

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารฮาควินอลในอาหารสัตว์

โดยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry

วรัญญา แก้วทิพย์*

ศิริวัฒน์ رایณะสุข

บทคัดย่อ

ฮาควินอลเป็นสารต้านจุลชีพที่นิยมใช้เป็นสารเติมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต รวมถึงป้องกัน ควบคุม และรักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามการใช้สารดังกล่าวเกินความจำเป็นอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์และมนุษย์ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบสารฮาควินอล ได้แก่ 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline (5,7-DCHQ) และ 5-chloro-8 hydroxyquinoline (5-CHQ) ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ได้ทำการเปรียบเทียบชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง พบว่าส่วนผสมของเอทิลอะซิเตทและอะซิโตนไตรลในอัตราส่วน 3:1 ให้ค่า peak area สูงที่สุด โดยมีค่า %MR และ %RSD อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้กรดฟอร์มิกและอะซิโตนไตรลเป็นเฟสเคลื่อนที่ และใช้คอลัมน์ชนิด C18 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ EURACHEM Guide, 2025 พบว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเชิงเส้นดีในช่วงความเข้มข้น 37–742 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ 5,7-DCHQ และ 12–231 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ 5-CHQ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.9983 และ 0.9969 ตามลำดับ มีขีดจำกัดของการตรวจพบของ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ เป็น 7 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณเป็น 37 และ 12 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีความแม่นยำจากการถ่วงและการกลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 89.94 – 95.78 สำหรับสาร 5,7-DCHQ และร้อยละ 83.80 – 98.14 สำหรับสาร 5-CHQ มีความเที่ยงของการทวนซ้ำโดยพิจารณาจากค่า %RSD, เฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.30 – 5.65% สำหรับสาร 5,7-DCHQ และ 3.19 – 7.75 % สำหรับสาร 5-CHQ ตามลำดับ และการทำซ้ำมีค่า %RSD_r เฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.34 – 5.90% สำหรับสาร 5,7-DCHQ และ 4.97 – 7.08 % สำหรับสาร 5-CHQ และในการเปรียบเทียบผลการทดสอบในอาหารสัตว์ปีกและอาหารสุกร พบว่าไม่มีความแตกต่างของความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากผลการศึกษาพบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีคุณลักษณะเฉพาะที่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับและเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์สารฮาควินอลในอาหารสัตว์ที่ระดับความเข้มข้น 37–742 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ 5,7-DCHQ และ 12–231 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ 5-CHQ

คำสำคัญ : การพัฒนาวิธี การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ฮาควินอล อาหารสัตว์ LC-MS/MS

เลขทะเบียนวิชาการ : 68(2)-0304-036

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 1200

*ผู้รับผิดชอบ, e-mail: warunya36538@gmail.com

Method development and validation for the determination of halquinol in animal feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Warunya Kaewthip*

Siriwat Rainasuk

Abstract

Halquinol is an antimicrobial agent commonly used as a feed additive to promote growth and to prevent, control, and treat gastrointestinal diseases in animals. However, excessive use may pose health risks to both animals and humans. This study aimed to develop and validate an analytical method for the determination of halquinol in animal feed using LC-MS/MS. Various types and ratios of organic solvents were compared for sample extraction efficiency. The mixture of ethyl acetate and acetonitrile in a 3:1 ratio provided the highest peak area. The corresponding %MR and %RSD values were within the acceptable criteria, indicating the suitability of this solvent system for the extraction process. The LC-MS/MS analysis was conducted using formic acid and acetonitrile as the mobile phase with a C18 column. Method validation, based on the EURACHEM Guide 2025, demonstrated good linearity in the concentration ranges of 37–742 µg/kg for 5,7-DCHQ and 12–231 µg/kg for 5-CHQ, with coefficients of determination (r^2) of 0.9983 and 0.9969, respectively. The limits of detection were 7 µg/kg for 5,7-DCHQ and 2 µg/kg for 5-CHQ, while the limits of quantification were 37 µg/kg and 12 µg/kg, respectively. Mean recoveries ranged from 89.94% to 95.78% for 5,7-DCHQ and from 83.80% to 98.14% for 5-CHQ. Repeatability precision (RSD_r) ranged from 2.30% to 5.65% for 5,7-DCHQ and from 3.19% to 7.75% for 5-CHQ, while intermediate precision (RSD_R) ranged from 3.34% to 5.90% and 4.97% to 7.08% for the respective compounds. Comparative analysis of poultry and swine feed samples showed no statistically significant difference in measured concentrations at a 95% confidence level. The validation results confirmed that the method meets the required performance criteria and is suitable for the determination of halquinol in animal feed at concentrations ranging from 37–742 µg/kg for 5,7-DCHQ and 12–231 µg/kg for 5-CHQ.

Keyword : Method development, Method validation, Halquinol, Animal feed, LC-MS/MS

Registered No. : 68(2)-0304-036

Feed Quality Control Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products

91 Moo. 4 Tiwanont Bangkadi Mueang Pathumthani 12000

*Corresponding author, e-mail: warunya36538@gmail.com

บทนำ

ฮาควินอล (halquinol) เป็นสารผสมของอนุพันธ์ควิโนลีน (quinoline derivatives) ประกอบด้วย 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline (5,7-DCHQ) ในช่วง 57 – 74 %w/w, 5-chloro-8-hydroxyquinoline (5-CHQ) 23 – 40 %w/w และ 7-chloro-8-quinoline (7-CHQ) 0 – 4 %w/w (Lee *et al.*, 2023) โดยจัดเป็นสารต้านจุลชีพที่ไม่ใช่ยาปฏิชีวนะ (non-antibiotic antimicrobial agent) ที่มีฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum) ต่อเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ halquinol นิยมใช้เป็นสารเติมในอาหารสัตว์ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต รวมทั้งช่วยป้องกัน ควบคุม และรักษาโรกระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอาการท้องร่วงจาก *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. (Lekagul *et al.*, 2019) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า halquinol ส่งผลดีต่อการควบคุมการบีบตัวของลำไส้ ช่วยลดปัญหาการดูดซึมอาหารผิดปกติ ปัจจุบัน halquinol ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์ปีกและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของสุกรในหลายประเทศ เช่น บราซิล เปรู ไทย โคลอมเบีย อินโดนีเซีย อินเดีย และบังกลาเทศ (Habib *et al.*, 2024) โดยใช้ในความเข้มข้นระหว่าง 12–60 %w/w (JECFA, 2017)

สำหรับประเทศไทยมีรายงานข้อมูลการสำรวจโรงงานอาหารสัตว์ พบว่าปริมาณส่วนผสมที่ออกฤทธิ์ (active ingredients) ที่ผสมในอาหารสัตว์ที่ผสมยา (medicated feed) สำหรับสุกรในปี พ.ศ. 2560 อยู่ที่ 843 ตัน โดยสามลำดับแรก ได้แก่ amoxicillin, halquinol และ tiamulin โดยมีปริมาณอยู่ที่ 47 %, 14.6 % และ 14.2 % ตามลำดับ (Lekagul *et al.*, 2019) และจากรายงานด้านสุขภาพหนึ่งเดียวของประเทศไทย (One Health) เกี่ยวกับการบริโภคยาต้านจุลชีพและการดื้อยาต้านจุลชีพ ปี พ.ศ. 2565 มีรายงานปริมาณยาต้านจุลชีพที่สัตว์ได้รับผ่านอาหารสัตว์ผสมยาสำหรับสุกร พบว่ามีการใช้ halquinol อยู่ในลำดับที่ 3 ซึ่งมีปริมาณอยู่ที่ 164.6 ตัน และอาหารสัตว์ผสมยาสำหรับสัตว์ปีก พบว่ามีการใช้ halquinol อยู่ในลำดับที่ 6 โดยมีปริมาณอยู่ที่ 0.7 ตัน (HPSR-AMR Network, 2025) และมีรายงานการใช้ halquinol เป็นยาต้านการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารผสมในอาหารสัตว์สำหรับสุกรในฟาร์มที่ได้รับการจดทะเบียนเป็นผู้ผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยาในสถานที่เลี้ยงสัตว์ของตนเองกับกรมปศุสัตว์ในปี พ.ศ. 2563 (พอใจ และพัสวีย์, 2565) แสดงให้เห็นว่าในประเทศไทยมีการใช้ halquinol ในด้านการปศุสัตว์ทั้งในสุกรและในสัตว์ปีก

แต่หลายประเทศทั่วโลกมีนโยบายเพื่อควบคุมการใช้ยาต้านจุลชีพผสมในอาหารสัตว์ ในวัตถุประสงค์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต (Antimicrobial Growth Promoter; AGP) โดยเฉพาะสหภาพยุโรปไม่อนุญาตให้ใช้ halquinol เป็นผลิตภัณฑ์ยาสำหรับสัตว์ (VMP) หรือเป็นสารเติมแต่งอาหารสัตว์ (feed additive) และห้ามใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต ดังนั้น จึงไม่มีการกำหนดค่าปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุด (MRLs) สำหรับสาร halquinol (ESFA, 2021) อย่างไรก็ตาม Codex

ได้กำหนดค่าปริมาณ halquinol ตกค้างสูงสุด (MRLs) ในสุกร คือ 40, 350, 500 และ 9,000 µg/kg ในกล้ามเนื้อ ไขมันรวมทั้งไขมัน ตับ และ ไต ตามลำดับ โดย Marker Residue (MR) เป็นผลรวมของ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ และรวมถึง glucuronide metabolites ของ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ด้วย (CODEX, 2024) ซึ่งประเทศไทยไม่คัดค้านการกำหนดค่า MRLs ดังกล่าว สำหรับ halquinol ที่ใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อการรักษาเท่านั้น (CODEX, 2021) ส่วนในสัตว์ปีกยังไม่มีกำหนดค่ามาตรฐาน หรือค่าปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุด (MRLs) สำหรับสาร halquinol

ประเทศไทยได้ประกาศห้ามใช้ยาต้านจุลชีพทุกชนิดในอาหารสัตว์เพื่อวัตถุประสงค์ในการเร่งการเจริญเติบโต หรือเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารสัตว์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิด ลักษณะหรือคุณสมบัติของวัตถุที่ห้ามใช้ผสมในอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 เนื่องจากการใช้ยาต้านจุลชีพในขนาดต่ำอย่างต่อเนื่องในอาหารสัตว์ อาจทำให้จุลชีพมีโอกาสสัมผัสกับยาเป็นระยะเวลานาน จึงเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อดื้อยา (Antimicrobial Resistance: AMR) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุข ทั้งนี้ ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสัตว์หลายชนิดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับที่ใช้ในมนุษย์ หากมีการใช้ยาอย่างไม่เหมาะสม อาจนำไปสู่การถ่ายทอดเชื้อดื้อยาระหว่างสัตว์และคนได้ (ใจพร, 2555) ด้วยเหตุนี้ halquinol จึงได้รับอนุญาตให้ใช้ในประเทศไทยภายใต้ข้อกำหนดด้านคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารสัตว์ โดยจำกัดการใช้เฉพาะเพื่อการควบคุม ป้องกัน และรักษาโรคเท่านั้น มิให้ใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต

ปัจจุบันมีรายงานการวิเคราะห์หาปริมาณสาร halquinol ซึ่งมีการทดสอบองค์ประกอบหลัก 2 ตัวคือ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์ผสมยา (medicated feed) โดยใช้เทคนิคต่างๆ ได้แก่ UV spectrophotometry, Gas chromatography with flame-ionization detector (GC-FID), ultra-pressure liquid chromatography with photo diode array detector (UPLC-PDA) และ liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS) เป็นต้น โดยมีรายงานการทดสอบ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ในอาหารสัตว์ผสมยาสำหรับสุกรโดยเทคนิค UV spectrophotometry และ GC-FID โดยการ reflux ตัวอย่างด้วย chloroform เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดที่ได้มาสกัดต่อด้วย sulfuric acid เพื่อลดปัญหาการจับกันของโมเลกุลสาร halquinol กับ copper ion แต่พบว่ายังเกิดปัญหานี้ในตัวอย่างที่มีปริมาณ halquinol ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น (Cowen and Heyes, 1976)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการวิเคราะห์ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ในอาหารสัตว์ผสมยาสำหรับสุกร โดยการสกัดตัวอย่างอาหารสุกรด้วย methanol จากนั้นจึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPLC-PDA โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 247 nm (Aide *et al.*, 2019) นอกจากเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีรายงานการศึกษาการวิเคราะห์ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ร่วมกับสารอื่น ได้แก่

spectinomycin, zilpaterol และ melamine ในอาหารสัตว์ ได้แก่ อาหารสุกร อาหารสัตว์ปีก อาหารโค และ อาหารเสริมแร่ธาตุ ด้วยเทคนิค LC-MS โดยใช้เทคนิคการสกัดตัวอย่างแบบ Low temperature partitioning-solid liquid extraction และใช้ 80% formic acid เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากอาหารสัตว์มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนทั้งคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ในขั้นตอนการสกัด จึงต้องลดการรบกวนของเมทริกซ์ จากนั้นวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS ซึ่งมีการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ระหว่าง Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) โดยใช้ HILIC column และการวิเคราะห์โดย ion-pair liquid chromatography โดยใช้ C18 column และ Heptafluorobutyric acid (HFBA) เป็น ion-pair reagent ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการวิเคราะห์ด้วย HILIC ใช้เวลานานในการวิเคราะห์เนื่องจากต้องใช้เวลาในการปรับระบบให้สมดุล (equilibrium time) ก่อนการวิเคราะห์ นอกจากนี้ระบบมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH และมีค่าใช้จ่ายสูงในการวิเคราะห์ ส่วนการวิเคราะห์ด้วย ion-pair liquid chromatography พบว่าสามารถแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ดีกว่า และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่า HILIC แต่พบสัญญาณรบกวนใน sample blank และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและค่า pH ยังส่งผลต่อระบบด้วย (Molognoni *et al.*, 2018)

จากข้อมูลข้างต้น ห้องปฏิบัติการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยในสินค้าปศุสัตว์ เห็นความจำเป็นในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ halquinol ในอาหารสัตว์ เพื่รองรับการดำเนินการกิจกรรมตรวจตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 และสนับสนุนกิจกรรมภายใต้แผนเฝ้าระวังสารตกค้าง (residue monitoring plan) ที่จะดำเนินการในอนาคต ทั้งนี้ วิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นยังสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาจัดทำมาตรฐานสินค้าอาหารสัตว์ภายในประเทศได้อีกด้วย และจากรายงานการศึกษาการวิเคราะห์สาร halquinol ดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า มีการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน และมีหลายวิธีการเพื่อช่วยลดผลกระทบจากเมทริกซ์ บางเทคนิคใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายที่สูง จึงต้องมีการหาวิธีที่เหมาะสมช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดสอบ ดังนั้น ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบ halquinol ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ได้แก่ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ โดยเริ่มจากการศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดตัวอย่างในอาหารสัตว์ปีก และหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS จากนั้นจึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทาง EURACHEM Guide, 2025 เป็นตัวแทนตัวอย่างสำหรับการศึกษาในอาหารสัตว์ และเปรียบเทียบวิธีการทดสอบในอาหารสุกรด้วย เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ เชื่อถือได้ และสามารถนำไปใช้

ในการทดสอบตัวอย่างตามกิจกรรมที่เกี่ยวข้องได้อย่างมั่นใจ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ได้อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่อง LC-MS/MS (triple quadrupole) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-MS 8050, เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 และ 0.00001 g, เครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจน, Micropipette ชนิดปรับปริมาตรได้ขนาด 10-100, 20 - 200, 100 - 1,000 และ 500 - 5,000 μ L และ HPLC column Ascentis® Express ขนาด 50 x 3.0 mm, 5 μ m ยี่ห้อ Supelco

2. สารเคมีและสารมาตรฐาน

2.1 สารเคมี

- AR เกรด ได้แก่ Acetonitrile, Magnesium sulfate, Sodium chloride, Acetone, Ethylenediaminetetraacetic acid disodium, Ethyl acetate และ Hexane
- HPLC เกรด ได้แก่ Acetonitrile, Formic acid และ Methanol
- น้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) มีความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18 M Ω .cm

2.2 สารมาตรฐาน (standards)

สารมาตรฐาน halquinol ความบริสุทธิ์ 98 % ยี่ห้อ Toronto Research Chemicals ประกอบด้วย 5,7-Dichloro-8-quinolinol (5,7-DCHQ) 74.21 % และ 5-Chloro-8-quinolinol (5-CHQ) 23.08 % อ้างอิงจากข้อมูล HPLC purity test ใน certificate of analysis

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Stock standard solution, SSS)

เตรียมสารละลายที่ระดับความเข้มข้นรวมของ halquinol 97 μ g/mL (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ 74 μ g/mL และ 5-CHQ คือ 23 μ g/mL) ในตัวทำละลาย methanol แล้วบรรจุในขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเจือจาง (Intermediate standard solution, ISS)

- สารละลายมาตรฐานเจือจางความเข้มข้นรวมของ halquinol 9.7 μ g/mL (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ 7.4 μ g/mL และ 5-CHQ คือ 2.3 μ g/mL) (ISS 1) : ปิเปต SSS ปริมาตร 5 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol แล้วบรรจุในขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ -20°C
- สารละลายมาตรฐานเจือจางความเข้มข้นรวมของ halquinol 973 μ g/L (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ 742 μ g/mL และ 5-CHQ คือ 231 μ g/mL) (ISS 2) : ปิเปต SSS ปริมาตร 0.5 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol แล้วบรรจุในขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

การเตรียมกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย (Standard calibration curve, SCC)

เตรียมกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย 0.1% formic acid in DI water ปริมาตร 1 mL ที่ 6 ระดับความเข้มข้นรวมของ halquinol ได้แก่ 49, 97, 244, 486, 730 และ 973 µg/L ดังตารางที่ 1 โดยมีระดับความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37, 74, 186, 371, 557 และ 742 µg/L และ 5-CHQ คือ 12, 23, 58, 115, 173 และ 231 µg/L

การเตรียมกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ (Matrix calibration curve, MCC)

เตรียมกราฟมาตรฐานด้วยการเตรียม spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานลงใน sample blank จำนวน 5.00 ± 0.05 g ดังตารางที่ 1 แล้วนำไปสกัดตามข้อ 3.2 ให้มีความเข้มข้นรวมของ halquinol ในสารละลายตัวอย่าง ดังนี้ 49, 97, 244, 486, 730 และ 973 µg/kg โดยมีระดับความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37, 74, 186, 371, 557 และ 742 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12, 23, 58, 115, 173 และ 231 µg/kg

ตารางที่ 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายและกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์

SCC (µg/L)	Standard solution	Volume (mL)	MCC (µg/kg)	Standard solution	Volume (mL)
49	ISS2	0.05	49	ISS2	0.50
97	ISS2	0.10	97	ISS2	1.00
244	ISS2	0.25	244	ISS1	0.25
486	ISS2	0.50	486	ISS1	0.50
730	ISS2	0.75	730	ISS1	0.75
973	ISS1	0.10	973	ISS1	0.10

3. การเตรียมตัวอย่าง

3.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ (sample blank)

เตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์จากวัตถุดิบอาหารสัตว์บดละเอียดตามอัตราส่วนที่กำหนด ดังตารางที่ 2 และเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิห้อง (สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2566)

ตารางที่ 2 สูตรอาหารสัตว์ผสมสำหรับสัตว์ปีกและสุกรในการเตรียมตัวอย่าง sample blank

ชนิดวัตถุดิบอาหารสัตว์	ปริมาณ (กรัม) ต่อการเตรียม 1 กิโลกรัม	
	อาหารสัตว์ปีก	อาหารสุกร
ข้าวโพด	600	300
กากถั่วเหลือง	200	150
รำข้าว	80	100
ปลาป่น	40	50
ปลายข้าว	80	400

ที่มา สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ (2566)

3.2 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง (extract)

วิธีการสกัดตัวอย่าง ได้ทำการดัดแปลงจากวิธีของ Zheng *et al.* (2018) โดยชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ปริมาณ 5 ± 0.05 g ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL และเติม magnesium sulfate ปริมาณ 4 g และ sodium chloride ปริมาณ 1 g จากนั้นเติมสารละลาย disodium EDTA ความเข้มข้น 0.02 M ปริมาตร 500 μ L แล้วเติมตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับสกัดสารปริมาตร 20 mL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และเขย่าด้วย shaker 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm ที่ 4 °C นาน 10 นาที นำส่วนใสทั้งหมดมากรองด้วย Glass microfiber filters GF/A และเติม hexane 6 mL แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm เพื่อให้สารละลายแยกชั้น แล้วดูชั้นของ hexane ที่จาง จากนั้นนำสารละลายชั้นล่างระเหยจนแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50°C เติม formic acid ความเข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 1 mL แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer กรองสารละลายด้วย nylon syringe filter ขนาด 0.2 μ m จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

4. การพัฒนาวิธีทดสอบ

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นรวมของ halquinol 97 μ g/L (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ 74 μ g/L และ 5-CHQ คือ 23 μ g/L) ใน methanol เข้าส่วน mass spectrometer โดยตรง เลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดแบบไอออนบวก (positive ionization) เพื่อหาค่า collision energy (CE), Q1 pre bias, Q3 pre bias และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของ precursor ion และ product ion ที่ให้สัญญาณสูงสุดในการวิเคราะห์แบบ multiple reaction monitoring (MRM)

จากนั้นฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นรวมของ halquinol 49, 97, 244, 486, 730 และ 973 μ g/L (ความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37, 74, 186, 371, 557 และ 742 μ g/L และ 5-CHQ คือ 12, 23, 58, 115, 173 และ 231 μ g/L) โดยใช้ HPLC condition ตามตารางที่ 3 และประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานในตัวทำละลายที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) กำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า r^2 มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.995 (U.S. FDA, 2023)

ตารางที่ 3 HPLC condition สำหรับการวิเคราะห์ halquinol

Parameters	Conditions
HPLC column	Ascentis® Express C18 (50 x 3.0 mm, 5 µm)
Flow rate	0.3 mL/min
Injection volume	5 µL
Column oven	40 °C
Mobile phase A	0.1% formic acid in DI water
Mobile phase B	0.1% formic acid in acetonitrile
Elution mode	Gradient elution Initial 10%B; 1.00 min 95%B; 4.01 min 50% B; 6.01 min 90%B; 10.01-15.00 min 10%B
Run time	15 min

4.2 การพัฒนาวิธีการสกัด (extraction)

เปรียบเทียบตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างโดยทำการทดสอบ spiked matrix sample ตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกจำนวน 4 ชุด จำนวนตัวอย่างชุดละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละตัวอย่างมีการเติมสารมาตรฐานลงใน sample blank ให้มีความเข้มข้นรวมของ halquinol 97 µg/kg (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ 74 µg/kg และ 5-CHQ คือ 23 µg/kg) และเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ acetonitrile (ACN), acetone (ACE), methanol (MET) และ ethyl acetate (ETAC) ดังนี้

ชุดที่ 1 เติม ACN ที่ปริมาตร 20 mL

ชุดที่ 2 เติม ACE : ACN (3:1) ที่ปริมาตร 20 mL

ชุดที่ 3 เติม MET : ACN (3:1) ที่ปริมาตร 20 mL

ชุดที่ 4 เติม ETAC : ACN (3:1) ที่ปริมาตร 20 mL

ดำเนินการสกัดตัวอย่างทั้งหมดตามขั้นตอนที่ระบุในข้อ 3.2 โดยประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของการสกัดจากค่า peak area ที่สูงที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการเตรียม matrix calibration curve สำหรับคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) ซึ่งต้องอยู่ในช่วง 80 -110% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ต้องไม่เกิน 11% (AOAC, 2023) เมื่อตัวทำละลายที่เลือกผ่านเกณฑ์ดังกล่าว จึงนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

5.1 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (specificity/selectivity)

ทดสอบ reagent blank, sample blank และ spiked matrix sample ตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นรวมของ halquinol 49 µg/kg (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ

37 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12 µg/kg) เพื่อตรวจการรบกวน โดยพิจารณาสัญญาณที่ปรากฏใน reagent blank และ sample blank เทียบกับ spiked matrix sample เกณฑ์การยอมรับคือ ต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่าตรงกับพีคของสาร halquinol หรือถ้าพบสัญญาณจะต้องพบน้อยกว่าใน spiked matrix sample ที่ระดับ 50 µg/kg

5.2 การหาช่วงการใช้งาน (working range)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงของการทดสอบ โดยการวิเคราะห์ spiked matrix sample ตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยมีความเข้มข้นรวมของ halquinol คือ 49, 97, 244, 486, 730 และ 973 µg/kg (ความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37, 74, 186, 371, 557 และ 742 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12, 23, 58, 115, 173 และ 231 µg/kg) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (แกน x) กับความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ (แกน y) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) กำหนดเกณฑ์ยอมรับค่า $r^2 \geq 0.995$ (U.S. FDA, 2023)

5.3 การตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) และการหาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

ฉีดสาร SCC เทียบกับ MCC ที่เตรียมจากอาหารสัตว์ปีก ตามความเข้มข้นของสารที่อยู่ในช่วง working range ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง LC-MS/MS เมื่อได้ผลทดสอบสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิดโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ 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/11312/2021v2) หากผลการทดลองไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด แสดงว่าเมทริกซ์มีผลต่อการทดสอบ จะมีการเลือกใช้กราฟมาตรฐานแบบ (Matrix calibration curve, MCC) มาใช้ในการศึกษา

$$\%ME = \left(\frac{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์}}{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย}} - 1 \right) \times 100$$

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

หาค่า LOD และ LOQ โดยประมาณด้วยการวิเคราะห์ spiked matrix sample ที่เติมสารมาตรฐาน halquinol ลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกให้มีความเข้มข้นรวมของ halquinol 49 µg/kg (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ 37 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12 µg/kg) จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำไปทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS นำผลทดสอบคำนวณหาค่า standard deviation (S_0) แล้วคำนวณค่า LOD และค่า LOQ จากสูตร ดังนี้ (EURACHEM Guide, 2025)

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

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

n = จำนวนซ้ำของตัวอย่างตามวิธีทดสอบในงานประจำ ($n = 2$)

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

โดยการยืนยันค่า LOD กำหนดเกณฑ์ยอมรับค่า $S/N \geq 3$ และการยืนยันค่า LOQ จากค่า %RSD และ %MR กำหนดเกณฑ์ยอมรับดังตารางที่ 4 (AOAC, 2023)

5.5 การทดสอบหาค่าความแม่นยำ (accuracy) และการทดสอบหาค่าความเที่ยง (precision)

5.5.1 การทดสอบหาค่าความแม่นยำและการทดสอบหาค่าความเที่ยงแบบการทวนซ้ำของการวัด (repeatability, %RSD_r)

เติมสารมาตรฐาน halquinol ในตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก จำนวน 10 ซ้ำ ที่ 3 ระดับความเข้มข้นรวมของ halquinol ได้แก่ LOQ, 486 และ 973 µg/kg (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ ที่ระดับ LOQ 371 และ 742 µg/kg และ 5-CHQ ที่ระดับ LOQ 115 และ 231 µg/kg) ทำการสกัดและทดสอบวันเดียวกัน ประเมินความแม่นยำโดยพิจารณาจากค่า %MR และความเที่ยงพิจารณาจาก %RSD_r ของแต่ละระดับความเข้มข้น โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับดังตารางที่ 4 (AOAC, 2023)

5.5.2 การทดสอบหาค่าความแม่นยำและการทดสอบหาค่าความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility, %RSD_R)

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อที่ 5.5.1 อีกจำนวน 1 ชุด แต่ทำการสกัดและทดสอบต่างวันกัน ประเมินความเที่ยงและแม่นยำของตัวอย่างทั้ง 2 ชุด โดยพิจารณาจากค่า %MR และ %RSD_R ของแต่ละระดับความเข้มข้น กำหนดเกณฑ์การยอมรับดังตารางที่ 4 (AOAC, 2023)

ตารางที่ 4 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

6. การทดสอบสาร halquinol ในอาหารสุกร

6.1 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (specificity/selectivity)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยเตรียม sample blank และ spiked matrix sample จากอาหารสุกร เพื่อตรวจการรบกวนโดยพิจารณาสัญญาณที่ปรากฏใน reagent blank, sample blank เทียบกับ spiked matrix sample เกณฑ์การยอมรับคือ ต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่าตรงกับพีคของสาร halquinol หรือถ้าพบสัญญาณจะต้องพบน้อยกว่าใน spiked matrix sample ที่ระดับ 50 µg/kg

6.2 การหาช่วงการใช้งาน (working range)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงของการทดสอบ โดยการวิเคราะห์ spiked matrix sample ตัวอย่างอาหารสุกร ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้นรวมของ Halquinol คือ 49, 97, 244, 486, 730 และ 973 µg/kg (ความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37, 74, 186, 371, 557 และ 742 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12, 23, 58, 115, 173 และ 231 µg/kg) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (แกน x) กับความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ (แกน y) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) กำหนดเกณฑ์ยอมรับค่า $r^2 \geq 0.995$ (U.S. FDA, 2023)

6.3 การตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) และการหาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 5.3 โดยใช้ MCC ที่เตรียมจากอาหารสุกร และประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่า r^2 กำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า $r^2 \geq 0.995$ (U.S. FDA, 2023) แล้วทำการเปรียบเทียบและประเมิน %matrix effect (ME) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย ซึ่งค่าการยอมรับไม่เกิน $\pm 20\%$ (SANTE/11312/2021v2)

6.4 การเปรียบเทียบการทดสอบสาร halquinol ในอาหารสัตว์ปีกและอาหารสุกร

ทดสอบ spiked sample ของสาร halquinol ในตัวอย่างอาหารสัตว์จำนวน 2 ชุด ได้แก่ อาหารสัตว์ปีก และอาหารสุกร โดยในแต่ละชุดทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้นรวมของ halquinol ได้แก่ LOQ, 486 และ 973 µg/kg (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ ที่ระดับ LOQ 371 และ 742 µg/kg และ 5-CHQ ที่ระดับ LOQ 115 และ 231 µg/kg) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Analysis ToolPak ในโปรแกรม Excel ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนจากชนิดตัวอย่างอาหารสัตว์ที่แตกต่างกัน (F-test) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบจากชนิดตัวอย่างอาหารสัตว์ที่แตกต่างกัน (t-test) โดยเปรียบเทียบค่า t ที่คำนวณได้จากข้อมูล (T_{cal}) กับค่าวิกฤตที่กำหนดไว้ (T_{crit}) หากค่า $T_{cal} < T_{crit}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบจากชนิดตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกและอาหารสุกรมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีทดสอบ

1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร halquinol ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะ positive ESI mode เริ่มจากการทำการทำ precursor ion scan ได้ค่า m/z ที่ให้ intensity สูงที่สุดสำหรับ 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline (5,7-DCHQ) คือ 214.00 m/z และ 5-chloro-8 hydroxyquinoline (5-CHQ) คือ 180.10 m/z หลังจากนั้นหา product ion สำหรับสารดังกล่าวโดยการใช้โหมด product ion scan ซึ่งได้ค่า m/z ของ product ion คือ 123.00 m/z และ 179.00 m/z สำหรับ 5,7-DCHQ และ 117.05 และ 127.05 m/z สำหรับ 5-CHQ โดยการหา precursor ion และ product ion ทำภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามตารางที่ 5 และสภาวะที่เหมาะสมของ MRM transitions สำหรับการวิเคราะห์ halquinol แสดงดังตารางที่ 6 และผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นรวมของ halquinol ในช่วง 49 – 973 µg/L (ช่วงความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37 - 742 µg/L และ 5-CHQ คือ 12 - 231 µg/L) ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC condition ตามตารางที่ 3 มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) เท่ากับ 0.9983 สำหรับ 5,7-DCHQ และ 0.9969 สำหรับ 5-CHQ เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (U.S. FDA, 2023) ตารางที่ 5 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

parameters	values
Ion source	ESI (positive)
Ion spray voltage	4 kV
Nebulizing gas flow	3 L/min
Heating gas flow	10 L/min
Interface temperature	300 °C
DL temperature	250 °C
Heat block temperature	400 °C
Drying gas flow	10 L/min

ตารางที่ 6 MRM transitions ของ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ

Compounds	Precursor ion, Q1 (m/z)	Product ion, Q3 (m/z)	Q1 pre bias (V)	CE (V)	Q3 pre bias (V)	Dwell time (msec)	RT (min)
5,7-DCHQ	214.00	123.00*	-8.2	-36.2	-20.6	100	3.44
	214.00	179.00	-15.9	-24.2	-17.5	100	
5-CHQ	180.10	117.05*	-9.8	-28.8	-20.6	100	3.17
	180.10	127.05	-9.8	-34.8	-26.8	100	

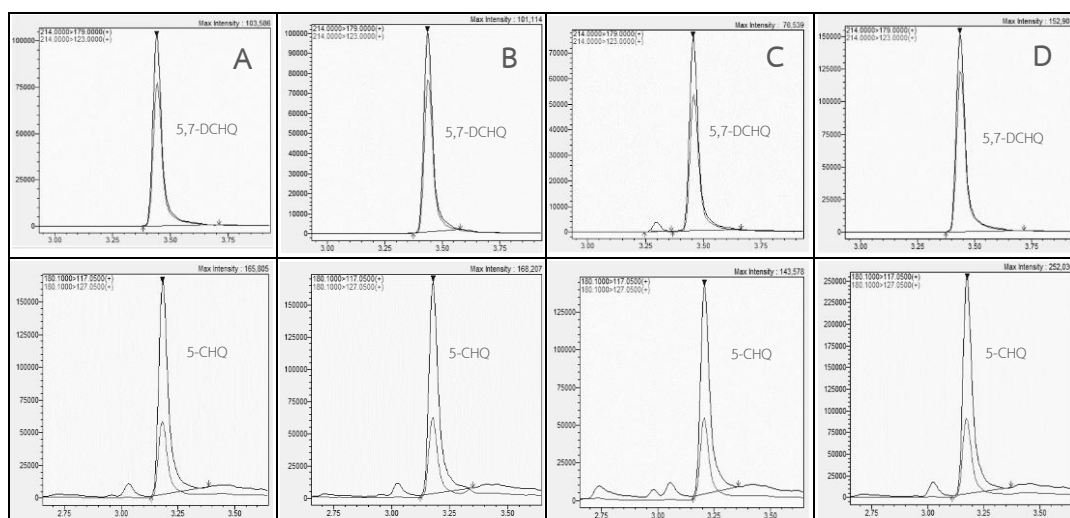
หมายเหตุ * = Quantifier

1.2 การพัฒนาวิธีการสกัด (extraction)

ในขั้นตอนการพัฒนาวิธีในการสกัดตัวอย่าง ได้ใช้ตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเปรียบเทียบชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายภายใต้เงื่อนไขการทดลองเดียวกัน เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการสกัด จากการเปรียบเทียบค่า peak area ของตัวทำละลายแต่ละชนิด พบว่า ETAC : ACN (3:1) ให้ค่า peak area สูงที่สุด รองลงมาคือ ACN, ACE : ACN (3:1) และ MET : ACN (3:1) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 และมีลักษณะโครมาโทแกรมของการศึกษาตัวทำละลายแต่ละชนิดดังแสดงในภาพที่ 1 จึงเลือกใช้ตัวทำละลายชนิด ETAC : ACN (3:1) สำหรับขั้นตอนการสกัด พบว่า % Mean recovery (%MR) ของ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ เท่ากับ 104 % และ 102 % ตามลำดับ และ %RSD เท่ากับ 2.54% และ 2.94% ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023) โดยสอดคล้องกับรายงานของ Mushigeri *et al.* (2006) ได้มีการใช้ ETAC และ ACN ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างตับไก่เพื่อวิเคราะห์สาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ โดยเทคนิค HPLC นอกจากนี้ Zheng *et al.* (2018) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS และพบว่าการใช้ ETAC ร่วมกับ ACN ในการสกัดตัวอย่างได้ค่า %recovery สูงกว่าการใช้เฉพาะ ETAC เพียงชนิดเดียว ขณะเดียวกัน Yang *et al.* (2019) รายงานว่าสาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ สามารถละลายใน ETAC ได้ดีกว่าใน ACN ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจาก JECFA (2017) ที่ระบุว่าสารทั้งสองมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ โดยพิจารณาจากค่าความมีขั้วของตัวทำละลายพบว่า ETAC มีค่าเท่ากับ 23 ขณะที่ ACN, ACE และ MET มีค่าเท่ากับ 46, 35.5 และ 76.2 ตามลำดับ (เมื่อเทียบกับน้ำซึ่งมีค่า polarity เท่ากับ 100) (Smallwood, 1996)

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดสอบสาร halquinol ที่มีองค์ประกอบหลักคือ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ในอาหารสัตว์ จึงพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างให้มีความจำเพาะกับสารที่สนใจ ด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตรายน้อยกว่า chloroform ในการสกัดตัวอย่าง และหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิสูงซึ่งอาจส่งผลต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Cowen และ Heyes (1976) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด hexane มาช่วยกำจัดไขมันในตัวอย่างอาหารสัตว์ หลังจากทำการสกัดด้วย ETAC : ACN (3:1) ซึ่งโดยทั่วไปการสกัดหรือเตรียมตัวอย่างที่มีโปรตีนหรือไขมันที่อาจรบกวนในกระบวนการวิเคราะห์สารที่ต้องการมักมีการเติม hexane เพื่อกำจัดไขมัน (Cho *et al.*, 2011) นอกจากนี้ในขั้นตอนการสกัดยังมีการเติม magnesium sulfate และ sodium chloride ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ข้างต้น เพื่อทำให้เกิด salting-out effect ซึ่งส่งเสริมให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน และเป็นการดึงน้ำออกจากชั้นของสารละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดสาร halquinol จากตัวอย่าง จากนั้นมีการเติม Na₂EDTA เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้สาร halquinol จับตัวกับ cation เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด (Tegegne *et al.*, 2023) ซึ่งจากวิธีที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าสามารถสกัดสาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ในตัวอย่างอาหาร

สัตว์ปีกได้ดี ค่า %MR และ %RSD ของสาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ได้ตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด จึงเลือกใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป



ภาพที่ 1 Extract ion chromatograms ของ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ในขั้นตอนการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดตัวอย่าง; (A) ACN, (B) ACE : ACN (3:1), (C) MET : ACN (3:1) และ (D) ETAC : ACN (3:1)

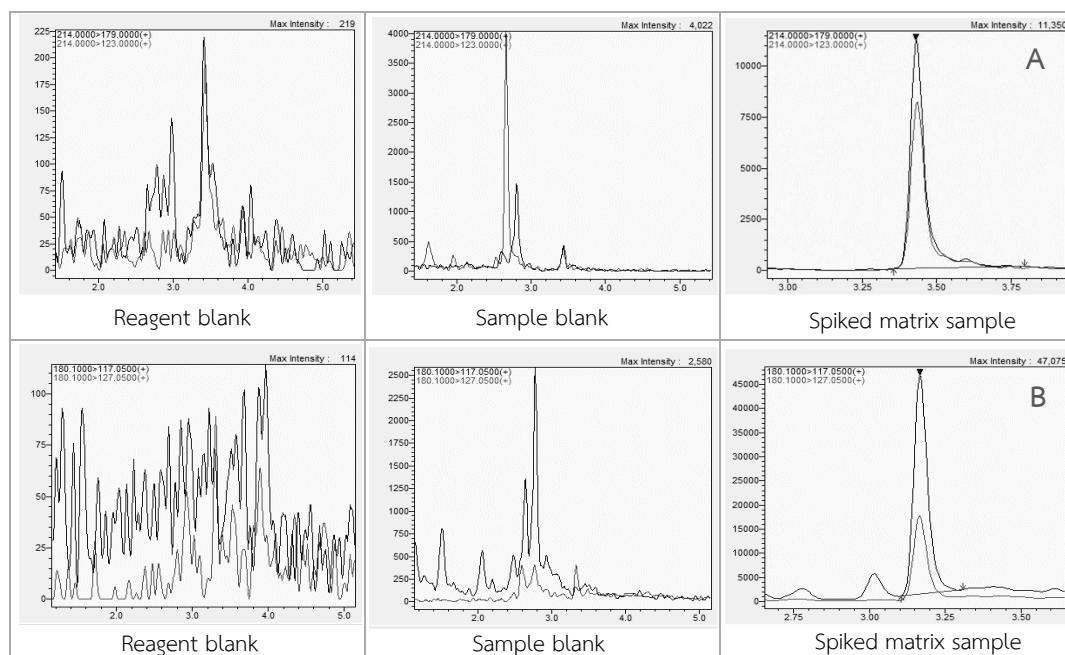
ตารางที่ 7 ค่า Mean peak area ของการทดสอบชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

ชนิดตัวทำละลาย	Mean peak area	
	5,7-DCHQ	5-CHQ
ACN	315667	633545
ACE : ACN (3:1)	274229	522063
MET : ACN (3:1)	211690	429249
ETAC : ACN (3:1)	449485	736947

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

2.1 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (specificity/selectivity)

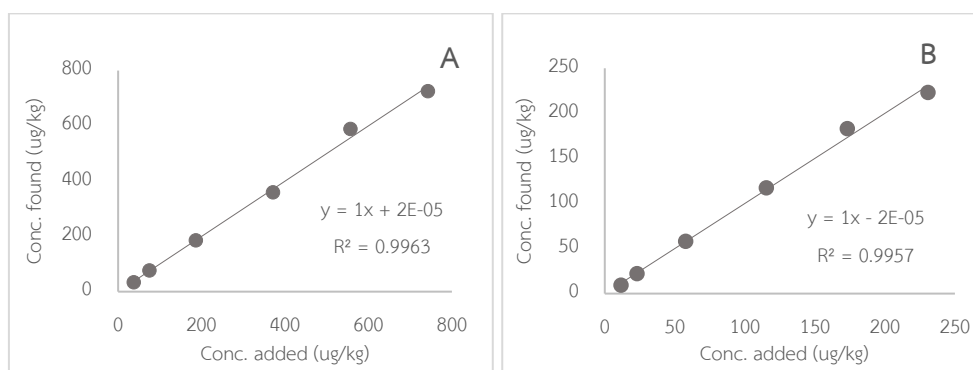
จากการทดสอบและเปรียบเทียบสัญญาณของ reagent blank, sample blank และ spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นรวมของ halquinol 49 µg/kg (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ 37 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12 µg/kg) ไม่พบสัญญาณรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน reagent และ matrix ที่ให้สัญญาณหรือมีพีคตรงกับสาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ เมื่อเทียบกับ RT ของสารมาตรฐานในช่วง ± 0.1 นาที เป็นไปตามเกณฑ์ของ SANTE/11312/2021 V2 แสดงว่าวิธีการทดสอบมีความจำเพาะต่อสาร halquinol ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 Extract ion chromatograms ของ reagent blank, sample blank และ spiked matrix sample ตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกที่เติมสารละลายมาตรฐาน halquinol ที่ความเข้มข้น 49 µg/kg ; (A) 5,7-DCHQ และ (B) 5-CHQ

2.2 ช่วงการใช้งาน (working range)

จากการทดสอบสารสกัดใน spiked matrix sample ที่ความเข้มข้นรวมของ halquinol 49, 97, 244, 486, 730 และ 973 µg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ (ความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37, 74, 186, 371, 557 และ 742 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12, 23, 58, 115, 173 และ 231 µg/kg) และสร้างกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง และแกน Y เป็นความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ ดังภาพที่ 3 เมื่อคำนวณสมการเส้นตรงและตรวจสอบค่า r^2 พบว่ากราฟของสารทุกชนิดที่ตรวจวิเคราะห์เป็นเส้นตรง ซึ่งได้ค่า r^2 ของสาร 5,7-DCHQ เท่ากับ 0.9963 และสาร 5-CHQ เท่ากับ 0.9957 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของค่า $r^2 \geq 0.995$ (U.S. FDA, 2023) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเป็นเส้นตรงของช่วงการใช้งานในช่วงความเข้มข้น 37 – 742 µg/kg สำหรับ 5,7-DCHQ และ 12 -231 µg/kg สำหรับ 5-CHQ



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ปริมาณสาร (A) 5,7-DCHQ และ (B) 5-CHQ ในอาหารสัตว์ปีก

2.3 ผลกระทบจากเมทริกซ์ และช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน SCC เทียบกับ MCC ตามความเข้มข้นของสารที่อยู่ในช่วง working range พบว่ากราฟมาตรฐานของสาร 5,7-DCHQ มีความเป็นเส้นตรงดีตั้งแต่ความเข้มข้น 37 – 742 µg/kg และกราฟมาตรฐานของสาร 5-CHQ มีความเป็นเส้นตรงดีตั้งแต่ความเข้มข้น 12 – 231 µg/kg โดยกราฟมาตรฐานมีค่า $r^2 \geq 0.995$ และมีสมการเส้นตรง ($y = mx + c$) ตามตารางที่ 8 และเมื่อนำค่าความชัน (slope) ของกราฟมาตรฐานทั้งสองชนิดมาคำนวณค่า %ME พบว่า สาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ มีค่า %ME เท่ากับ -99.65 % และ -91.46 % ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า $\pm 20\%$ ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (SANTE/11312/2021 V2) แสดงว่าเมทริกซ์มีผลกระทบกับสาร halquinol ซึ่งอาจมาจากการชะร่วมนกันของสารอื่นที่อยู่ในเมทริกซ์ และบางครั้งไม่สามารถกำจัดผลกระทบจากเมทริกซ์ออกไปได้ทั้งหมด ซึ่งการชดเชยผลกระทบดังกล่าวสามารถทำได้โดยใช้ internal standard (ISTD), การใช้ standard addition (STDA) calibrations หรือการใช้ matrix-matched external standard (MM-ESTD) (EURACHEM Guide, 2025) และในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการใช้กราฟมาตรฐาน (MCC) ในการทดสอบสาร halquinol ในอาหารสัตว์ปีก

ตารางที่ 8 ผลกระทบจากเมทริกซ์ในอาหารสัตว์ปีก และความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน halquinol

Compounds	MCC		SCC		%ME
	Calibration curve	r^2	Calibration curve	r^2	
5,7-DCHQ	$287.41x + 331.42$	0.9963	$82800x - 834218$	0.9983	-99.65
5-CHQ	$3408.6x + 3229.9$	0.9957	$39918x + 39713$	0.9969	-91.46

2.4 ค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

ผลการทดสอบ spiked matrix sample ที่ความเข้มข้นรวมของ halquinol คือ 49 µg/kg (ความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12 µg/kg) คำนวณค่า LOD จาก $3S_0$ สำหรับ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ได้ 7.89 และ 2.32 µg/kg ตามลำดับ และคำนวณค่า LOQ จาก $10S_0$ สำหรับ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ได้ 26.30 และ 7.73 µg/kg ตามลำดับ จึงทำการทดสอบยืนยันค่า LOD ที่ความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 7 µg/kg และ 5-CHQ คือ 2 µg/kg พบว่า S/N ของ 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ใน spiked matrix sample มีค่า ≥ 3 และการยืนยันค่า LOQ ที่ความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37 µg/kg และ 5-CHQ คือ 12 µg/kg พบว่าสาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ มีค่า %MR อยู่ในเกณฑ์ยอมรับในช่วง 80 – 110% (AOAC, 2023) โดยมีค่าเท่ากับ 84.39% และ 82.80% ตามลำดับ ส่วนค่า %RSD อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 15% (AOAC, 2023) โดยสาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ มีค่าเท่ากับ 13.16% และ 11.51% ตามลำดับ รายละเอียดดังตารางที่ 9 แสดงว่าวิธีทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นมีค่า LOD ของสาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ ที่ความเข้มข้น 7 และ 2 µg/kg ตามลำดับ และมีค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 37 และ 12 µg/kg ตามลำดับ

ตารางที่ 9 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

Compounds	Spiked sample 50 µg/kg (n=10)			LOD (10 µg/kg, n=10)	LOQ (50 µg/kg, n=10)	
	S'_0	LOD ($3S'_0$)	LOQ ($10 S'_0$)	Mean S/N	%MR	%RSD _r
5,7-DCHQ	2.63	7.89	26.30	34.69	84.39	13.16
5-CHQ	0.77	2.32	7.73	27.72	82.80	11.51

2.5 ค่าความแม่นยำ (accuracy) และค่าความเที่ยง (Precision)

ผลการตรวจสอบความแม่นยำจาก %MR และความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability precision) และแบบการทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) จากค่า %RSD ใน spiked matrix sample โดยมีความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ ที่ 37 (LOQ), 371 และ 742 µg/kg และความเข้มข้นของ 5-CHQ ที่ 12 (LOQ), 115 และ 231 µg/kg ดังตารางที่ 10 พบว่าการทดสอบแบบทวนซ้ำได้มีค่า %MR ตั้งแต่ 89.94 – 95.78% สำหรับ 5,7-DCHQ และ 83.80 – 98.14% สำหรับ 5-CHQ และค่า RSD_r ตั้งแต่ 2.30 – 5.65% สำหรับ 5,7-DCHQ และ 3.19 – 7.75 % สำหรับ 5-CHQ สำหรับการทดสอบแบบทำซ้ำได้มีค่า %RSD_R ตั้งแต่ 3.34 – 5.90% สำหรับ 5,7-DCHQ และ 4.97 – 7.08% สำหรับ 5-CHQ โดยค่า %MR, %RSD_r และ %RSD_R จากการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (Precision) เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้

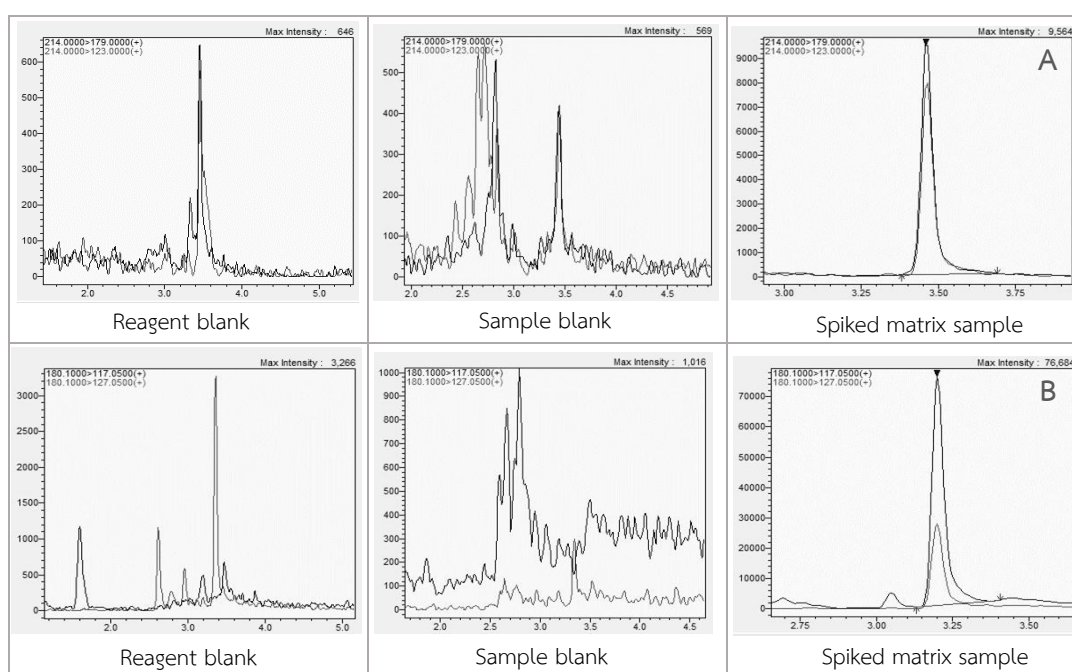
ตารางที่ 10 ค่า % MR และ %RSD ของการทดสอบสาร halquinol ในอาหารสัตว์ปีก

Compounds	Spiked level (µg/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)	
5,7-DCHQ	37		15	22	95.60 (5.65)	90.40 (4.87)	93.00 (5.90)
	371	80 - 110	15	22	92.70 (5.42)	89.94 (5.12)	91.32 (5.36)
	742		11	16	92.98 (2.30)	95.78 (3.62)	94.38 (3.34)
5-CHQ	12		15	22	83.80 (7.75)	84.20 (6.76)	84.00 (7.08)
	115	80 - 110	15	22	90.16 (7.23)	93.56 (4.05)	91.86 (5.96)
	231		11	16	98.14 (3.19)	92.50 (4.82)	95.32 (4.97)

3. การทดสอบสาร halquinol ในอาหารสุกร

3.1 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (specificity/selectivity)

จากการทดสอบและเปรียบเทียบสัญญาณของ reagent blank, sample blank และ spiked matrix sample ในอาหารสุกร เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นรวมของ halquinol 49 $\mu\text{g/kg}$ (ความเข้มข้น 5,7-DCHQ คือ 37 $\mu\text{g/kg}$ และ 5-CHQ คือ 12 $\mu\text{g/kg}$) ไม่พบสัญญาณรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน reagent และ matrix ที่ให้สัญญาณหรือมีพีคตรงกับสาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ เมื่อเทียบกับ RT ของสารมาตรฐานในช่วง ± 0.1 นาที เป็นไปตามเกณฑ์ของ SANTE/11312/2021 V2 แสดงว่าวิธีการทดสอบมีความไวและความจำเพาะต่อสาร halquinol ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 Extract ion chromatograms ของ reagent blank, sample blank และ spiked matrix sample ในอาหารสุกร ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นรวมของ halquinol 49 $\mu\text{g/kg}$; (A) 5,7-DCHQ และ (B) 5-CHQ

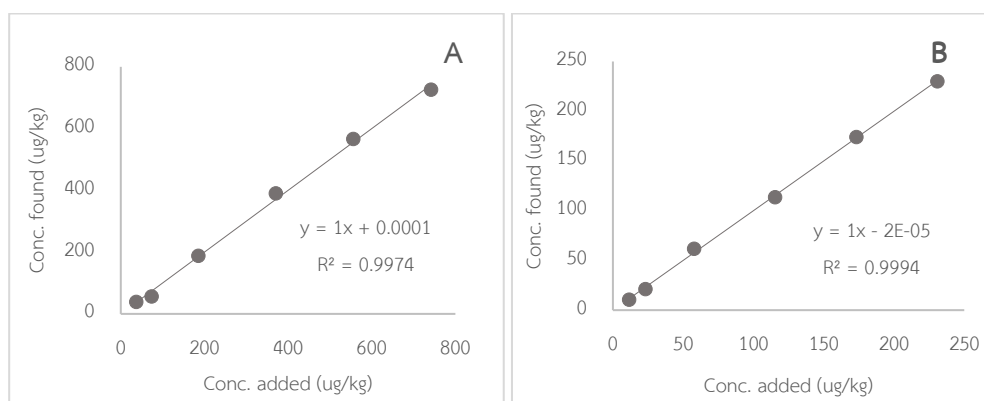
3.2 การหาช่วงการใช้งาน (working range)

จากการทดสอบสารสกัดใน spiked matrix sample ในอาหารสุกรที่ความเข้มข้นรวมของ halquinol 49, 97, 244, 486, 730 และ 973 $\mu\text{g/kg}$ ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว (ความเข้มข้นของ 5,7-DCHQ คือ 37, 74, 186, 371, 557 และ 742 $\mu\text{g/kg}$ และระดับความเข้มข้นของ 5-CHQ คือ 12, 23, 58, 115, 173 และ 231 $\mu\text{g/kg}$) และสร้างกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง และแกน Y เป็นความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ ดังภาพที่ 5 เมื่อคำนวณสมการเส้นตรงและตรวจสอบค่า r^2 พบว่ากราฟของสารทุกชนิดที่ตรวจวิเคราะห์เป็นเส้นตรง ซึ่งได้ค่า r^2 ของสาร 5,7-DCHQ เท่ากับ 0.9974 และสาร 5-CHQ เท่ากับ 0.9994 ซึ่งอยู่ใน

เกณฑ์ยอมรับของค่า $r^2 \geq 0.995$ (U.S. FDA, 2023) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเป็นเส้นตรงของช่วงการใช้งานอยู่ในช่วง 37 – 742 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ 5,7-DCHQ และ 12 -231 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ 5-CHQ

3.3 ผลกระทบจากเมทริกซ์ และช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน SCC เทียบกับ MCC ตามความเข้มข้นของสารที่อยู่ในช่วง working range พบว่ากราฟมาตรฐานของสาร 5,7-DCHQ มีความเป็นเส้นตรงดีตั้งแต่ความเข้มข้น 37 – 742 $\mu\text{g/kg}$ และกราฟมาตรฐานของสาร 5-CHQ มีความเป็นเส้นตรงดีตั้งแต่ความเข้มข้น 12 – 231 $\mu\text{g/kg}$ โดยกราฟมาตรฐานมีค่า $r^2 \geq 0.995$ และมีสมการเส้นตรง ($y = mx + c$) ตามตารางที่ 11 และเมื่อคำนวณค่า %ME พบว่า สาร 5,7-DCHQ และ 5-CHQ มีค่า %ME เท่ากับ -99.41 % และ -89.51 % ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า $\pm 20\%$ ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (SANTE/11312/2021 V2) และมีค่าสอดคล้องกับค่า %ME ในอาหารสัตว์ปีก แสดงว่าเมทริกซ์มีผลกระทบกับสาร halquinol ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการใช้กราฟมาตรฐาน (MCC) ในการทดสอบสาร halquinol ในอาหารสุกร



ภาพที่ 5 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ปริมาณสาร (A) 5,7-DCHQ และ (B) 5-CHQ ในอาหารสุกร

ตารางที่ 11 ผลกระทบจากเมทริกซ์ในอาหารสุกร และความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน halquinol

Compounds	MCC		SCC		%ME
	Calibration curve	r^2	Calibration curve	r^2	
5,7-DCHQ	486.15x - 10287	0.9974	82800x - 834218	0.9983	-99.41
5-CHQ	4185.9x - 14921	0.9994	39918x + 39713	0.9969	-89.51

3.4 การเปรียบเทียบการทดสอบสาร halquinol ในอาหารสัตว์ปีกและอาหารสุกร

จากการเปรียบเทียบความแปรปรวนของวิธีทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกและอาหารสุกร พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($F_{\text{cal}} < F_{\text{crit}}$) จากนั้นนำผลของความแปรปรวนที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่วัดได้ของวิธีทดสอบจากตัวอย่างทั้ง

สองชนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($t_{cal} < t_{crit}$) ดังแสดงในตารางที่ 12

ดังนั้น วิธีทดสอบสาร halquinol โดยเทคนิค LC-MS/MS นี้ สามารถใช้ในการทดสอบทั้ง ตัวอย่างอาหารสัตว์ปีกและอาหารสุกร

ตารางที่ 12 ผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย F-test และ t-test ของการทดสอบสาร halquinol ในอาหารสัตว์ปีกและอาหารสุกร

Compounds	spiked	อาหารสัตว์ปีก		อาหารสุกร		F_{cal}	F_{crit}	T_{cal}	T_{crit}
	Level ($\mu\text{g/kg}$)	Mean ($\mu\text{g/kg}$)	Variance	Mean ($\mu\text{g/kg}$)	Variance				
5,7-DCHQ	37	35.47	4.01	36.59	2.09	1.92	4.02	-1.43	2.10
	371	343.96	347.22	332.39	346.02	1.00	4.02	1.39	2.10
	742	690.00	252.57	703.46	161.62	1.56	4.02	-2.09	2.10
5-CHQ	12	9.67	0.56	9.56	0.45	1.15	4.02	0.36	2.10
	115	104.04	56.58	105.78	58.14	1.00	4.02	-0.52	2.10
	231	226.51	52.11	224.45	35.75	1.46	4.02	0.69	2.10

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบนี้เหมาะสมสำหรับการทดสอบสาร halquinol ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบอ้างอิงตามวิธีของ EURACHEM Guide, 2025 เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน มีความเที่ยงและความแม่นยำในเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (2023) โดยมีค่า LOD เท่ากับ 7 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ 5,7-DCHQ และ 2 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ 5-CHQ , LOQ เท่ากับ 37 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ 5,7-DCHQ และ 12 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ 5-CHQ และ ช่วงของการทดสอบที่ 37-742 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ 5,7-DCHQ และ 12-231 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ 5-CHQ ในอาหารสัตว์ สามารถนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบตัวอย่างพร้อมกับการควบคุมคุณภาพภายใน เพื่อตรวจสอบกับค่ามาตรฐานของ CODEX ได้ สามารถรองรับการดำเนินการกิจกรรมตรวจตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 กิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้าง (residue monitoring plan) ที่จะดำเนินการในอนาคต และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025

ข้อเสนอแนะ

ในการเลือกใช้สารมาตรฐานควรเลือกชนิดเดียว (individual) ที่ระบุค่าความบริสุทธิ์ (purity) อย่างชัดเจน สามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา เพื่อให้ผลการทดสอบมีคุณภาพและความถูกต้องมากขึ้น และนอกจากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบแล้ว ควรมีการประเมินและรายงานค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) ของการวัดเพื่อแสดงความน่าเชื่อถือของวิธีทดสอบ และควรเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) หรือการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) สำหรับรายการทดสอบสาร halquinol ในอาหารสัตว์ เพื่อประเมินความสามารถของวิธีทดสอบ และยืนยันความถูกต้องของผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ นางสาวรัชก ทออ่อน นางสาวเสาวรี อุดมพันธ์ และบุคลากรงานพิษวิทยา และชีวเคมี (สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ใจพร พุ่มคำ. 2555. อาหาร (ไม่)ปลอดภัย... ผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์. *วารสารอาหารและยา*. 8-11.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิด ลักษณะหรือคุณสมบัติของวัตถุที่ห้ามใช้ผสมในอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558. 21 สิงหาคม 2558. *ราชกิจจานุเบกษา*. เล่ม 132 ตอนพิเศษ 193 ง หน้า 3.
- พอใจ รัตนบัณฑิต และ พัชรี ภัคพงศ์. 2565. การศึกษารูปแบบการใช้ยาต้านแบคทีเรียที่ผสมในอาหารสัตว์ในฟาร์มไก่และสุกรที่จัดตั้งเป็นผู้ผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยา ในสถานที่เลี้ยงสัตว์ของตนเอง. แหล่งที่มา: <https://afvc.dld.go.th/webnew/index.php/th/news-afvc/vichakan-afvc/1480-vichakan-2565>. [13 กันยายน 2567]
- สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2566. สูตรอาหารสัตว์ที่กรมปศุสัตว์แนะนำ. แหล่งที่มา: <https://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/2015-08-06-09-04-25/2944-2023-08-22-03-39-18>. [19 พฤษภาคม 2567].
- Aide, C. R. M., Gabriela, R. P., Luisa, R. V. A., Eduardo, R. S. M. and Raquel, L. A. 2019. Validation of a UPLC-PDA method to study the content and stability of 5-chloro

- 8-hydroxyquinoline and 5,7-dichloro 8-hydroxyquinoline in medicated feed used in swine farming. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 166: 113-118.
- AOAC Official Methods of Analysis. 2023. Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F: 1-18.
- Cho, H.J., Jo, K., Yi, H., Cho, S.M., Abd El-Aty, A.M., Kim, M.K., Han, S.B., Oh, J.H., Kwon, C.H., Shim, J.H. and Shin, H.C. 2011. Development and validation of a liquid chromatography method with electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of brotizolam residues in beef and commercial whole milk. *Biomedical Chromatography*. 25: 1061-1066.
- Codex. 2021. Joint FAO/WHO food standards programme CODEX committee on residues of veterinary drugs in foods 25th session (virtual) 12-16 and 20 July 2021 comments submitted by Thailand.
- Codex. 2024. CXM 2-2024. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in food. *Codex Alimentarius international food standards*.
- Cowen, T., and Heyes, W.F. The Determination of Chlorhydroxyquinoline in Medicated Pig Feeds. 1976. *Analyst*. 101: 167-173.
- EURACHEM Guide. 2025. The Fitness for Purpose of Analytical Method A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 3rd edition.
- 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.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2021. EFSA review of Maximum Residue Limits for halquinol in pig tissues as set by JECFA. *EFSA Technical report*.
- Habib, Md. A., Haque, Md. A., Islam, Md. S. and Liton, Md. R. 2024. The Effect of Halquinol (HAL) on Growth Performance, Carcass Traits and Blood-lipid Profile in Broiler Chickens. *International Journal of Agriculture and Biosciences*. 13(1): 39-45.
- Health Policy and Systems Research on Antimicrobial Resistance (HPSR-AMR) Network. 2025. *Highlights Thailand One Health Report 2022: Antimicrobial Consumption and Antimicrobial Resistance*. International Health Policy Program. 44 pages.

- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2017. Residue Monograph prepared by the meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 85th Meeting 2017 (Halquinol). *FAO JECFA Monographs* 21.
- Lee, T. H., Park, S. Y., Kim, J. Y., Choi, J. D. and Moon, G. 2023. Establishment of analysis method for the quantification of residues of halquinol and its metabolites in livestock and fishery products using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Applied Biological Chemistry*. 66: 1-13.
- Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., Mills, A., Rushton., J. and Yeung, S. 2019. How antibiotics are used in pig farming: a mixed-methods study of pig farmers, feed mills and veterinarians in Thailand. *BMJ Global Health*. 5:1-12.
- Molognoni, L., Souzac, N. C., de Sa Ploêncioa, L. A., Mickec, G. A. and Daguer, H. 2018. Simultaneous analysis of spectinomycin, halquinol, zilpaterol, and melamine in feedingstuffs by ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*.
- Mushigeri, S., Ganesh, M. and Radhakrishma, P.M. 2006. A validated method for halquinol extraction from chicken liver matrix for residual HPLC studies. *Journal of Basic & Clinical Physiology & Pharmacology*. 2(17).
- Smallwood, I.M. 1996. Handbook of Organic Solvent Properties. Arnold. London, England. 326 pages.
- U.S. Food and Drug Administration (2023) Methods, method verification and validation, laboratory manual, ORA laboratory procedure, volume II, ORA-LAB.5.4.5.
- Yang, Z., Shao, D. and Zhou, G. 2019. Solid–Liquid Equilibrium of 5-Chloro-8-hydroxyquinoline and 5,7- Dichloro-8-hydroxyquinoline in Different Solvents and Mixing Properties of Solutions. *Journal of chemical and engineering data*.
- Zheng, W., Choi, J.M., Kim, S.K., Shim, J.H., Kang, Y.S., Abd El-Aty, A.M., Hacimuftuoglu, A. and Shin, H.C. 2018. Determination of halquinol residual levels in animal-derived food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 32(11).