 20 samples of poultry feed and 12 samples (60%) contained canthaxanthin, which does not exceed the maximum level permitted by the European Union, necessitating monitoring to prevent residues in livestock products.

Keyword : method development and validation, astaxanthin, canthaxanthin, poultry feed, HPLC

Registered No. : 68(2)-0304-033

Feed Quality Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products

91 Moo. 4 Tiwanont Bangkadi Mueang Pathumthani 12000

*Corresponding author, e-mail: siriwat5854@gmail.com

คำนำ

สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin, AX) และแคนทาแซนทิน (canthaxanthin, CX) เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ประเภทสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) ที่ผลิตจากสาหร่ายเขียว และแบคทีเรียเป็นหลัก มีทั้งแบบธรรมชาติและแบบสังเคราะห์ ซึ่งแบบสังเคราะห์สามารถควบคุมการสร้างเม็ดสีได้แม่นยำ มีความเสถียรให้ระดับสีเหลือง-ส้ม-แดงที่แตกต่างกันได้ ส่วนแบบธรรมชาติค่อนข้างจะไม่เสถียร ประสิทธิภาพอาจจะลดลง เนื่องจากการเกิดออกซิเดชันระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลานาน (NRC, 1994)

AX และ CX ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร นิยมอย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ เพื่อปรับปรุงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ด้านสี และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Hou *et al.*, 2010) ซึ่งคุณภาพด้านสีของอาหารมีอิทธิพลต่อการเลือกซื้ออาหารของผู้บริโภค อาทิเช่น การบริโภคไข่ไก่ที่มีสีของไข่แดงที่เข้ม ถ้าหากสีของไข่แดงมีความเข้มมากขึ้นก็จะทำให้ผู้บริโภคมีความต้องการมากขึ้นด้วย ผู้ผลิตจึงต้องมีการปรับปรุงให้สีของไข่แดงเข้มขึ้นด้วยการใช้วัตถุบิชนิดต่างๆ เพื่อเป็นแหล่งสารสีในอาหารสัตว์ไม่ว่าจะเป็นสารสีสังเคราะห์ หรือสารสีที่ได้มาจากวัตถุดิบธรรมชาติ (อัจฉรา และมงคล, 2556) และยังมีงานวิจัยทางระบาดวิทยาได้อธิบายเกี่ยวกับการบริโภคสารสีกลุ่ม carotenoids สามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคความเสื่อมเรื้อรังของร่างกาย (chronic degenerative diseases) โรคกระดูกบางชนิด และโรคหลอดเลือดหัวใจ (Gammone *et al.*, 2015)

การใช้สาร AX และ CX ในด้านโภชนาการของสัตว์ เช่น การช่วยทำให้เกิดสีเหลืองส้มของไข่แดง ไขมันสัตว์ปีก และการทำให้เกิดการเปลี่ยนสีผิว ขา เท้า และจะงอยปากในสัตว์ปีก เป็นต้น (NRC, 1994) การใช้สารสีดังกล่าวแม้จะมีประโยชน์แต่ก็ต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ถ้าเกิดการตกค้างในอาหารหรือใช้เกินกว่าปริมาณที่กำหนด อาจจะมีผลข้างเคียง หรือก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของสัตว์และมนุษย์ได้ เช่น การดูดซึม CX อาจทำให้เกิดการสะสมในเรตินา ซึ่งเป็นสาเหตุของปัญหาการมองเห็น (Hou *et al.*, 2010) และยังมีการศึกษาว่าการบริโภค CX มากเกินไปอาจทำให้เกิดจุดต่างของตาและจอประสาทตา ซึ่งจะส่งผลต่อการมองเห็น (Hueber *et al.*, 2011) เพราะฉะนั้นการใช้สาร AX และ CX เป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์จะต้องกำหนดปริมาณให้เหมาะสม และไม่ควรมีเกินขีดจำกัดที่อนุญาตให้ใช้ (Hou *et al.*, 2010) ในสหภาพยุโรปได้กำหนดปริมาณสูงสุดของสาร AX และ CX ที่อนุญาตให้ใช้ โดยกำหนดระดับ AX สูงสุดที่ 100 mg/kg (ppm) ในอาหารปลา ปู กุ้ง และปลาสวยงาม ส่วน CX กำหนดสูงสุดที่ 100 mg/kg ในอาหารปลาสวยงามและอาหารสัตว์ปีกสวยงาม 25 mg/kg ในอาหารสัตว์ปีกเนื้อและ 8 mg/kg ในอาหารสัตว์ปีกไข่ แต่ถ้ามีการเติม CX ร่วมกับสารกลุ่ม carotenoids และ xanthophylls ชนิดอื่นๆ ซึ่งรวมสาร AX ด้วย ในอาหารสัตว์ปีกทั่วไป กำหนดระดับสูงสุดที่ 80 mg/kg (European Commission, 2015)

ปัจจุบันมีการทดสอบหาปริมาณสาร AX และ CX ในอาหารสัตว์ สามารถทดสอบได้หลากหลายเทคนิค เช่น high performance liquid chromatography (HPLC), high performance

liquid chromatography–mass spectrometer (HPLC-MS) และ thin layer chromatography (TCL) เป็นต้น (Hou *et al.*, 2010) โดยมีรายงานการศึกษาการทดสอบสารสีในอาหารสัตว์โดยเทคนิค ultra-performance liquid chromatography (UPLC) ประกอบด้วย para red (PR), sudan dyes, CX และ AX โดยใช้ acetonitrile ในการสกัดตัวอย่าง แต่เนื่องจากงานวิจัยทดสอบสารสีหลายชนิด อีกทั้งอาหารสัตว์มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนทั้งคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ดังนั้นขั้นตอนการสกัดจึงต้องลดการรบกวนของเมทริกซ์ด้วยการ clean up ด้วย C18 SPE column ก่อนการทดสอบด้วยเครื่อง UPLC ด้วยตัวตรวจวัด diode array detector (DAD) และเพื่อให้ครอบคลุมการทดสอบสารทั้งหมดจึงเลือกใช้ wavelength ที่ 500 nm แต่การทดสอบ AX และ CX ที่เหมาะสมให้สัญญาณสูงที่สุดที่ 475 และ 480 nm ตามลำดับ (Hou *et al.*, 2010)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการทดสอบสารกลุ่ม carotenoids ได้แก่ adonirubin, AX, astaxanthin dimethyldisuccinate, beta-carotene, capsanthin, CX, citranaxanthin, ethyl ester of beta-apo-8'-carotenoic acid, lutein และ zeaxanthin ใช้เป็น feed additive ในอาหารปลาและอาหารสัตว์ปีก การเตรียมตัวอย่างเริ่มต้นด้วยการย่อยด้วย protease enzyme (Protex 6L) ที่ 50 °C จากนั้นสกัดด้วย acetone โดยใช้เทคนิค pressurised liquid extraction (PLE) ซึ่งเป็นการสกัดที่ใช้ความดันและอุณหภูมิสูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารจากตัวอย่างด้วยเครื่อง PLE extraction ที่อุณหภูมิ 58 °C เป็นเวลา 7 นาที ทำการชะตัวทำลายอินทรีย์ด้วยการ flush volume 120% จำนวน 3 ครั้ง แล้วทดสอบด้วยเครื่อง HPLC-DAD ที่ 410 nm (Vincent *et al.*, 2017) และมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ maxatase ที่ 50 °C ย่อยตัวอย่างอาหารสัตว์ แล้วนำมาสกัดด้วย dichloromethane จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง HPLC-UV ที่ 474 nm เพื่อทดสอบสาร AX (Du *et al.*, 2016) และในปี 2022 มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการทดสอบสาร AX และ CX ในตัวอย่างปลาแซลมอน ไช้แดง และอาหารสัตว์ โดยมีการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำลายอินทรีย์ผสม ethanol, propanol และ hexane ในอัตราส่วน 1:2:6 ตามด้วยการ clean up ด้วย polymeric SPE column ชนิด reversed phase แล้วทดสอบด้วยเครื่อง HPLC- photo diode detector (PDA) ที่ 475 nm (Krępska *et al.*, 2022)

ห้องปฏิบัติการงานพิษวิทยาและชีวเคมี(สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยในสินค้าปศุสัตว์ เล็งเห็นถึงความสำคัญที่ต้องเตรียมการรองรับการให้บริการทดสอบสาร AX และ CX ในอาหารสัตว์ปีกในกิจกรรมตรวจตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 และกิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้าง (residue monitoring plan) ที่จะกำหนดขึ้นในอนาคต และเตรียมความพร้อมสำหรับการส่งออกไปไ้ เพื่อให้ครอบคลุมการตรวจสอบคุณภาพในระบบห่วงโซ่อาหารสอดคล้องตามมาตรฐานของประเทศคู่ค้า จากรายงานที่ได้ทำการศึกษาค้นคว้าจะเห็นได้ว่าการทดสอบสารกลุ่ม carotenoids หลายๆชนิดในอาหารสัตว์ มีการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน ทั้งการใช้ enzyme หรือ

PLE เพื่อการจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่าง ทำให้ใช้ระยะเวลาในการทดสอบนาน และมีค่าใช้จ่ายสูง จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด หรือการปรับขั้นตอนการ clean up เพื่อให้การทดสอบสาร AX และ CX มีความจำเพาะ ไม่มีสิ่งรบกวน ช่วยลดระยะเวลาในการทดสอบ และลดค่าใช้จ่าย ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบสาร AX และ CX ในอาหารสัตว์ปีกโดยเทคนิค HPLC โดยทำการพัฒนาวิธีทดสอบ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง การเตรียมสารมาตรฐาน และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง HPLC เพื่อให้ครอบคลุมกับช่วงที่ใช้งานให้สอดคล้องตรงตามข้อกำหนดของประเทศคู่ค้า รวมทั้งความพร้อมของวัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือของห้องปฏิบัติที่มีอยู่ และดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ EURACHEM Guide, 2025 เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ น่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์การใช้งานที่กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลในการขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 เพื่อเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการ เมื่อวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นและได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแล้ว จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบหาปริมาณสาร AX และ CX ในตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกสำเร็จรูป จากการนำตัวอย่างที่ส่งทดสอบสารตกค้างในกิจกรรมตรวจตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 และกิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้าง จำนวน 20 ตัวอย่าง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่อง HPLC (UV detector) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1260 Infinity II
- เครื่องชั่งความละเอียด 0.00001 กรัม สำหรับชั่งสารมาตรฐาน
- เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งสารเคมีและตัวอย่าง
- เครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจน
- Ultrasonic bath
- Micropipette ชนิดปรับปริมาตรได้ 10-100, 100 – 1,000 μL และ 1-10 mL
- HPLC column ชนิด Inertsil® ODS-3 ขนาด 150 x 2.1 mm, 5 μm ยี่ห้อ GL Sciences

2. สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี :

- เกรด AR ได้แก่ acetone (ACE), acetonitrile (ACN), hexane (HEX), และ methanol (MET) สำหรับใช้สกัดตัวอย่าง

- เกรด HPLC ได้แก่ ACE, ACN และ MET สำหรับใช้เตรียมสารละลายมาตรฐาน สารละลาย mobile phase และ calibration curve

สารมาตรฐาน เกรดวัสดุอ้างอิง (reference materials) ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer

- Astaxanthin (AX) มีความบริสุทธิ์ 97.1%
- Canthaxanthin (CX) มีความบริสุทธิ์ 93.1%
- Para red (PR) มีความบริสุทธิ์ 98.6%

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- Stock standard solution (SSS) : ชั่งน้ำหนักและละลายสารมาตรฐานบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย ACE ความเข้มข้นประมาณ 1,000 µg/mL แล้วบรรจุใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C (Caballo *et al.*, 2012)

- Mixed intermediate standard solution I (MI1): เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม AX และ CX ความเข้มข้น 100 µg/mL ใน MET โดยปิเปต SSS แต่ละชนิดประมาณ 5 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 50 mL แล้วบรรจุใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

- Mixed intermediate standard solution II (MI2): เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม AX และ CX ความเข้มข้น 10 µg/mL ใน MET โดยปิเปต MI1 ประมาณ 5 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 50 mL แล้วบรรจุใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

- Mixed intermediate standard solution III (MI3): เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม AX และ CX ความเข้มข้น 1 µg/mL ใน MET โดยปิเปต MI1 ประมาณ 0.5 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 50 mL แล้วบรรจุใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

- Standard calibration curve, SCC: เตรียมกราฟมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 µg/mL ดังตารางที่ 1 ในตัวทำละลาย MET และ ACN อัตราส่วน 80:20 ปริมาตร 1 mL

- Matrix-matched calibration curve, MCC: เตรียมกราฟมาตรฐานด้วยการเตรียม spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานลงใน sample blank จำนวน 10.00 ± 0.05 กรัม แล้วนำไปสกัดตามข้อ 3.3 จะได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานใน matrix 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 3 และ 5 µg/mL ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเตรียม standard calibration curve (SCC) และ matrix-matched calibration curve (MCC)

SCC ($\mu\text{g/mL}$)	Standard solution	Volume (mL)	MCC ($\mu\text{g/mL}$)	Standard solution	Volume (mL)
0.05	MI3	0.05	0.05	MI3	0.5
0.1	MI3	0.1	0.1	MI3	1
0.25	MI3	0.25	0.25	MI2	0.25
0.5	MI3	0.5	0.5	MI2	0.5
0.75	MI3	0.75	0.75	MI2	0.75
1	MI2	0.1	1	MI1	0.1
3	MI2	0.3	3	MI1	0.3
5	MI2	0.5	5	MI1	0.5

3. การเตรียมตัวอย่าง

3.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก (อาหารไก่) สำหรับ sample blank

โดยเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์จากวัตถุดิบอาหารสัตว์ปีกหลักบดละเอียด ผสมตามอัตราส่วนดังตารางที่ 2 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 2 สูตรอาหารสัตว์ผสมสำหรับสัตว์ปีกในการเตรียมตัวอย่างเป็น sample blank

ชนิดวัตถุดิบอาหารสัตว์	ปริมาณ (กรัม) ต่อการเตรียม 1 กิโลกรัม
ข้าวโพด	580
กากถั่วเหลือง	220
รำข้าวสาลี/รำละเอียด	150
ปลาป่น	50

ที่มา สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ (2566)

3.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกสำเร็จรูปสำหรับทดสอบ AX และ CX

นำตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกที่ส่งทดสอบสารตกค้างในกิจกรรมตรวจตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 และกิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้าง รวมจำนวน 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วย อาหารไก่ไข่ 9 ตัวอย่าง อาหารไก่เนื้อ 6 ตัวอย่าง และอาหารเป็ดไข่ 5 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างละ 100 กรัม บดละเอียดและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.3 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง (extraction)

ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก 10.00 ± 0.05 g ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 mL เติมตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตร 50 mL ปิดฝาให้สนิท นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวนอน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสใส่หลอดโพลีโพรพิลีน ขนาด 50 mL ปิดฝาให้แน่น นำไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 25°C ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปิดส่วนสารละลายใส ปริมาตร 5 mL นำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (อุณหภูมิห้อง) จนกระทั่งสารละลายแห้งหมด นำมาละลายด้วยสารละลาย mobile phase ปริมาตร 1 mL (MET : ACN อัตราส่วน 80 : 20) และเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath เป็นเวลา 2-3 นาที นำสารละลายที่ได้กรองผ่าน membrane filter ชนิด nylon ขนาด $0.2\ \mu\text{m}$ ใส่ลงใน glass vial จากนั้นนำไปทดสอบด้วยเครื่อง HPLC

4. การพัฒนาวิธีทดสอบ

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ที่เหมาะสมในการทดสอบสาร AX และ CX ด้วยเครื่อง HPLC ที่มีตัวตรวจวัดชนิด UV โดยการฉีดสารมาตรฐานผสม AX และ CX ความเข้มข้น $0.1\ \mu\text{g/mL}$ ใน MET:ACE (80:20) ปริมาตร $10\ \mu\text{L}$ เข้าเครื่อง HPLC โดยผ่าน HPLC column ชนิด C18 Inertsil® ODS-3 ขนาด $150 \times 2.1\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$ อุณหภูมิคอลัมน์ 25°C อัตราการไหล $0.3\ \text{mL/min}$ เป็นเวลา 10 นาที และใช้ MET และ ACN อัตราส่วน 80 : 20 เป็น mobile phase โดยทดสอบที่ wavelength 470, 480 และ $490\ \text{nm}$ จำนวนอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อหา wavelength ที่เหมาะสม ตรวจสอบ RT และ peak area ของสารแต่ละ wavelength และค่าการแยกของสารทั้ง 2 ชนิด (resolution, R_s) กำหนดเกณฑ์การยอมรับ ค่า $R_s > 2$ (Shabir, 2003) ดังสูตร

$$R_s = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{(W_1 + W_2)}$$

เมื่อ t_{R1} , t_{R2} = RT ของแต่ละ peak และ W_1 , W_2 = peak width ของแต่ละ peak

4.2 การพัฒนาวิธีการสกัด (extraction)

ศึกษาชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก (ข้อ 3.1) จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ACE, ACN, HEX และ MET เกรด AR โดยการเตรียม spiked matrix sample ที่เติมสารมาตรฐานผสม AX และ CX ให้มีความเข้มข้น $1\ \text{mg/kg}$ (ppm) ลงใน sample blank จำนวน 4 ชุด จำนวนตัวอย่างชุดละ 3 ซ้ำ จากนั้นเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต้องการเปรียบเทียบ ปริมาตร 50 mL ดังนี้

ชุดที่ 1 เดิม ACE

ชุดที่ 2 เดิม ACN

ชุดที่ 3 เดิม HEX

ชุดที่ 4 เดิม MET

ดำเนินการสกัดตัวอย่างตามข้อ 3.3 จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง HPLC-UV ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดตัวอย่างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดแต่ละชนิด โดยการคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) ต้องอยู่ในช่วง 80 - 110% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ไม่เกิน 11 (AOAC, 2023) ดังตารางที่ 3 จากนั้นใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ผลการประเมินที่ผ่านตามเกณฑ์ดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

5.1 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (specificity/selectivity)

ทดสอบ reagent blank, sample blank, spiked matrix sample 1 ที่เติมสาร AX และ CX ให้มีความเข้มข้น 0.05 mg/kg และ spike matrix sample 2 ที่เติมสาร AX, CX และ PR ให้มีความเข้มข้น 0.05 mg/kg ตรวจสอบการรบกวน โดยพิจารณาสัญญาณที่ปรากฏใน reagent blank, sample blank, spiked matrix sample 1 และ spiked matrix sample 2 เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 0.05 µg/mL (SCC) เกณฑ์การยอมรับคือ ต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่าตรงกับพีคของสาร AX และ CX

5.2 การหาช่วงที่ใช้งาน (working range) ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) และความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

5.2.1 การหาช่วงที่ใช้งาน (working range)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงของการทดสอบ โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 3 และ 5 mg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง (แกน x) กับความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ (แกน y) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) กำหนดเกณฑ์ยอมรับค่า $r^2 \geq 0.995$ (U.S. FDA, 2023)

5.2.2 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ฉีดสาร SCC เทียบกับ MCC ตามความเข้มข้นของสารที่อยู่ในช่วง working range ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง HPLC เมื่อได้ผลทดสอบ สร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิดโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบ และแกน Y เป็นพื้นที่ใต้พีค และประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่า r^2 กำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า $r^2 \geq 0.995$ (U.S.

FDA, 2023) แล้วทำการเปรียบเทียบและประเมิน %matrix effect (ME) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย ซึ่งค่าการยอมรับไม่เกิน $\pm 20\%$ (SANTE/11312/2021 V2)

$$\%ME = \left(\frac{\text{Slope of MCC}}{\text{Slope of SCC}} - 1 \right) \times 100$$

5.3 การทดสอบหาค่า Limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

หาค่า LOD และ LOQ โดยประมาณด้วยการสกัด spiked matrix sample ที่เติมสารมาตรฐานผสม AX และ CX ลงใน sample blank ความเข้มข้น 0.05 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ แล้วทดสอบด้วยเครื่อง HPLC นำผลทดสอบคำนวณหาค่า standard deviation (S_0) แล้วคำนวณค่า LOD และค่า LOQ จากสูตร ดังนี้ (EURACHEM, 2025)

$$LOD = 3S'_0 \quad \text{และ} \quad LOQ = 10S'_0$$

$$\text{เมื่อ} \quad S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad \text{และ} \quad S_0 = SD$$

n = จำนวนซ้ำของตัวอย่างตามวิธีทดสอบในงานประจำ ($n = 2$)

เมื่อได้ค่า LOD และ LOQ โดยประมาณแล้ว ทดสอบ spiked matrix sample ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อเป็นการยืนยันค่า LOD และ LOQ โดยแต่ละความเข้มข้นทดสอบภายในวันเดียวกัน

โดยการยืนยันค่า LOD กำหนดเกณฑ์การยอมรับ ค่า $S/N \geq 3$ และการยืนยันค่า LOQ ได้จากการคำนวณค่า %MR และค่า %RSD กำหนดเกณฑ์การยอมรับ ดังตารางที่ 3 (AOAC, 2023)

ตารางที่ 3 เกณฑ์การยอมรับของค่า %recovery และ %RSD ของ AOAC, 2023

ระดับความเข้มข้น	% Recovery	Repeatability (%RSD _r)	Reproducibility (%RSD _R)
10 ppb	60-115	21	32
100 ppb	80-110	15	22
1 ppm	80-110	11	16
10 ppm	80-110	7.3	11
100 ppm	90-107	5.3	8
0.10%	95-105	3.7	6

5.4 การทดสอบหาค่าความแม่นยำ (accuracy) และการทดสอบหาค่าความเที่ยง (precision)

5.4.1 การทดสอบหาค่าความแม่นยำและการทดสอบหาค่าความเที่ยงแบบการทวนซ้ำของการวัด (repeatability)

โดยการเติมสารมาตรฐานผสม AX และ CX ใน sample blank จำนวน 10 ซ้ำ ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ LOQ, 0.5, 1, 5, 100 และ 200 mg/kg ทำการสกัดและทดสอบวันเดียวกัน ประเมินความแม่นยำพิจารณาจากค่า %MR และความเที่ยงพิจารณาจาก %RSD_r ของแต่ละระดับความเข้มข้น กำหนดเกณฑ์การยอมรับดังตารางที่ 3 (AOAC, 2023)

5.4.2 การทดสอบหาค่าความแม่นยำและการทดสอบหาค่าความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility)

โดยการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อที่ 5.4.1 อีกจำนวน 1 ชุด แต่ทำการสกัดและทดสอบต่างวันกัน ประเมินความเที่ยงและแม่นยำของตัวอย่างทั้ง 2 ชุด โดยพิจารณาจากค่า %MR และ %RSD_R ของแต่ละระดับความเข้มข้น กำหนดเกณฑ์การยอมรับดังตารางที่ 3 (AOAC, 2023)

6.การทดสอบตัวอย่าง

ทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกสำเร็จรูป (ข้อ 3.2) จำนวนตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พร้อมการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบภายใน (internal quality control) ประกอบด้วย spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสม AX และ CX ที่ระดับ LOQ จำนวน 2 ซ้ำ sample blank, reagent blank อย่างละ 1 ซ้ำ โดยตรวจสอบ %MR ของ spiked matrix sample ต้องอยู่ในเกณฑ์ AOAC (2023) และ %relative percent difference (RPD) ของการทำซ้ำไม่เกิน 20% (SANTE/11312/2021 V2)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีทดสอบ

1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC

จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน AX และ CX ความเข้มข้น 0.1 µg/mL ปริมาตร 10 µL เข้าเครื่อง HPLC โดยผ่าน HPLC column ชนิด C18 Inertsil® ODS-3 ขนาด 150 x 2.1 mm, 5 µm อุณหภูมิคอลัมน์ 25 °C อัตราการไหล 0.3 mL/min และใช้ MET และ ACN อัตราส่วน 80 : 20 เป็น mobile phase โดยทดสอบที่ความยาวคลื่น 470, 480 และ 490 nm พบว่า สาร AX และ CX สามารถแยกออกจากกันได้ดี โดยมีค่าการแยก (R_s) อยู่ในช่วง 11.42 – 13.22 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (Shabir, 2003) ซึ่ง retention time (RT) ของสาร AX และ CX เฉลี่ยเท่ากับ 2.424 และ 4.441 นาที ตามลำดับ และเวลาต่ำสุดและสูงสุดแตกต่างกันไม่เกิน ± 0.1 นาที ผ่านตามเกณฑ์ของ SANTE/11312/2021 V2 แต่ที่ wavelength 480 nm มีความเหมาะสมในการทดสอบหาปริมาณของสาร AX และ CX มากที่สุด เนื่องจากให้สัญญาณสูงและมีค่า peak area เฉลี่ยมากที่สุด ดังตารางที่ 4

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Caballo *et al.* (2012) ซึ่งทดสอบสาร AX และ CX ในปลาแซลมอน ด้วยเครื่อง HPLC-UV ที่ 480 nm ปริมาตร 10 μ L ผ่าน HPLC column ชนิด C18 Ascentis™ ขนาด 150 x 2.1 mm, 3 μ m ใช้อัตราการไหลที่ 0.4 mL/min และใช้ MET: water อัตราส่วน 95 : 5 เป็น mobile phase ซึ่งเป็นการทดสอบด้วยสภาวะของ HPLC ที่ wavelength เดียวกัน ผ่าน HPLC column C18 ขนาดเท่ากัน ซึ่ง RT ของสาร AX และ CX ได้เท่ากับ 3.0 และ 8.3 นาที ตามลำดับ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ เวลาของสาร AX และ CX ได้ถูกชะออกจากคอลัมน์ถึงตัวตรวจวัดได้เร็วกว่า โดยถึงแม้ว่าคอลัมน์ HPLC ชนิด C18 ที่ใช้นี้ มีขนาดอนุภาคใหญ่ถึง 5 μ m พื้นที่ผิวที่จะสัมผัสกับสารที่จะวิเคราะห์จะต่ำกว่าขนาดอนุภาคขนาดเล็ก จึงต้องปรับอัตราการไหลลดลงอยู่ที่ 0.3 mL/min และปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราส่วนของ mobile phase ให้มีความเป็นขั้วต่ำลงด้วยตัวทำละลายชนิด ACN แทน water ทำให้ได้เวลาที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วขึ้น ใช้เวลาในการทดสอบที่สั้นกว่าของ Caballo *et al.* แต่ยังสามารถแยกสาร AX และ CX ได้ มีค่าการแยก $R_s > 2$ (Shabir, 2003)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบสาร astaxanthin และ canthaxanthin ที่ wavelength ต่างๆ

Wavelength (nm)	Astaxanthin			Canthaxanthin			Resolution	
	Mean peak area (mAU*s)	Retention time		Mean peak area (mAU*s)	Retention time		(R _s) MinMax	
		(min)			(min)			
		Min	Max		Min	Max		
470	14.16	2.422	2.423	14.23	4.441	4.446	12.69	13.17
480	14.76	2.423	2.424	14.44	4.438	4.439	12.24	13.08
490	14.04	2.423	2.426	13.35	4.439	4.444	11.42	13.22

1.2 การพัฒนาวิธีการสกัด (extraction)

จากการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด spiked matrix sample ที่ความเข้มข้น 1 mg/kg พบว่า ACE เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ค่า %MR สูงที่สุดคือ 99.82% และ 100.02% ของสาร AX และ CX ตามลำดับและค่า %RSD เท่ากับ 0.66% และ 0.93% ของ AX และ CX ตามลำดับ ดังตารางที่ 5 เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ คือ %MR อยู่ในช่วง 80 -110% และค่า %RSD ไม่เกิน 11 (AOAC, 2023) และพบว่า HEX มี %MR ของ AX ต่ำที่สุด และไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Du *et al.* (2016) ที่ศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด AX ในอาหารสัตว์ ซึ่งสาร AX เป็นสารสีที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วเล็กน้อยทำให้ HEX ที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน(ไม่มีขั้ว) มีค่า %MR ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ dichloromethane, ethyl acetate, ACE และ ACN และการใช้ maxatase enzyme ย่อยตัวอย่างอาหารสัตว์ก่อนสกัดด้วยตัวทำละลาย ค่า %MR อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 70 -110% (Du *et al.*, 2016)

จากรายงานการศึกษาการทดสอบสาร AX และ CX ร่วมกับสารอื่น ๆ ในกลุ่ม carotenoids ด้วย เช่น Vincent *et al.* (2017) ทดสอบในอาหารปลาและอาหารสัตว์ปีก ย่อยตัวอย่างด้วย protease enzyme แล้วสกัดด้วย ACE โดยใช้เทคนิค PLE ซึ่งให้ค่า %MR อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 80 -120% ยกเว้นสาร citranaxanthin ในตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกที่มี %recovery สูงเกิน 120% และ Hou *et al.* (2010) ได้ศึกษาในอาหารสัตว์ โดยการเตรียมตัวอย่างนอกจากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ยังมีขั้นตอนการ clean up ด้วย SPE แต่อย่างไรก็ตามการ clean-up ก็สามารถทำให้เกิดการสูญเสียของสารสีในตัวอย่างไปบ้างเล็กน้อย ซึ่งค่า %MR อยู่ในช่วง 62.7 – 91.0% โดยสาร PR มี %MR ต่ำที่สุดสำหรับ Krępska *et al.* (2022) ศึกษาการทดสอบเฉพาะสาร AX และ CX ใน ปลาแซลมอน ไช้แดง และอาหารสัตว์ ที่มีการ clean up หลังจากสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถแยกสาร AX และ CX ในตัวอย่างได้ แต่ยังพบสัญญาณของสิ่งรบกวนอยู่ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทดสอบสารสีที่มีหลายชนิดพร้อมกัน การเตรียมตัวอย่างค่อนข้างซับซ้อนทั้งการย่อยด้วย enzyme การสกัดโดยใช้เทคนิค PLE ที่อุณหภูมิสูง หรือแม้แต่การ clean up ผ่าน SPE column เพื่อให้สามารถสกัดสารสีในตัวอย่างได้ ทุกชนิดสารที่สนใจ แต่เมื่อพิจารณา %MR ที่ได้ยังพบว่าบางชนิดสารยังไม่เหมาะสมเพียงพอ อาจจะต้องปรับวิธีการสกัดหรือแยกวิธีการสกัดให้มีความจำเพาะกับสารนั้นๆ ซึ่งขั้นตอนการสกัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยการสกัดที่ดีนั้นควรมีการได้ค่า recovery ของสารที่สนใจมากที่สุด และเกิดการสลายตัวน้อยที่สุด อีกทั้งต้องเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ระยะเวลาสั้น ไม่เป็นอันตราย และประหยัดค่าใช้จ่าย

ด้วยการศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดสอบสาร AX และ CX ในอาหารสัตว์ปีก จึงพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างให้มีความจำเพาะกับสารที่สนใจ ลดขั้นตอนการย่อยตัวอย่างด้วย enzyme และใช้การสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของสารที่อาจเกิดได้จากการใช้อุณหภูมิสูงในการสกัด พบว่าสามารถสกัดสาร AX และ CX ในตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกได้ดี ค่า %MR และ %RSD ของสาร AX และ CX ได้ตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด และไม่พบการรบกวนของเมทริกซ์ จึงไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอน clean up ด้วย SPE column ทำให้ลดระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างได้อีกด้วย ดังนั้นจากการพัฒนาวิธีทดสอบเพื่อหาชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างจึงเลือกใช้ ACE ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

ตารางที่ 5 ค่า % MR และ %RSD ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด spiked sample ความเข้มข้น 1 mg/kg

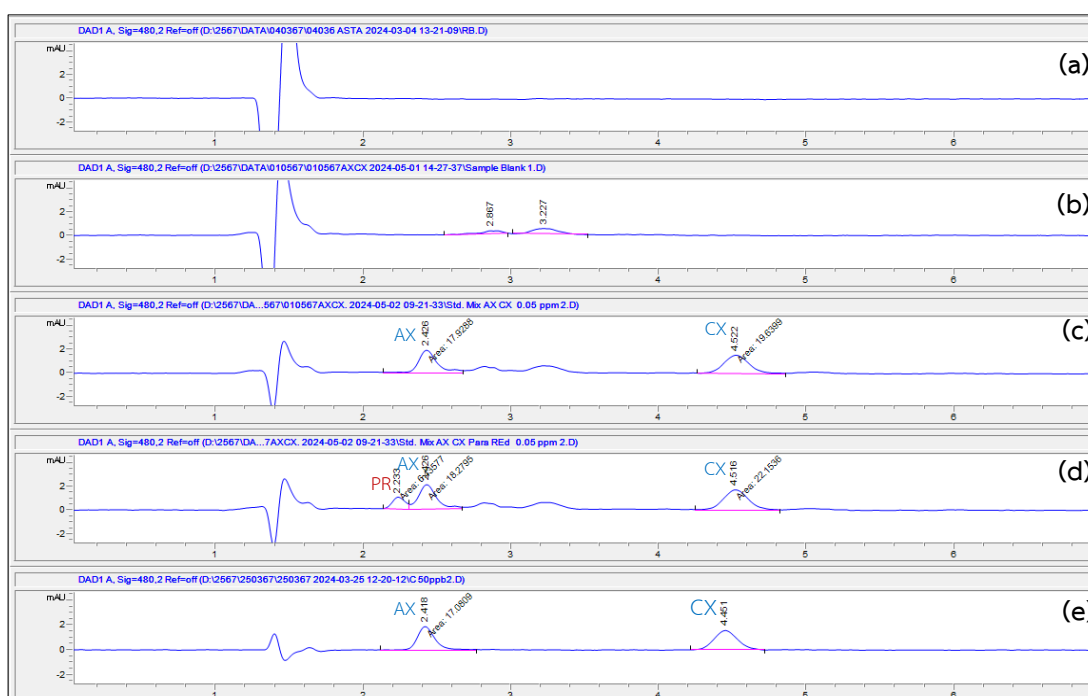
ชนิดตัวทำละลาย	Astaxanthin		Canthaxanthin	
	%MR	%RSD	%MR	%RSD
Acetone (ACE)	98.82	0.66	100.02	0.93
Acetonitrile (ACN)	96.13	2.97	93.96	1.29
Hexane (HEX)	37.08	1.49	96.83	1.88
Methanol (MET)	96.15	2.63	89.54	2.05

หมายเหตุ เกณฑ์การประเมิน AOAC (2023) ; %Recovery = 80-110% และ %RSD_r ≤ 11%

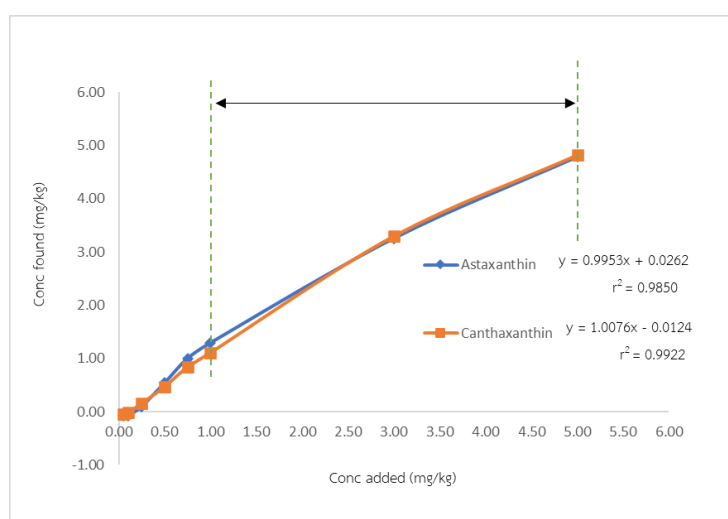
2. การตรวจความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

2.1 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (specificity/selectivity)

จากการทดสอบ reagent blank, sample blank, spiked matrix sample ที่เติมสาร AX, CX และ PR ตรวจไม่พบสัญญาณรบกวนของสารอื่นๆ ที่ตรงหรือใกล้เคียงกับ RT ของพิกสาร AX และ CX ใน SCC ค่า RT ของสาร AX และ CX ใน spiked matrix sample 1 และ 2 ตรงกับ RT ใน SCC โดยค่า RT แตกต่างกับสารมาตรฐานไม่เกิน 0.1 นาที เป็นไปตามเกณฑ์ของ SANTE/11312/2021 V2 และพบว่าสาร PR ที่เติมลงใน spiked matrix sample 2 มีสัญญาณเกิดขึ้น แต่พบต่ำกว่าสัญญาณของสาร AX และ CX และมีค่า RT เท่ากับ 2.233 นาที ซึ่งเร็วกว่าสาร AX 0.2 นาที ไม่อยู่ในช่วงเวลาของสาร AX ± 0.1 นาที ดังรูปที่ 1 แสดงว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจวัดสาร AX และ CX ในอาหารสัตว์ปีกที่มีสารรบกวนได้ดี



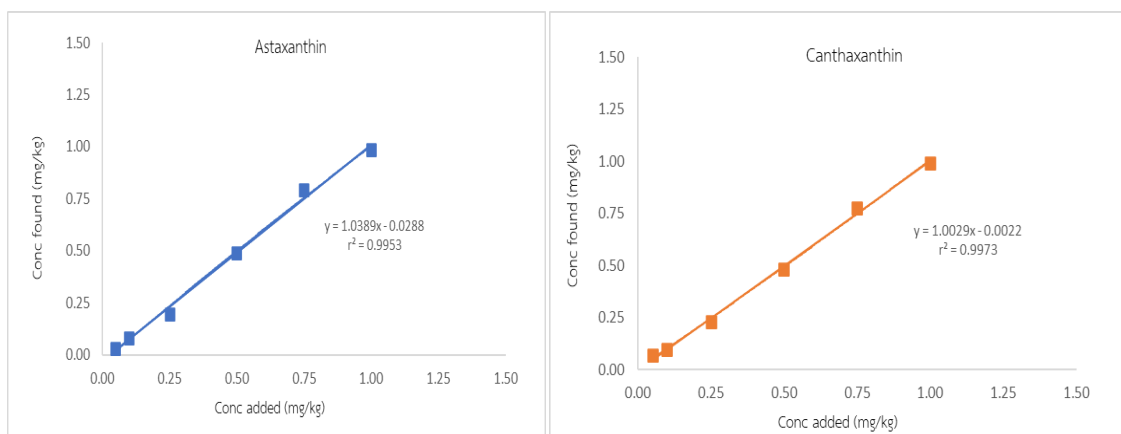
คำนวณสมการเส้นตรงและตรวจสอบค่า r^2 พบว่า กราฟของสาร AX และ CX ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 – 5 mg/kg มีความเป็นเส้นตรงดีในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 1 mg/kg เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 1 mg/kg เริ่มมีแนวโน้มเป็นเส้นโค้งดังรูปที่ 2 ค่า r^2 ของ AX และ CX เท่ากับ 0.9850 และ 0.9922 ตามลำดับ ซึ่งค่า $r^2 < 0.995$ ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (U.S. FDA, 2023) เมื่อปรับช่วงความเข้มข้นเป็นตั้งแต่ 0.05 – 3 mg/kg ค่า r^2 ของ AX และ CX เท่ากับ 0.9854 และ 0.99347 ตามลำดับ แต่ก็ยังไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับเช่นกัน จึงปรับช่วงความเข้มข้นเป็นตั้งแต่ 0.05 – 1 mg/kg พบว่า กราฟของสาร AX และ CX เป็นเส้นตรงดี ดังรูปที่ 3 ค่า r^2 เท่ากับ 0.9953 และ 0.9973 ตามลำดับ ตามตารางที่ 6 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ค่า $r^2 \geq 0.995$ (U.S. FDA, 2023) แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเป็นเส้นตรงของช่วงการใช้งานตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 – 1 mg/kg จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ช่วง linearity ของกราฟไม่ครอบคลุมช่วงการทดสอบที่ตรงตามวัตถุประสงค์ของสาร AX และ CX ที่อนุญาตให้ใช้ (European Commission, 2015) ดังนั้น หากต้องการทดสอบสาร AX และ CX ที่มีช่วงความเข้มข้นสูงกว่า 1 mg/kg ต้องทำการเจือจางด้วย mobile phase ให้อยู่ในช่วง 0.05 – 1 mg/kg ก่อน แล้วจึงทดสอบด้วยเครื่อง HPLC



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของวิธีทดสอบสาร astaxanthin และ canthaxanthin ในอาหารสัตว์ปีก
ช่วงความเข้มข้น 0.05 – 5 mg/kg

ตารางที่ 6 Calibration curve, ค่า r^2 ของ working range

Compounds	Calibration curve	r^2
Astaxanthin	$Y = 1.0389x - 0.0288$	0.9953
Canthaxanthin	$Y = 1.0029X - 0.0022$	0.9973



รูปที่ 3 Working range ของวิธีทดสอบสาร astaxanthin และ canthaxanthin ในอาหารสัตว์ปีก ช่วงความเข้มข้น 0.05 - 1 mg/kg

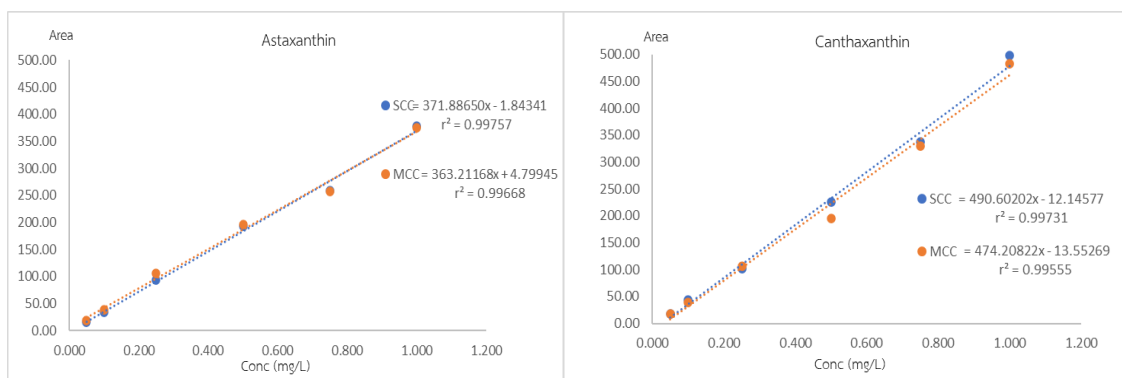
2.2.2 ผลกระทบจากเมทริกซ์ และช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน SCC เทียบกับ MCC ตามความเข้มข้นของสารที่อยู่ในช่วง working range พบว่า กราฟของสารมาตรฐานผสม AX และ CX มีความเป็นเส้นตรงดี ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 – 1 mg/L ($\mu\text{g/mL}$) โดยค่า $r^2 \geq 0.995$ และมีสมการเส้นตรง ($y = mx + c$) ตามตารางที่ 7 เมื่อนำค่าความชันของกราฟมาตรฐานทั้งสองชนิดมาคำนวณเพื่อตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ พบว่า AX และ CX มี %ME เท่ากับ -2.33 และ -3.34% ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่า $\pm 20\%$ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (SANTE/11312/2021 V2) และเมื่อพิจารณารูปที่ 4 จะเห็นได้ว่าความชันของกราฟทั้งสองของความใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าเมทริกซ์ไม่มีผลกระทบ

ดังนั้น จึงสามารถใช้กราฟมาตรฐาน (SCC) ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีและการทดสอบหาปริมาณสาร AX และ CX ในอาหารสัตว์ปีกโดยเทคนิค HPLC

ตารางที่ 7 สมการเส้นตรง ค่า r^2 ของกราฟมาตรฐานและ matrix effect

Compounds	SCC		MCC		%ME
	Calibration curve	r^2	Calibration curve	r^2	
Astaxanthin	$371.88650x - 1.84341$	0.99757	$363.21168x + 4.79945$	0.99668	-2.33
Canthaxanthin	$490.60202x - 12.14577$	0.99731	$474.20822x - 13.55269$	0.99555	-3.34



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานและการทดสอบ matrix effect ของสาร astaxanthin และ canthaxanthin

2.3 ค่า Limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

ผลการทดสอบ spiked matrix sample สาร AX และ CX ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อหาค่า LOD และ LOQ โดยประมาณ คำนวณค่า LOD จาก $3S_0'$ ได้ค่า LOD เท่ากับ 0.004 และ 0.018 ตามลำดับ และ LOQ จาก $10S_0'$ ของสาร AX และ CX เท่ากับ 0.013 และ 0.060 ตามลำดับ จึงทดสอบยืนยันค่า LOD และ LOQ ที่ความเข้มข้น 0.02 และ 0.05 mg/kg โดยประมาณ พบว่า S/N ของ AX และ CX ใน spiked matrix sample ความเข้มข้น 0.02 mg/kg มีค่าต่ำกว่า 3 จึงยืนยันค่า LOD ที่ความเข้มข้น 0.03 mg/kg พบว่า S/N ของ AX และ CX มีค่ามากกว่า 3 แสดงว่าสามารถกำหนดความเข้มข้นเท่ากับ 0.03 mg/kg เป็นค่า LOD ของวิธีทดสอบได้

การยืนยันค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/kg พบว่าสาร AX และ CX มีค่า %MR เท่ากับ 82.20 และ 104.20% ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ช่วง 80 - 110% ส่วนค่า %RSD ของ AX และ CX เท่ากับ 2.68% และ 5.96% ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 15% (AOAC, 2023) ซึ่งเกณฑ์ที่เลือกใช้มีความเข้มงวด และเหมาะสมกับระดับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ รายละเอียดดังตารางที่ 8 แสดงว่า วิธีทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นมีค่า LOD และ LOQ ของสาร AX และ CX ที่ความเข้มข้น 0.03 และ 0.05 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งค่านี้มีความไวเพียงพอ สามารถตรวจวัดได้ต่ำกว่าปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้สำหรับอาหารสัตว์ปีกทุกช่วงวัยได้ (European Commission, 2015)

ตารางที่ 8 Limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

Compounds	Spiked sample 0.05 mg/kg (n=10)		LOD		LOQ	
			(0.02 mg/kg)	(0.03 mg/kg)	(0.05 mg/kg)	
	S_0'	LOD ($3S_0'$)	LOQ ($10S_0'$)	Mean S/N	Mean S/N	%MR %RSD _r
Astaxanthin	0.006	0.018	0.06	2.96	3.77	82.20 2.68
Canthaxanthin	0.0013	0.004	0.013	2.34	3.16	104.20 5.96

2.4 ค่าความแม่นยำ (accuracy) และค่าความเที่ยง (Precision)

ผลการตรวจสอบความแม่นยำจาก %MR และความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability precision) และแบบการทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) จากค่า %RSD ใน spiked matrix sample ที่ความเข้มข้น 0.05 (LOQ), 0.50, 1, 5, 100 และ 200 mg/kg ดังตารางที่ 9 พบว่าการทดสอบแบบทวนซ้ำได้มีค่า %MR ตั้งแต่ 87.03 – 106.63% และค่า RSD_r ตั้งแต่ 1.47 – 7.53% สำหรับการทดสอบแบบทำซ้ำได้ มีค่า %RSD_R ตั้งแต่ 2.26 – 8.78% โดยค่า %MR, %RSD_r และ %RSD_R จากการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2023

ดังนั้นแสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำและความเที่ยง เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และครอบคลุมระดับปริมาณสูงสุดของสาร CX ที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารปลาสวยงามและอาหารสัตว์ปีกสวยงามที่ 100 mg/kg และถ้าใช้สาร CX ร่วมกับสารกลุ่ม carotenoids และ xanthophylls ชนิดอื่นๆ สัตว์ปีกทั่วไป กำหนดระดับสูงสุดที่ 80 mg/kg ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้กำหนดให้สาร AX เป็นตัวแทนของสารกลุ่ม carotenoids และ xanthophylls ชนิดอื่นๆ (European Commission, 2015)

ตารางที่ 9 ค่า %MR และ %RSD ของการทดสอบสาร astaxanthin และ canthaxanthin

Compounds	Spiked level (mg/kg)	Criteria (AOAC, 2023)			%MR, (%RSD _r)		%MR, (%RSD _R) (n=20)
		%MR	%RSD _r	%RSD _R	Day 1	Day 2	
					(n=10)	(n=10)	
Astaxanthin	0.05	80 - 110	15	22	87.03 (7.38)	93.02 (9.04)	90.03 (8.78)
	0.50		15	22	103.54 (7.53)	100.90 (5.18)	102.22 (6.46)
	1.0		11	16	106.63 (2.43)	107.83 (2.05)	107.23 (2.26)
	5.0		7.3	11	99.64 (4.95)	98.68 (6.52)	99.16 (5.65)
	100	90 - 107	5.3	8	101.38 (4.79)	99.75 (4.82)	100.56 (4.75)
	200				102.78 (3.93)	101.34 (5.12)	102.06 (4.91)
Canthaxanthin	0.05	80 - 110	15	22	104.20 (4.06)	106.16 (3.00)	105.18 (3.59)
	0.50		15	22	88.20 (6.48)	87.10 (4.69)	87.65 (5.56)
	1.0		11	16	93.46 (1.66)	93.17 (4.93)	93.32 (3.58)
	5.0		7.3	11	99.11 (4.70)	97.94 (2.85)	98.52 (3.84)
	100	90 - 107	5.3	8	105.05 (1.47)	103.41 (3.97)	104.23 (3.01)
	200				104.28 (3.93)	104.09 (3.25)	104.18 (3.51)

3. การทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก

ผลการทดสอบตัวอย่าง จำนวน 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วย อาหารไก่ไข่ 9 ตัวอย่าง อาหารไก่เนื้อ 6 ตัวอย่าง และอาหารเป็ดเนื้อ 5 ตัวอย่าง ตามวิธีที่ได้จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้

แล้ว พบว่า ไม่พบสาร AX ในทุกตัวอย่าง ส่วน CX ไม่พบในตัวอย่างอาหารไก่เนื้อ แต่พบในตัวอย่างอาหารไก่ไข่ จำนวน 4 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 1.20 – 1.88 mg/kg และอาหารเปิดเนื้อ จำนวน 5 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 18.34 – 22.34 mg/kg ซึ่งตัวอย่างที่พบ CX ไม่เกินเกณฑ์มาตรฐาน โดยกำหนดปริมาณสูงสุดไม่เกิน 8 mg/kg ในอาหารสัตว์ปีกไข่และ 25 mg/kg ในอาหารสัตว์ปีกเนื้อ (European Commission, 2015) ดังนั้น ตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกเหล่านี้จึงได้มาตรฐาน โดยในการทดสอบตัวอย่างมีการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบภายในด้วย spiked matrix sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg ได้ค่า %MR อยู่ในช่วง 80 - 110% (AOAC, 2023) และ %RPD มีค่าต่ำกว่า 20% (SANTE/11312/2021 V2) เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้มีความเข้มงวดและเหมาะสมกับช่วงที่ใช้งาน จึงกำหนดเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาชุดควบคุมคุณภาพภายในของผลการทดสอบ

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ แสดงให้เห็นว่า วิธีทดสอบเหมาะสมสำหรับการทดสอบสาร AX และ CX ในอาหารสัตว์ปีกโดยเทคนิค HPLC ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบอ้างอิงตามแนวทางของ EURACHEM Guide, 2025 เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน มีความเที่ยงและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของ AOAC, 2023 โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.03 mg/kg, LOQ เท่ากับ 0.05 mg/kg และช่วงของการทดสอบที่ 0.05 – 200 mg/kg ในอาหารสัตว์ปีก สามารถนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกพร้อมกับการควบคุมคุณภาพภายในเพื่อตรวจสอบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานของสหภาพยุโรปได้ รองรับการให้บริการทดสอบในกิจกรรมตรวจตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 กิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้าง (residue monitoring plan) และจากการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก จำนวน 20 ตัวอย่าง ไม่พบสาร AX ในทุกตัวอย่าง ส่วนสาร CX พบในตัวอย่างอาหารไก่ไข่และอาหารเปิดเนื้อ ซึ่งไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานกำหนดของสหภาพยุโรป ทั้งนี้เป็นการสำรวจข้อมูลการตกค้างเบื้องต้น ดังนั้นควรมีการตรวจเฝ้าระวังสารตกค้างสารสีในสินค้าปศุสัตว์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

นอกจากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบสาร AX และ CX ในอาหารสัตว์ปีกแล้ว ควรมีการดำเนินการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบในอาหารสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น อาหารปลา อาหารปลาสวยงาม และอาหารกุ้ง เป็นต้น รวมทั้งสารสีกลุ่ม carotenoids ชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มขีดความสามารถการตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์มากยิ่งขึ้น ทำให้การควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ภายในประเทศและส่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังเป็นการป้องกันการตกค้างของสารสีที่มีโอกาสพบในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ นางสาวกลวิทย์ ไชยทองศรี นายรังสรรค์ เข้มสุวรรณ และบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2566. สูตรอาหารสัตว์ที่กรมปศุสัตว์แนะนำ. แหล่งที่มา: <https://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/2015-08-06-09-04-25/2965-2023-09-07-07-37-24>. [14 กรกฎาคม 2568]
- อัจฉรา นิยมเดชา และมงคล คงเสน. 2556. มหาบอลิซึมและคุณสมบัติของแคโรทีนอยด์ในการเพิ่มความเข้มสีไข่แดง. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*. 5(ฉบับพิเศษ). 112-121.
- AOAC Official Methods of Analysis. 2023. Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F: 1-18.
- Brulc, L., Simonovska, B., Vovk, I. and Glavnik, V. 2013. Determination of egg yolk xanthophylls by isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol.1318: 134-141
- Caballo, C., Costi, E.M., María Dolores Sicilia, M.D. and Rubio, S. 2012. Determination of supplemental feeding needs for astaxanthin and canthaxanthin in salmonids by supramolecular solvent-based microextraction and liquid chromatography–UV/VIS spectroscopy. *Journal of Food Chemistry*. 134: 1244 -1249.
- Denery, J.R., Klaus Dragull, K., Tang, C.S. and Li, Q.X. 2004. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Journal of Analytica Chimica Acta*. 501: 175–181
- Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Shihui Wang, S. and Liu, Y. 2014. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*. 2014. Article ID 694305: 1-7

- Du, P., Jin, M., Yang, L., Chen, G., Zhang, C., Jin, F., Shao, H., Yang, M., Yang, X., She, Y., Wang, S., Zheng, L. and Wang, J. 2016. Determination of Astaxanthin in feeds using high performance liquid chromatography and an efficient extraction method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 39(1): 35–43.
- EURACHEM Guide. 2025. The Fitness for Purpose of Analytical Method A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 3rd edition
- European Commission. 2015. Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1486 of 20 August 2015 concerning the authorisation of canthaxanthin as feed additive for certain categories of poultry, ornamental fish and ornamental birds. *Official Journal of the European Union*. L 229/5–8.
- European Commission. 2015. Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1415 of 2 September 2015 concerning the authorisation of astaxanthin as a feed additive for fish, crustaceans and ornamental fish. *Official Journal of the European Union*. L 220/7–10.
- European Commission Directorate General for Health and Food Safety. 2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11312/2021 V2. Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 01/01/2024.
- Gammone, M.A., Riccioni, G. and D'Orazio, N. 2015. Carotenoids: potential allies of Cardiovascular health?. *Food and Nutrition Research*. 59: 26762–26773.
- Hou, X., Li, Y., Wu, G., Lei Wang, Hong, M. and Wu, Y. 2010. Determination of Para Red, Sudan Dyes, Canthaxanthin, and Astaxanthin in Animal Feeds Using UPLC. *Journal of Chromatographic Science*. 48: 22-25.
- Hueber, A., Rosentreter, A. and Severin, M. 2011. Canthaxanthin Retinopathy: Long-Term Observations. *Ophthalmic Research*. 46: 103–106
- Krępska, M., Sieczyńska, K. and Lasoń-Rydel, M. 2022. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in food products by HPLC method. *Journal of Technologia i Jakość Wyróbów*. 67: 106 -116.
- NRC. 1994. Nutrient Requirement of Poultry. 9th edition. National Academic Press. Washington, DC.

- Shabir, G.A. .2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987: 57–66
- U.S. Food and Drug Administration (2023) Methods, method verification and validation, laboratory manual, ORA laboratory procedure, volume II, ORA-LAB.5.4.5.
- Vincent, U., Federica Serano, F. and von Holst, C. 2017. Development and validation of A multi-analyte method for the regulatory control of carotenoids used as feed additives in fish and poultry feed. *Journal of Food Additives & Contaminants: Part A*. 34(8):1285–1297.