

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์หลายกลุ่มในน้ำนมโคดิบโดยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry

ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน* สุนันท์ กิตติจารุวัฒนา งามอาจ บุญบรรลุ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณสำหรับการตรวจหาสารตกค้างยาสัตว์ 21 ชนิดในน้ำนมโคดิบ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวควบคู่ mass spectrometry แบบ tandem (LC-MS/MS) ครอบคลุมกลุ่ม sulfonamides (sulfadiazine, sulfadoxine, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine), quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, norfloxacin, orbifloxacin, nalidixic acid, flumequine), tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline), β -lactams (cefradine, cephalothin), trimethoprim, lincomycin, albendazole และ olaquinox ตัวอย่างถูกสกัดด้วย Solid Phase Extraction (SPE) และตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ภายใต้โหมด positive electrospray ionization การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีดำเนินการตาม Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 ผลการตรวจสอบพบว่าวิธีมีความเป็นเชิงเส้นที่ดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ≥ 0.990 ค่า trueness (recovery) ที่ระดับ 0.5–1.5 MRL อยู่ในช่วง 86.3–115.0% สอดคล้องกับเกณฑ์ (80–120%) ค่าความเที่ยงระหว่างวัน (%RSDwR) อยู่ระหว่าง 4.96–13.57% ไม่เกินเกณฑ์ ($\leq 15\%$) จากค่า SDwR ได้คำนวณค่าขีดจำกัดการตัดสินใจสำหรับการยืนยันผล (CC_{α}) อยู่ในช่วง 107.8–123.2% ของ MRL และสามารถหาค่าขีดความสามารถในการตรวจหาสำหรับการตรวจคัดกรอง (CC_{β}) ได้ครบถ้วน พบว่าสารตกค้างยาสัตว์บางชนิดไม่ผ่านเกณฑ์ trueness และ precision ที่ระดับ 0.1 MRL อย่างไรก็ตาม CIR 2021/808 ไม่ได้บังคับให้ระดับดังกล่าวต้องผ่าน โดยระบุว่า 0.5 MRL เป็นต้นไปเป็นระดับต่ำสุดที่ต้องตรวจสอบความใช้ได้ ดังนั้นผลที่ 0.1 MRL จึงสามารถใช้เพื่อประเมินความไว (sensitivity check) หรือเป็น screening method ได้ สรุปได้ว่าวิธี LC-MS/MS ที่พัฒนาขึ้นนี้ผ่านเกณฑ์ตามข้อกำหนดทั้งหมดสำหรับการวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณของสารตกค้างยาสัตว์ส่วนใหญ่ และยังสามารถใช้เป็นวิธีคัดกรองที่ระดับความเข้มข้นต่ำ สนับสนุนการเฝ้าระวังความปลอดภัยด้านอาหารและการกำกับดูแลทางกฎหมายของน้ำนมโคดิบ

คำสำคัญ: สารตกค้างยาสัตว์ น้ำนมโคดิบ LC-MS/MS การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี วิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ

เลขทะเบียนวิชาการ: 68(2)-0304-044

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

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

Development and validation of a multi-class veterinary drug residue analysis method in raw cow's milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry

Chusak Ardsoongnearn* Sunan Kittijaruwattana Ongart Boonbanlu

Abstract

This study developed and validated a quantitative confirmatory method for 21 veterinary drug residues in raw cow's milk using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Target compounds included sulfonamides (sulfadiazine, sulfadoxine, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine), quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, norfloxacin, orbifloxacin, nalidixic acid, flumequine), tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline), β -lactams (cefradine, cephalothin), trimethoprim, lincomycin, albendazole, and olaquinox. Samples were extracted by Solid Phase Extraction (SPE) and analyzed in positive electrospray ionization mode. Validation followed Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808. The method achieved excellent linearity with coefficients of determination (R^2) ≥ 0.990 . Trueness (recovery) at 0.5–1.5 MRL ranged from 86.3% to 115.0%, within the acceptance criteria of 80–120%. Within-laboratory reproducibility (%RSD_w) was 4.96–13.57%, meeting the $\leq 15\%$ requirement. Decision limits (CC α), derived from SD_w, ranged from 107.8% to 123.2% of MRL, and corresponding detection capabilities (CC β) were established. At 0.1 MRL, several compounds did not meet trueness and precision criteria. Nevertheless, EU 2021/808 requires validation from 0.5 MRL as the lowest mandatory level. Thus, results at 0.1 MRL served as sensitivity checks or screening purposes. In conclusion, the LC-MS/MS method complied with regulatory requirements for confirmatory quantitative analysis of most veterinary drug residues, while also providing screening capability at low concentration levels, supporting food safety monitoring and regulatory control of raw cow's milk.

Keyword: Veterinary drug residues, raw cow's milk, LC-MS/MS, method validation, quantitative confirmatory method

Scientific No.: 68(2)-0304-044

Bureau of Quality Control of Livestock Products, Tiwanon Rd., Bangkadi, Mueng, Pathumthani, 12000

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

บทนำ

นํ้านมโคดิบเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย จึงเป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม (Linehan *et al.*, 2024) อย่างไรก็ตาม การตรวจพบสารตกค้างยาสัตว์ในนํ้านมโคดิบยังคงเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยเฉพาะในกลุ่มเด็ก ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ซึ่งอาจเกิดอาการแพ้หรือได้รับผลกระทบจากสารตกค้างยาสัตว์เหล่านี้ (Navrátilová, 2008)

สารตกค้างยาสัตว์ในนํ้านมโคดิบมักเกิดจากการใช้ยาในฟาร์มโคนมเพื่อรักษาและป้องกันโรค โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) ซึ่งพบในแม่โครีดนม (Tomanić *et al.*, 2023) การใช้ยาด้านจุลชีพในฟาร์มโคนมสามารถแบ่งตามวัตถุประสงค์ได้เป็น 3 ประเภทหลัก ประเภทแรกคือการรักษาโรค (therapeutic use) ซึ่งมักใช้ยาในกลุ่ม β -lactams เช่น penicillin, ampicillin และ cloxacillin โดยฉีดเข้าเต้านมหรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพื่อรักษาโรคเต้านมอักเสบ สำหรับโรคระบบทางเดินหายใจนิยมใช้ยาในกลุ่ม tetracyclines, macrolides และ fluoroquinolones ส่วนโรคระบบทางเดินอาหารใช้ยาในกลุ่ม aminoglycosides และ sulfonamides (Terashi *et al.*, 2023) ประเภทที่สองคือการป้องกันโรค (prophylactic use) เช่น การให้ยาในช่วงหยุดพักรีดนม (dry cow therapy) เพื่อป้องกันการติดเชื้อในเต้านม การให้ยาป้องกันในลูกโคแรกเกิด และการให้ยาป้องกันในช่วงที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง ประเภทที่สามคือการใช้เพื่อเร่งการเจริญเติบโต (growth promotion) ซึ่งเป็นการใช้ยาด้านจุลชีพในขนาดต่ำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต แม้ว่าปัจจุบันจะมีการห้ามใช้ในหลายประเทศแล้วก็ตาม (Rajala-Schultz *et al.*, 2021)

การตกค้างของยาในนํ้านมโคดิบมักเกิดจากการไม่ปฏิบัติตามระยะหยุดยา (withdrawal period) ที่กำหนด การใช้ยาเกินขนาด หรือการใช้ยาที่ไม่ได้ขึ้นทะเบียนสำหรับโคนม (Sachi *et al.*, 2019) ปัจจัยที่ส่งผลต่อการตกค้างของยามีหลายประการ ได้แก่ คุณสมบัติทางเคมีและเภสัชจลนศาสตร์ของยา เช่น ความสามารถในการละลายในไขมัน การจับกับโปรตีนในเนื้อเยื่อ และอัตราการกำจัดยาออกจากร่างกาย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับวิธีการให้ยา ทั้งขนาดยา ความถี่ในการให้ ตำแหน่งที่ฉีดยา และรูปแบบของยาที่ใช้ รวมถึงสภาพของสัตว์ เช่น อายุ น้ำหนักตัว การทำงานของตับและไต ระยะการให้นม และสภาวะสุขภาพ (Özdemir & Traş, 2018)

เพื่อลดปัญหาการตกค้างของยาด้านจุลชีพในนํ้านมโคดิบ ควรมีการใช้ยาอย่างสมเหตุสมผล โดยใช้ยาเมื่อจำเป็นและตามคำแนะนำของสัตวแพทย์ เลือกใช้ยาที่เหมาะสมกับชนิดของเชื้อก่อโรค และปฏิบัติตามระยะหยุดยาอย่างเคร่งครัด นอกจากนี้ควรมีการจัดการฟาร์มที่ดี มีระบบการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ ดูแลสุขอนามัยในการรีดนม และจัดการสิ่งแวดล้อมในฟาร์มให้เหมาะสม รวมทั้งมีการตรวจติดตามอย่างสม่ำเสมอ ทั้งการตรวจคัดกรองยาตกค้างในนํ้านมโคดิบก่อนส่งจำหน่าย การบันทึกข้อมูลการใช้ยาอย่างละเอียด และการตรวจสอบคุณภาพนํ้านมโคดิบ (Li *et al.*, 2023) การพัฒนาระบบการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพนํ้านมโคดิบที่มีประสิทธิภาพ จะนำไปสู่การคุ้มครองผู้บริโภคและการพัฒนาคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ มีหน้าที่ในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพความปลอดภัยของน้ำนมโคดิบโดยใช้ชุดทดสอบ Delvotest เป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้น ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจคัดกรองยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคดิบ เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และมีต้นทุนไม่สูง อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณของยาที่ตกค้างได้อย่างจำเพาะเจาะจง อาจเกิดผลบวกปลอมหรือผลลบปลอม และไม่สามารถตรวจพบยาบางชนิดที่มีความสำคัญทางกฎหมาย (Bion *et al.*, 2015) ซึ่งในทางมาตรฐานด้านสารตกค้างยาสัตว์นั้น คณะกรรมาธิการโคเด็กซ์ (Codex Alimentarius Commission) ได้เผยแพร่เอกสาร Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods (CXM 2-2024) (Codex Alimentarius Commission, 2024) เป็นข้อมูลอ้างอิงระดับสากลที่มีการกำหนดค่าปริมาณสารตกค้างยาสัตว์สูงสุด (maximum residue limit; MRL) ในน้ำนมโคดิบของยาสัตว์แต่ละชนิดไว้อย่างชัดเจน โดยมีตัวอย่างค่า MRL ของยาด้านจุลชีพที่สำคัญ เช่น penicillin G ที่ 4 µg/kg, tetracycline ที่ 100 µg/kg, streptomycin ที่ 200 µg/kg, sulfonamides มีค่า MRL ที่ 100 µg/kg ส่วน chloramphenicol เป็นยาที่ห้ามใช้ (zero tolerance) ส่วนในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง (กระทรวงสาธารณสุข, 2550) โดยอ้างอิงค่า MRL ส่วนใหญ่มาจาก CODEX ทั้งนี้ทางภาคการเกษตร ในมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 เรื่อง น้ำนมโคดิบ(สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553) ได้กำหนดให้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมายที่เกี่ยวข้อง และข้อกำหนดของมาตรฐานสินค้าเกษตรที่เกี่ยวข้องกับยาสัตว์ตกค้าง โดยไม่พบยาด้านจุลชีพ จากการทดสอบโดยชุดทดสอบเบื้องต้นที่มีผลการประเมินความใช้ได้

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์หลายกลุ่มในน้ำนมโคดิบโดยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) จึงมีความสำคัญ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความเที่ยง (precision) สูง สามารถตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์หลายชนิดพร้อมกัน在一次เดียว (multi-residue analysis) (Hajrulai-Musliu *et al.*, 2022) เทคนิค LC-MS/MS มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำมาก ให้ข้อมูลเชิงโครงสร้างที่จำเพาะเจาะจง ลดการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดพร้อมกัน และใช้เวลาวิเคราะห์ต่อตัวอย่างน้อย (Imamoglu & Oktem Olgun, 2016) การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ในน้ำนมโคดิบ เนื่องจากน้ำนมโคดิบมีโครงสร้างที่ซับซ้อนประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน และองค์ประกอบอื่นๆ ที่อาจรบกวนกระบวนการวิเคราะห์ (Hajrulai-Musliu *et al.*, 2022) นักวิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคการสกัดหลายวิธีเพื่อแยกสารตกค้างออกมาอย่างมีประสิทธิภาพ เทคนิคการสกัดที่นิยมใช้ประกอบด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เช่น acetonitrile (ACN) หรือ methanol (MeOH) เพื่อตกตะกอนโปรตีนและสกัดสารเป้าหมาย วิธีนี้มีความง่าย รวดเร็ว และต้นทุนต่ำ หรือใช้กรด เช่น trichloroacetic acid (TCA) (Alija *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตาม อาจมีสารรบกวนปนเปื้อนมาด้วย นอกจากนี้ยังมีเทคนิค solid phase extraction (SPE) ที่ใช้ตัวดูดซับของแข็งดักจับสารเป้าหมาย โดยเฉพาะตัวดูดซับ Oasis

HLB ที่สามารถดักจับสารได้หลากหลายกลุ่ม (Alija *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2022) และเทคนิค dispersive solid phase extraction (d-SPE) ซึ่งเป็นการพัฒนาต่อยอดโดยเติมตัวดูดซับลงในสารละลายโดยตรง ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารรบกวนมากขึ้น (Islas *et al.*, 2017)

ในปัจจุบัน นักวิจัยนิยมใช้เทคนิคผสมผสาน เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลายตามด้วย SPE หรือ d-SPE (Guo *et al.*, 2022; Koloka *et al.*, 2023) และการใช้ molecular weight cut-off filters เพื่อกำจัดโมเลกุลขนาดใหญ่ ออกจากสารสกัด โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้สารสกัดที่สะอาดและมีความบริสุทธิ์สูงสุด การศึกษาล่าสุดพบว่า วิธีการเตรียมตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพสามารถวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์หลายกลุ่ม อาทิ beta-lactams, sulfonamides, tetracyclines, fluoroquinolones และ macrolides ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนด และผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ตามมาตรฐานสากล (Clark *et al.*, 2011; Turnipseed *et al.*, 2008)

ในการศึกษารุ่นนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณโดยเปรียบวิธีการเตรียมตัวอย่างที่มีความเหมาะสมในการตรวจสอบสารตกค้างยาสัตว์หลายกลุ่มพร้อมกัน เช่น beta-lactams, sulfonamides และ tetracyclines ด้วยเทคนิคการสกัดตัวอย่างเช่น liquid-liquid extraction, SPE และ d-SPE และการ optimize mass spectrometer แบบ multiple reaction monitoring (MRM) หรือ multiple Selected Reaction Monitoring (SRM) ซึ่งเป็นการทำงานแบบ tandem mass spectrometry (MS/MS) จากนั้นจะตรวจสอบความใช้ได้ (method validation) ตามแนวมติคณะกรรมการการยุโรป Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 (CIR 2021/808; European Commission, 2021) ซึ่งระบุเกณฑ์การยอมรับสำหรับพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ค่าความจำเพาะเจาะจง (specificity) ช่วงการวิเคราะห์ (working range) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) ทดสอบ decision limit for confirmation (CC α) รวมถึงการทดสอบความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยภายนอก (ruggedness) ซึ่งจะทำให้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพเชื่อถือได้ สามารถนำไปใช้งานตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี

ในการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS ใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade) ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl, 99%, AR grade; RCI Labscan, Thailand), โซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate, NaOAc·3H₂O, ACS, ISO, Reag. Ph Eur grade; Scharlau, Spain), โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรรัส (Sodium sulphate anhydrous, Na₂SO₄, AnalaR®, reagent grade; BDH, UK) และเกลือไดโซเดียมของอีทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตตไตรไฮเดรต (EDTA·2Na·2H₂O, ACS, Reag. Ph Eur grade; Scharlau, Spain) สำหรับใช้เป็นสารช่วยแยกชั้น (salting-out agents) ส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่ อะซิโตนไทรล์

(Acetonitrile, ACN, AR grade; RCI Labscan, Thailand) และเมทานอล (Methanol, MeOH, ACS grade; Labsolv, Thailand) สำหรับการสกัดและการละลายซ้ำ (reconstitution) กรดไตรคลอโรอะซีติก (Trichloroacetic acid, TCA, pro analysis grade; Merck, Germany) และกรดฟอร์มิก (Formic acid, FA, LC-MS additive grade; Scharlau, Spain) ถูกใช้เพื่อการตกตะกอนโปรตีนและการเตรียม mobile phase ตามลำดับ สำหรับการทำความสะอาดตัวอย่างโดยใช้เทคนิค dispersive solid-phase extraction (d-SPE) ใช้ตัวดูดซับชนิด bulk sorbents ได้แก่ C18 (17% carbon load; Vertical Chromatography, Thailand), primary secondary amine (PSA; Vertical Chromatography, Thailand) และ graphitized carbon black (GCB; Vertical Chromatography, Thailand) โดยสารเคมีและตัวทำละลายทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์หรือเกรดสำหรับ LC-MS และนำมาใช้โดยตรงโดยไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม

สารมาตรฐาน

งานศึกษานี้ใช้สารมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ทั้งหมด 21 ชนิด ครอบคลุมหลายกลุ่มยา โดยกลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamides; SAs) ประกอบด้วย sulfadiazine (SDZ, $C_{10}H_{10}N_4O_2S$, 99.20 %, HPC Standards GmbH), sulfadimethoxine (SDM, $C_{12}H_{14}N_4O_4S$, 0.999 mg/mg, USP), sulfadoxine (SX, $C_{12}H_{14}N_4O_4S$, 99.07 %, HPC Standards GmbH), sulfamethazine (SMZ, $C_{12}H_{14}N_4O_2S$, 99.62 %, HPC Standards GmbH) และ sulfamethoxazole (SMX, $C_{10}H_{11}N_3O_3S$, purity 98 %, HPLC purity 99.88 %, TRC)

กลุ่มเตตราไซคลิน (Tetracyclines; TCs) ประกอบด้วย chlortetracycline hydrochloride (CTC, $C_{22}H_{24}Cl_2N_2O_8$, 93.32 %, HPC Standards GmbH), oxytetracycline dihydrate (OTC, $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$, 96.0 %, Dr. Ehrenstorfer) และ tetracycline hydrochloride (TC, $C_{22}H_{25}ClN_2O_8$, 98.42 %, HPC Standards GmbH)

กลุ่มฟลูออโรควิโนโลนและควิโนโลน (Fluoroquinolones and quinolones; FQs/Qs) ได้แก่ ciprofloxacin (CIP, $C_{17}H_{18}FN_3O_3$, 96 %, TRC), enrofloxacin (ENR, $C_{19}H_{22}FN_3O_3$, 99.60 %, HPC Standards GmbH), marbofloxacin (MAR, $C_{17}H_{19}FN_4O_4$, 99.99 %, HPC Standards GmbH), norfloxacin (NOR, $C_{16}H_{18}FN_3O_3$, 99.82 %, HPC Standards GmbH), orbifloxacin (ORB, $C_{19}H_{20}F_3N_3O_3$, 99.40 %, HPC Standards GmbH), flumequine (FLU, $C_{14}H_{12}FNO_3$, 99.28 %, Dr. Ehrenstorfer) และ nalidixic acid (NAL, $C_{12}H_{12}N_2O_3$, 99.5 %, CPAchem) สำหรับกลุ่มเบต้าแลคแทม (β -lactams) ได้แก่ cefradine (CER, $C_{16}H_{19}N_3O_4S$, 93.9 %, European Pharmacopoeia) และ cephalothin sodium (CET, $C_{16}H_{16}N_2NaO_6S_2$, 99.4 %, Sigma-Aldrich)

นอกจากนี้ ยังใช้สารมาตรฐานในกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ albendazole (ABZ, $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, 0.992 mg/mg, USP), lincomycin hydrochloride (LIN, $C_{18}H_{35}ClN_2O_6S$, 95.4 %, Ph. Eur. CRS), olaquinox (OLA, $C_{12}H_{13}N_3O_4$, 98.6 %, MP Biomedicals) และ trimethoprim (TMP, $C_{14}H_{18}N_4O_3$, 99.94 %, HPC Standards GmbH)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

การวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ดำเนินการด้วยเครื่อง LC-MS/MS รุ่น TSQ Quantis Plus เชื่อมต่อกับ Vanquish autosampler, pump และ column compartment (Thermo Scientific, USA) โดยใช้แก๊สไนโตรเจนจากเครื่องกำเนิดแก๊สรุ่น Genius XE (Peak Scientific, UK) สำหรับการ ionization การเตรียมตัวอย่างใช้เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนรุ่น Sorvall Lynx 4000 (Thermo Scientific, Germany) เครื่องเขย่ารุ่น SA300 (Yamato, Japan) และเครื่องระเหยไนโตรเจน ได้แก่ TurboVap LV (Zymark, USA), TurboVap LV (Caliper LifeScience, USA) และ XcelVap (Horizon Technology, USA) น้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านทานไฟฟ้า 18.2 M Ω ·cm (DI water) ได้จากระบบผลิตน้ำรุ่น GenPure Pro (Thermo Scientific Barnstead, Germany) การชั่งน้ำหนักใช้เครื่องชั่งเชิงวิเคราะห์รุ่น XP205 DeltaRange (Mettler Toledo, Switzerland) ที่มีความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม การแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีใช้คอลัมน์ Phenomenex Kinetex C18 ขนาด 100 × 2.1 mm, 1.7 μ m และ 150 × 3.0 mm, 2.6 μ m (USA) พร้อม guard cartridge ส่วนการสกัดสารใช้ solid-phase extraction (SPE) ได้แก่ Chromabond HLB (200 mg/6 mL, Macherey-Nagel, Germany), Oasis PRiME HLB (150 mg/3 cc, Waters, USA) และ VertiPak HCP Tubes (30 mg/3 mL, Vertical, Thailand)

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างน้ำมันโคดิบที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้รับมาจากศูนย์รวมน้ำมันที่ส่งตัวอย่างมาตรวจสอบคุณภาพที่สำคัญ ตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ โดยมีการสุ่มเก็บตัวอย่างเป็นประจำในแต่ละสัปดาห์ ประมาณ 3–8 ตัวอย่างต่อสัปดาห์ จากนั้นนำมาคัดเลือกตัวอย่างที่ไม่พบการปนเปื้อน โดยทุก pooled matrix หรือตัวอย่างใหม่ที่จะนำมาใช้ในการทดลองจะต้องผ่านการทดสอบยืนยันความเป็น blank โดยวิธี LC-MS/MS เพื่อยืนยันว่าไม่ตรวจพบสารเป้าหมาย จากนั้นตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกจึงถูกนำมาใช้สำหรับการพัฒนาและทดสอบวิธีตามขั้นตอนที่กำหนด

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธี (Method Development)

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ ได้ทำการรวบรวมและเปรียบเทียบค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด (MRL) ของยาสัตว์ในน้ำมันโคดิบจากแหล่งอ้างอิงต่าง ๆ ได้แก่ Codex Alimentarius Commission, กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย, สหภาพยุโรป (EU Reg 37/2010) (European Commission, 2010) และฐานข้อมูลของ US FDA ทั้งนี้ สำหรับสารตกค้างยาสัตว์ที่ไม่มีการกำหนด MRL อย่างเป็นทางการ ได้กำหนดค่าความเข้มข้นชั่วคราว (provisional concentration) เพื่อใช้เป็น Method Validation (MV) ตามตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดค่ามาตรฐานที่อ้างอิงและค่าที่นำมาใช้ในการทดสอบวิธี โดยข้อมูลดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวิธีก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด (MRL) ของยาสัตว์ในน้ำนมโคดิบตามมาตรฐานระหว่างประเทศ และประเทศไทย พร้อมค่าที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation)

Group	Drug Name	CODEX CXM 2-2024 (µg/L)	ประกาศกระทรวง สาธารณสุข ฉบับ ที่ 303 (µg/L)	EU Reg 37/2010 (µg/kg)	MV Concentration (µg/kg)
Benzimidazole	Albendazole	100	100	100	100*
Dihydrofolate	Trimethoprim	-	-	50	50*
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin	-	-	100	100*
	Enrofloxacin	-	-	100	100*
	Marbofloxacin	-	-	75	75*
	Norfloxacin	-	-	-	50**
	Orbifloxacin	-	-	-	100**
Lincosamide	Lincomycin	150	150	150	150*
Quinolone	Flumequine	-	-	50	50*
	Nalidixic acid	-	-	-	50**
Quinoxaline	Olaquinox	-	-	-	50**
Sulfonamide	Sulfadiazine	-	-	100	25**
	Sulfadimethoxine	-	-	100	25*
	Sulfadoxine	-	-	100	25**
	Sulfamethazine	25	25	100	25*
	Sulfamethoxazol	-	-	100	25**
Tetracycline	Chlortetracycline	100	100	100	100*
	Oxytetracycline	100	100	100	100*
	Tetracycline	100	100	100	100*
β-lactam	Cefradine	-	-	-	100**
(Cephalosporin, 1st gen)	Cephalothin	-	-	-	100**

* ค่า MRL ตามมาตรฐานสากล (เช่น Codex, EU, ประกาศกระทรวงสาธารณสุข) และเลือกค่าต่ำสุดมาใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

** สำหรับสารที่ไม่มีการกำหนด MRL ได้เลือกค่าขึ้นมาเพื่อใช้เป็นความเข้มข้นเป้าหมายในการทำ method validation โดยอ้างอิงแนวทางของ CIR (EU) 2021/808 และ European Union Reference Laboratories (2023) จากนั้นนำค่าดังกล่าวมาคูณด้วย 0.1 เพื่อกำหนดเป็น Screening Target Concentration (STC) สำหรับการพิสูจน์ความสามารถของวิธี (semi-quantitative) และใช้ในการคำนวณ CCβ

4.1 การกำหนดสภาวะ Mass Spectrometry (MS tuning)

ทำ mass tuning ของแต่ละสารโดยใช้สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่ติดตั้งแหล่งกำเนิดไอออนแบบ heated electrospray ionization (H-ESI) ในโหมด positive ion โดยกำหนดค่า mass spectrometer ได้แก่

spray voltage เท่ากับ 3,500 V สำหรับ positive ion และ 2500 V สำหรับ negative ion ค่า sheath gas, auxiliary gas และ sweep gas ตั้งไว้ที่ 40, 3 และ 1 (arbitrary units) ตามลำดับ อุณหภูมิของ ion transfer tube และ vaporizer ถูกตั้งไว้ที่ 325 °C และ 300 °C ตามลำดับ จากนั้นปรับแต่งพารามิเตอร์ mass spectrometer ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดโดยวิธี direct infusion เพื่อเลือก precursor ion และ product ions ที่ให้ความไวและความจำเพาะสูงสุด โดยกำหนดอย่างน้อย 2 product ions ต่อสาร ได้แก่ quantifier ion (ใช้ในการคำนวณปริมาณ) และ qualifier ion (ใช้เพื่อยืนยัน) เพื่อให้ได้ identification points ≥ 4 ตามเกณฑ์ CIR 2021/808 การตั้งค่า SRM (precursor/product m/z, collision energy, RF lens voltage, dwell time) ถูกบันทึกและสรุปไว้ในตารางที่ 2 transitions ของสารตกค้างยาสัตว์ 21 ชนิด ซึ่งใช้เป็นเงื่อนไขมาตรฐานตลอดการพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

4.2 การเปรียบเทียบและพัฒนาการสกัดตัวอย่าง

4.2.1 Solid-phase extraction (SPE)

การสกัดตัวอย่างดำเนินการตามวิธีที่ Alija *et al.* (2020) รายงานโดยมีการดัดแปลงบางขั้นตอนเพื่อให้เหมาะสมโดยนำตัวอย่างน้ำหนักโคดิบ 5 กรัม ใส่หลอด centrifuge ขนาด 50 mL เติม 20% TCA (w/v) ปริมาตร 2 mL จากนั้นเขย่า (vortex) เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม McIlvaine buffer 20 mL เขย่าเพิ่มอีก 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที นำ supernatant ที่ได้ผ่าน SPE แบบ hydrophilic-lipophilic balanced (HLB) ซึ่งทำ pre-condition ด้วย MeOH 3 mL และน้ำกลั่น 2 mL โดยมีการเปรียบเทียบ SPE จากหลายผู้ผลิต ได้แก่ Macherey-Nagel Chromabond HLB, Waters Oasis PRiME HLB และ Vertical VertiPak HCP หลังการ load ตัวอย่าง wash ด้วยน้ำกลั่น 4 mL และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นชะสารตกค้างด้วย MeOH รวม 6 mL (แบ่งเป็น 3 $\times$ 2 mL) ซึ่งต่างจากวิธีดั้งเดิมที่ใช้ 3 mL เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ recovery ทำ eluate ให้แห้งด้วยก๊าซ N₂ ที่อุณหภูมิ 35 °C แล้วละลายกลับด้วย mobile phase 1 mL (แทน 250 μ L ตามต้นฉบับ) ก่อนกรองผ่าน 0.22 μ m nylon membrane syringe filter และฉีดเข้าสู่เครื่อง LC-MS/MS ประสิทธิภาพของวิธีได้รับการประเมินโดยการตรวจสอบ %recovery ที่ระดับความเข้มข้น 1 MRL และความเป็นเชิงเส้นของ calibration curve ในตัวอย่างนม (matrix-matched calibration curves)

4.2.2 QuEChERS extraction

สำหรับการสกัดและประเมิน %recovery ของสารตกค้างยาสัตว์ในน้ำนมดิบที่ระดับความเข้มข้น 1 MRL ใช้วิธี QuEChERS โดยนำน้ำนมดิบ 5 กรัม เติมสารละลาย EDTA 0.1 M ปริมาตร 10 mL เขย่า 1 นาที ตามด้วยการเติม ACN ที่ปรับสภาวะเป็นกรดด้วย 3.35% FA (v/v) ปริมาตร 10 mL เขย่าอีก 1 นาที และนำไปอัลตราโซนิกเป็นเวลา 20 นาที ขั้นตอนนี้สอดคล้องกับรายงานของ Koloka *et al.* (2023) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติม EDTA สามารถช่วย

ป้องกันการ chelate กับไอออนโลหะและเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ขณะเดียวกันการปรับค่า pH ด้วย FA ช่วยเสริมผล salt-out และทำให้สารละลายมีความเสถียรมากขึ้น หลังจากนั้นเติมเกลือสำหรับ salt-out ได้แก่ Na_2SO_4 4 g, NaCl 1.2 g และ NaOAc 0.7 g เขย่า 1 นาที และ centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วเก็บชั้นใส (ACN phase) 5 mL มาทำความสะอาด (clean-up) ด้วย dispersive SPE (dSPE) โดยใช้ sorbents ทั้งในรูปแบบเดี่ยว (MgSO_4 , PSA, C18, GCB และ NaOAc อย่างละ 50 mg) และแบบผสม (MgSO_4 50 mg + PSA 50 mg + C18 50 mg) จากนั้นทำให้ระเหยสารสกัดแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C และละลายใหม่ด้วย 0.1% FA ในน้ำ/0.1% FA ใน ACN (98/2, v/v) ปริมาตร 500 μL ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ประสิทธิภาพของวิธีได้รับการประเมินโดยการตรวจสอบ %recovery ที่ระดับความเข้มข้น 1 MRL และความเป็นเชิงเส้นของ calibration curve ในตัวอย่างนม (matrix-matched calibration curves)

4.3 การปรับแต่งสภาวะโครมาโทกราฟีและการสกัด

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวิธี ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

- เปรียบเทียบคอลัมน์ C18 (Phenomenex Kinetex) ระหว่าง 100x2.1 mm, 1.7 μm และ 150x3.0 mm, 2.6 μm และใช้ guard column ที่มีชนิดของ packing เช่นเดียวกับ analytical column
- ประเมินผลของ initial %B (ACN + 0.1% FA) ที่ 2, 5, 10, 15 และ 20% ต่อ retention และ peak shape
- กำหนดโปรแกรม gradient elution โดยเลือกใช้ initial %B ที่เหมาะสม และเพิ่มสัดส่วน B ตามเวลาที่กำหนด

4.4 การประเมินผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect) จาก calibration curve

ในการประเมินผลกระทบของ matrix ทำโดยเตรียม calibration curve จำนวน 3 แบบ คือ (1) standard solution calibration curve ที่เตรียมจากสารมาตรฐานใน mobile phase, (2) matrix-matched calibration curve ที่ได้จากการเติมสารมาตรฐานลงในสารสกัดของ matrix ปลอดสาร (spiked after extraction), และ (3) matrix-fortified calibration curve ได้จากการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix ก่อนการสกัด (spiked before extraction) แต่ละชุดเตรียมทั้งหมด 5 calibration curve โดยแต่ละแบบถูกสร้างขึ้นในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมระดับต่ำกว่าและสูงกว่า MRL ของสารเป้าหมายอย่างน้อย 7 ระดับในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน อ้างอิงตาม Matuszewski *et al.* (2003)

ผลที่ได้ถูกนำมาคำนวณค่า matrix effect (ME), %recovery (RE) และ process efficiency (PE) ตามสมการดังนี้ $\text{ME} (\%) = (B/A) \times 100$; $\text{RE} (\%) = (C/B) \times 100$; $\text{PE} (\%) = (C/A) \times 100$

โดยที่ A คือค่าพื้นที่พีคจาก standard solution, B คือค่าพื้นที่พีคจาก matrix-matched curve (post-extraction spike) และ C คือค่าพื้นที่พีคจาก matrix-fortified curve (pre-extraction spike) ทั้งนี้ ME ใช้ประเมินการกดสัญญาณ (suppression) หรือการเสริมสัญญาณของ matrix (enhancement), RE แสดงถึง %recovery ของกระบวนการสกัด และ PE แสดงประสิทธิภาพโดยรวมของกระบวนการทั้งหมด

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ได้ดำเนินการตามหลักเกณฑ์ของ EU CIR 2021/808 สำหรับวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ โดยมีการประเมินพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

5.1 Selectivity/Specificity: วิเคราะห์ blank milk samples จาก ≥ 20 แหล่ง เพื่อยืนยันว่าไม่มีสัญญาณรบกวนที่ RT หรือ transitions ของสารเป้าหมาย

5.2 Linearity: ประเมิน linearity ของ calibration curve ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0 – 3.0 MRL อย่างน้อย 6 จุดรวม blank sample โดยใช้ linear regression และตรวจสอบค่า coefficient of determination (R^2)

5.3 Trueness (Recovery): ทดสอบด้วย fortified milk samples ที่ 0.1-0.5x, 1.0x และ 1.5xMRL โดยทำซ้ำอย่างน้อย 6 ครั้งต่อระดับใน ≥ 3 วัน

5.4 Precision (Repeatability and Reproducibility): ประเมินจากค่าความแปรปรวนภายในวันและระหว่างวัน (expressed as %CV) ตามเกณฑ์ CIR 2021/808

5.5 Decision limit ($CC\alpha$): สารที่มีการกำหนด MRL ทำการคำนวณค่า $CC\alpha$ โดยใช้ผลการทดสอบ fortified samples ที่ระดับ MRL เพื่อหา within laboratory reproducibility (SDwR) จากนั้นคำนวณตามสมการ $CC\alpha = MRL + 1.64 \times SDwR$

5.6 Detection capability for screening ($CC\beta$): สำหรับสารที่ไม่มีการกำหนด MRL กำหนดค่า STC (เช่น $0.1 \times$ ค่าที่เลือกมา) และเตรียม blank samples อย่างน้อย 20 ตัวอย่าง พร้อม spiked samples อย่างน้อย 20 ตัวอย่างที่ STC จากนั้นทำการประเมินผลด้วย calibration curve หากพบ false negative $\leq 5\%$ จะถือว่า STC นั้นใช้ได้ และคำนวณ $CC\beta$ ตามสมการ $CC\beta = STC + 1.64 \times SDwR$

5.7 ประเมินความทนทานของวิธี (robustness)

การประเมิน robustness ทดสอบโดยปรับเปลี่ยนปัจจัยสำคัญของขั้นตอนการสกัดจากค่าสภาวะมาตรฐาน ไปยังค่าที่สูงหรือต่ำกว่า ($\pm$) ได้แก่ ความเข้มข้นและปริมาตรของ TCA ปริมาตรของ McIlvaine buffer ระยะเวลาในการเขย่า ระยะเวลาและความเร็วในการ centrifuge และปริมาตรการชะสาร (elution volume) ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปัจจัยและช่วงค่าที่ใช้ในการประเมินความทนทาน (robustness) ของวิธีการสกัด

Factor	Parameter	Nominal	Low value (-)	High value (+)
A	TCA concentration (%)	20	15	25
B	Volume of TCA added (mL)	2	1	3
C	Volume of McIlvaine buffer (mL)	20	15	25
D	Shaking time (min)	15	10	20
E	Centrifugation time (min)	20	15	25
F	Centrifugation speed (rpm)	4,000	3,000	5,000
G	Elution volume (mL, MeOH)	3×2	2×2	4×2

Youden's Ruggedness Design

การทดสอบความทนทานของวิธีตามแบบ Youden's ruggedness test ได้ทำการออกแบบการทดลอง โดยใช้ปัจจัยทั้งหมด 7 ปัจจัย (A–G) ตามที่ระบุไว้ในตาราง robustness ก่อนหน้านี้ และจัดให้มีการทดสอบทั้งหมด 8 treatments (ตารางที่ 3) เพื่อประเมินผลกระทบของปัจจัยหลายตัวพร้อมกัน

ตารางที่ 3 การจัดการทดลองแบบแฟกทอเรียลสำหรับการทดสอบความทนทานของวิธีตามแบบ Youden's

Factors	Treatment							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	A	A	A	A	a	a	a	a
2	B	B	b	b	B	B	b	b
3	C	c	C	c	C	c	C	c
4	D	D	d	d	d	d	D	D
5	E	e	E	e	e	e	E	E
6	F	f	f	F	F	f	f	F
7	G	g	G	G	g	G	G	g
Result	s	t	u	v	w	x	y	z

หมายเหตุ: ตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่แสดงถึงค่าระดับสูงของปัจจัย ส่วนตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กแสดงถึงค่าระดับต่ำ ผลลัพธ์ (s–z) หมายถึงค่าที่ได้จากการทดสอบภายใต้แต่ละการจัดการ (treatment) ของแฟกทอเรียล

สูตรการคำนวณ (Calculation)

สำหรับแต่ละปัจจัย (เช่น A, B, ..., G) ค่าผลกระทบ (Effect) ของปัจจัยนั้นคำนวณได้จากสมการ:

Effect of Factor X = (Mean of results at high level – Mean of results at low level) โดยที่:

- Mean of results at high level = ค่าเฉลี่ยของผลลัพธ์ทั้งหมดที่ปัจจัยนั้นอยู่ในระดับสูง (ตัวพิมพ์ใหญ่)
- Mean of results at low level = ค่าเฉลี่ยของผลลัพธ์ทั้งหมดที่ปัจจัยนั้นอยู่ในระดับต่ำ (ตัวพิมพ์เล็ก)
- ในการออกแบบ 8 treatments จะมีผลลัพธ์ที่แต่ละปัจจัยอยู่ในระดับละ 4 ครั้ง

ตัวอย่างการคำนวณ (Example)

เช่น ปัจจัย A อยู่ในระดับสูง (A) ใน Treatment 1–4 และระดับต่ำ (a) ใน Treatment 5–8 โดยมีผลลัพธ์จากการทดลองคือ s, t, u, v และ w, x, y, z ตามลำดับ ดังนั้น Effect of A = $(s + t + u + v)/4 - (w + x + y + z)/4$

การแปลผล (Interpretation)

เปรียบเทียบค่าความแตกต่าง (A–a, B–b, ..., G–g) กับค่า $\sqrt{2} \times sd$ โดยที่ sd คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของผลการทดลองทั้งหมด (s–z)

- ถ้า $|X - x| > \sqrt{2} \times sd$ หมายถึงปัจจัย X มีผลต่อความทนทานของวิธี (การเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

- ถ้า $|X - x| \leq \sqrt{2} \times sd$ หมายถึงปัจจัย X ไม่มีผลต่อความทนทานของวิธี (การเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญ)

6. การทดสอบตัวอย่างจริงด้วยวิธีที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

สำหรับการประเมินการประยุกต์ใช้วิธีในตัวอย่างจริง ได้ทำการวิเคราะห์นํ้ามันโคดิบจำนวน 30 ตัวอย่างที่เก็บจากศูนย์รวบรวมนํ้ามันโดยเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้ใช้ในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี มาวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS ที่พัฒนาขึ้นและผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยแปลผลทดสอบอ้างอิงตามเกณฑ์ของวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ (quantitative confirmatory method) โดยใช้ค่าตัดสิน $CC\alpha$ และ $CC\beta$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาการกำหนดสภาวะ Mass Spectrometry (MS tuning) ได้ทำ mass tuning ของแต่ละสารให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ความไวและความจำเพาะสูงสุดในโหมด positive electrospray ionization (+ESI) ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งสรุปพารามิเตอร์ที่ปรับแล้ว ได้แก่ ค่า precursor ion และ product ion พลังงาน collision energy (V) ค่า RF lens (V) และ dwell time (ms) โดยสารแต่ละชนิดจะแตกตัวให้ product ion อย่างน้อย 2 ค่า เพื่อให้การยืนยันผลมีความน่าเชื่อถือ สอดคล้องกับแนวทาง CIR 2021/808 ทั้งนี้ การกำหนดเวลา dwell time ที่คงที่ระหว่างสารทุกชนิด ช่วยให้ข้อมูลการวิเคราะห์ที่สมดุลโดยไม่กระทบต่อความไวของการตรวจวัด

ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ MS/MS ที่ปรับเหมาะสมสำหรับการตรวจสารตกค้างยาสัตว์ในโหมด +ESI

Compounds	Quantification transition*	Confirmation transition*	Retention time (min)	RF Lens (V)	Dwell Time (ms)
Albendazole	266.00 > 233.88 (40.73)	266.00 > 190.80 (33.93)	7.54	201	2.754
Cefradine	350.05 > 175.90 (13.31)	350.05 > 157.90 (9.58)	4.58	133	2.754
Cephalothrin	418.97 > 358.90 (12.73)	418.97 > 314.90 (14.88)	7.22	177	2.754
Chlortetracycline	479.30 > 462.05 (18.1)	479.30 > 444.09 (21.68)	5.96	202	2.754
Ciprofloxacin	332.13 > 288.00 (18.1)	332.13 > 314.00 (20.83)	4.65	189	2.754
Enrofloxacin	360.13 > 316.00 (19.68)	360.13 > 342.00 (21.61)	5.19	201	2.754
Flumequine	261.97 > 243.97 (20.47)	261.97 > 201.88 (33.72)	8.38	133	2.754
Lincomycin	407.00 > 126.00 (29.56)	407.00 > 359.13 (17.82)	4.28	192	2.754
Marbofloxacin	363.19 > 71.97 (25.77)	363.19 > 320.05 (15.81)	4.71	201	2.754
Nalidixic acid	233.09 > 214.97 (14.67)	233.09 > 187.06 (26.2)	8.19	119	2.754
Norfloxacin	320.13 > 302.00 (20.61)	320.13 > 230.90 (40.88)	4.89	179	2.754

ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ MS/MS ที่ปรับเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบสารตกค้างยาสัตว์ในโหมด positive +ESI (ต่อ)

Compounds	Quantification transition*	Confirmation transition*	Retention time (min)	RF Lens (V)	Dwell Time (ms)
Olaquinox	264.06 > 142.90 (32.71)	264.06 > 221.05 (21.61)	3.68	159	2.754
Orbifloxacin	396.13 > 352.00 (18.1)	396.13 > 294.90 (24.55)	5.26	209	2.754
Oxytetracycline	461.30 > 426.00 (19.75)	461.30 > 444.05 (17.17)	5.01	207	2.754
Sulfadiazine	251.05 > 155.80 (15.6)	251.05 > 91.90 (26.98)	4.61	145	2.754
Sulfadimethoxine	310.97 > 155.97 (22.83)	310.97 > 91.97 (34.65)	7.43	149	2.754
Sulfadoxine	311.05 > 155.90 (19.75)	311.05 > 107.90 (27.34)	6.58	164	2.754
Sulfamethazine	279.05 > 185.90 (17.75)	279.05 > 123.90 (25.41)	5.49	171	2.754
Sulfamethoxazole	254.05 > 155.80 (16.31)	254.05 > 91.90 (27.7)	6.77	156	2.754
Tetracycline	445.00 > 427.05 (13.74)	445.00 > 410.05 (20.25)	5.18	202	2.754
Trimethoprim	291.14 > 230.00 (24.41)	291.14 > 261.00 (26.05)	4.67	212	2.754

* Collision energy (eV) อยู่ในช่วง 1-5

2. ผลการศึกษาการเปรียบเทียบและพัฒนากลยุทธ์การสกัดตัวอย่างโดยใช้ SPE และ QuEChERS

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบ %recovery ของสารตกค้างยาสัตว์ 21 ชนิดในน้ำนมโคดิบที่ความเข้มข้น 1 MRL โดยการสกัดด้วย SPE และ QuEChERS protocols

Compounds	% recovery							
	Chromabond HLB		Polymeric		Oasis Prime		QuEChERS (mix)	QuEChERS (C18)
	A	B	A	B	A	B	A	A
Albendazole	3.3	n.a.	8.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Cefradine	60.8	61.0	49.2	42.5	30.1	n.a.	n.a.	n.a.
Cephalothrin	130.8	179.0	108.0	391.5	29.0	n.a.	115.6	n.a.
Chlortetracycline	284.0	264.9	135.9	43.0	198.0	24.9	n.a.	21.7
Ciprofloxacin	148.1	142.8	152.4	57.9	82.2	18.8	30.9	n.a.
Enrofloxacin	158.3	150.0	156.1	72.2	98.1	24.6	61.2	43.7
Flumequine	151.4	119.5	154.8	85.0	74.9	13.7	91.8	46.6
Lincomycin	65.5	67.5	56.9	52.2	27.5	n.a.	n.a.	n.a.
Marbofloxacin	138.6	134.4	132.5	86.7	76.5	18.4	35.7	31.3
Nalidixic acid	127.0	121.0	136.5	95.1	92.0	9.3	67.7	40.1
Norfloxacin	216.7	226.2	231.8	74.8	113.6	14.6	30.1	31.3
Olaquinox	19.5	18.0	6.0	2.8	9.8	n.a.	n.a.	n.a.
Orbifloxacin	62.9	57.5	64.8	32.4	32.4	n.a.	33.5	14.1

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบ %recovery ของสารตกค้างยาสัตว์ 21 ชนิดในน้ำนมโคดิบที่ความเข้มข้น 1 MRL โดย การสกัดด้วย SPE และ QuEChERS protocols (ต่อ)

Compounds	% recovery							
	Chromabond HLB		Polymeric		Oasis Prime		QuEChERS (mix)	QuEChERS (C18)
	A	B	A	B	A	B	A	A
Oxytetracycline	146.9	144.8	127.8	82.6	94.7	18.6	18.2	14.8
Penicillin G	85.5	61.2	84.5	70.8	20.6	n.a.	n.a.	n.a.
Sulfadiazine	33.4	31.2	53.4	44.3	15.0	n.a.	n.a.	5.6
Sulfadimethoxin	66.0	17.2	19.1	4.3	n.a.	n.a.	n.a.	3.0
Sulfadoxine	58.2	48.8	85.9	68.5	32.5	n.a.	n.a.	11.6
Sulfamethazine	66.0	57.9	81.5	57.9	30.4	n.a.	n.a.	n.a.
Sulfamethoxazol	40.6	36.8	67.7	54.3	16.4	n.a.	n.a.	21.7
Tetracycline	143.6	139.6	325.0	128.8	158.1	12.4	23.7	18.1

หมายเหตุ: ค่าที่ไม่สามารถคำนวณ %recovery ได้ถูกระบุเป็น “n.a.” เนื่องจากสัญญาณต่ำกว่าความเข้มข้นมาตรฐานต่ำสุดของ calibration curve ทั้งนี้ sorbents เดี่ยวบางชนิด (เช่น PSA, GCB, MgSO₄ และ NaOAc) ไม่สามารถให้ค่า %recovery สำหรับสาร ส่วนใหญ่ จึงไม่แสดงผลในตาราง

จากตารางที่ 5 การเปรียบเทียบสมรรถนะการสกัดที่ความเข้มข้น 1MRL พบว่า SPE ทั้งสามชนิด ได้แก่ Chromabond HLB, Polymeric SPE และ Oasis PRiME HLB ให้ค่า %recovery ที่สามารถตรวจวัดได้ในหลายกลุ่ม สาร โดยเฉพาะ Chromabond HLB และ PRiME HLB ที่มีค่า %recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้สำหรับสารส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามการใช้ QuEChERS protocols ทั้งในรูปแบบ sorbent เดี่ยวและแบบผสม พบว่ามีหลายสารที่ไม่สามารถอ่านค่าได้ (n.a.) เนื่องจากสัญญาณต่ำกว่าความเข้มข้นมาตรฐานต่ำสุดของ calibration curve ซึ่งสะท้อนถึง ประสิทธิภาพ %recovery ที่ต่ำและผลของ matrix effect ที่รุนแรง

ผลการศึกษาเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่า SPE sorbents โดยเฉพาะ HLB และ PRiME HLB มีศักยภาพในการใช้ พัฒนาวิธีสำหรับ multi-class drug residues ในน้ำนมโคดิบ เนื่องจากให้ %recovery ที่สม่ำเสมอมากกว่า QuEChERS แม้ QuEChERS จะมีข้อดีด้านความง่ายและใช้ตัวอย่างน้อย แต่การที่หลาย analyte ให้ผลต่ำกว่าระดับ การตรวจวัด ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้สำหรับการพัฒนา confirmatory method ได้โดยตรง ข้อสังเกตอีกประการคือ ในการศึกษา SPE ได้ทำซ้ำแบบ duplicate ขณะที่ QuEChERS ทำเพียง single preparation แม้ผลจะไม่สมบูรณ์ แต่แนวโน้มที่เห็นชี้ว่า SPE ทั้งสามชนิดสามารถนำไปใช้ในการศึกษา linearity ของ matrix-fortified calibration curve ได้ต่อไปตามแนวทาง CIR 2021/808 เพื่อยืนยันความเหมาะสมของ calibration model และลดผลกระทบ จาก matrix effect ในขั้นตอนการ validate

ต่อมาได้สร้าง calibration curve ขึ้นจากสารมาตรฐาน 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 MRL ตามข้อกำหนดของ CIR 2021/808 สำหรับวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ (quantitative

confirmatory method) โดยในกรณีนี้ที่ค่าความถูกต้อง (trueness) และความเที่ยง (precision) ที่ 0.1 MRL ไม่ผ่านเกณฑ์ สามารถใช้ชุดความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 MRL แทนได้ สำหรับงานศึกษานี้ ได้ทำการประเมินค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ที่ระดับ 0.1 และ 0.5 MRL สำหรับ Chromabond HLB โดยไม่ได้ศึกษาที่ระดับความเข้มข้นกึ่งกลาง (0.2, 0.3, 0.4 MRL) เพื่อหลีกเลี่ยงความซับซ้อนและความไม่แน่นอนในการ fortified สารหลายชนิดพร้อมกัน

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของ calibration curve ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างด้วย SPE ชนิดต่าง ๆ ในแบบ matrix-fortified และ matrix-matched

Compounds	Coefficient of determination (R^2)					
	Chromabond HLB Matched	Chromabond HLB Matched	Chromabond HLB Fortified	Chromabond HLB Fortified	Polymeric Fortified	Oasis Prime Fortified
	0.1MRL*	0.5MRL**	0.1MRL*	0.5MRL**	0.1MRL*	0.1MRL*
Albendazole	0.9974	0.9972	0.9986	0.9984	0.9720	0.6005
Cefradine	0.9998	0.9996	0.9988	0.9988	0.9962	0.4822
Cephalothrin	0.8763	0.9231	0.9324	0.9097	0.7329	0.0035
Chlortetracycline	0.9968	0.9964	0.9966	0.9958	0.9803	0.5558
Ciprofloxacin	0.9998	0.9998	0.9982	0.9980	0.9866	0.4193
Enrofloxacin	0.9984	0.9984	0.9980	0.9978	0.9862	0.4323
Flumequine	0.9958	0.9956	0.9964	0.9958	0.9958	0.5858
Lincomycin	0.9982	0.9980	0.9988	0.9986	0.9864	0.5149
Marbofloxacin	0.9998	0.9998	0.9994	0.9994	0.9938	0.4060
Nalidixic acid	0.9974	0.9972	0.9942	0.9934	0.9970	0.5610
Norfloxacin	0.9978	0.9976	0.9980	0.9976	0.9849	0.3317
Olaquinox	0.9988	0.9988	0.9986	0.9980	0.9393	0.5472
Orbifloxacin	0.9990	0.9990	0.9994	0.9992	0.9868	0.4313
Oxytetracycline	0.9990	0.9990	0.9984	0.9986	0.9918	0.5021
Sulfadiazine	0.9920	0.9910	0.9994	0.9994	0.9928	0.4501
Sulfadimethoxine	0.9980	0.9978	0.9940	0.9926	0.9872	0.4958
Sulfadoxine	0.9974	0.9968	0.9982	0.9980	0.9855	0.4456
Sulfamethazine	0.9954	0.9942	0.9968	0.9962	0.9890	0.4570
Sulfamethoxazole	0.9968	0.9958	0.9988	0.9986	0.9910	0.3668
Tetracycline	0.9986	0.9986	0.9956	0.9954	0.9417	0.5253
Trimetoprim	0.9972	0.9970	0.9978	0.9974	0.9868	0.3825

หมายเหตุ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) จากการประเมิน calibration curve 7 ระดับ *(0, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0MRL)

** (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0MRL)

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของ calibration curve ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างด้วย SPE ชนิดต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 6 โดย Chromabond HLB ได้รับการประเมินทั้งในรูปแบบ matrix-fortified และ matrix-matched ขณะที่ Polymeric และ Oasis Prime SPE ศึกษาในรูปแบบ matrix-fortified เท่านั้น การสร้างกราฟสอบเทียบเป็นไปตามข้อกำหนดของ CIR 2021/808 สำหรับวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ โดยใช้สารมาตรฐาน 7 ระดับความเข้มข้น (0, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 MRL) ในกรณีที่ความถูกต้อง (trueness) และความเที่ยง (precision) ที่ 0.1 MRL ไม่ผ่านเกณฑ์ ได้ใช้การสร้างกราฟสอบเทียบโดยเริ่มจาก 0.5 MRL แทน โดยรวมพบว่าสารส่วนใหญ่มีความเป็นเชิงเส้นที่ดีมาก ($R^2 > 0.99$) ยืนยันความเหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างด้วย SPE ที่พัฒนาแล้วสำหรับการวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ

3. การปรับแต่งสภาวะโครมาโทกราฟี และการสกัด

3.1 ภายหลังการปรับสภาวะการเตรียมตัวอย่าง ได้เลือกใช้ Chromabond HLB เป็น SPE สำหรับการประเมินสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ (quantitative confirmatory method) ตามแนวทางของ CIR 2021/808 โดยได้ศึกษาปัจจัยเพิ่มเติมที่อาจมีผลต่อคุณภาพการวิเคราะห์ ได้แก่ ขนาดของคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยเปรียบเทียบคอลัมน์ C18 (Phenomenex Kinetex) ระหว่าง (1) 100×2.1 mm, 1.7 μ m และ (2) 150×3.0 mm, 2.6 μ m และใช้ guard column ที่มีชนิดของ packing เช่นเดียวกับ analytical column การประเมินเน้นตรวจสอบค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N) ของสารแต่ละชนิดที่ระดับ 1 MRL และลักษณะของ peak ที่ได้จากคอลัมน์ทั้งสองชนิด

การเปรียบเทียบค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N) ที่ระดับ 1 MRL ระหว่างคอลัมน์ C18 สองชนิด (100 × 2.1 mm, 1.7 μ m และ 150 × 3.0 mm, 2.6 μ m) พบว่ามีความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ระหว่างสารแต่ละชนิด (ตารางที่ 7) โดยทั่วไป คอลัมน์ 2.6 μ m ให้ค่า S/N สูงกว่าสำหรับหลายสาร เช่น cefradine (547 เทียบกับ 82), sulfadimethoxine (150 เทียบกับ 5), sulfadoxine (145 เทียบกับ 4) และ trimethoprim (926 เทียบกับ 129) แสดงให้เห็นถึงความไวที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในสารที่คอลัมน์ 1.7 μ m ให้สัญญาณค่อนข้างต่ำ

อย่างไรก็ตาม พบว่าสารบางชนิดให้ผลดีกว่าหรือใกล้เคียงเมื่อใช้คอลัมน์ 1.7 μ m เช่น cephalothrin (104 เทียบกับ 21), olaquinox (118 เทียบกับ 68) และ marbofloxacin (46 เทียบกับ 42) ขณะที่สารบางชนิดให้ค่า S/N ใกล้เคียงกันทั้งสองคอลัมน์ (เช่น norfloxacin, tetracycline)

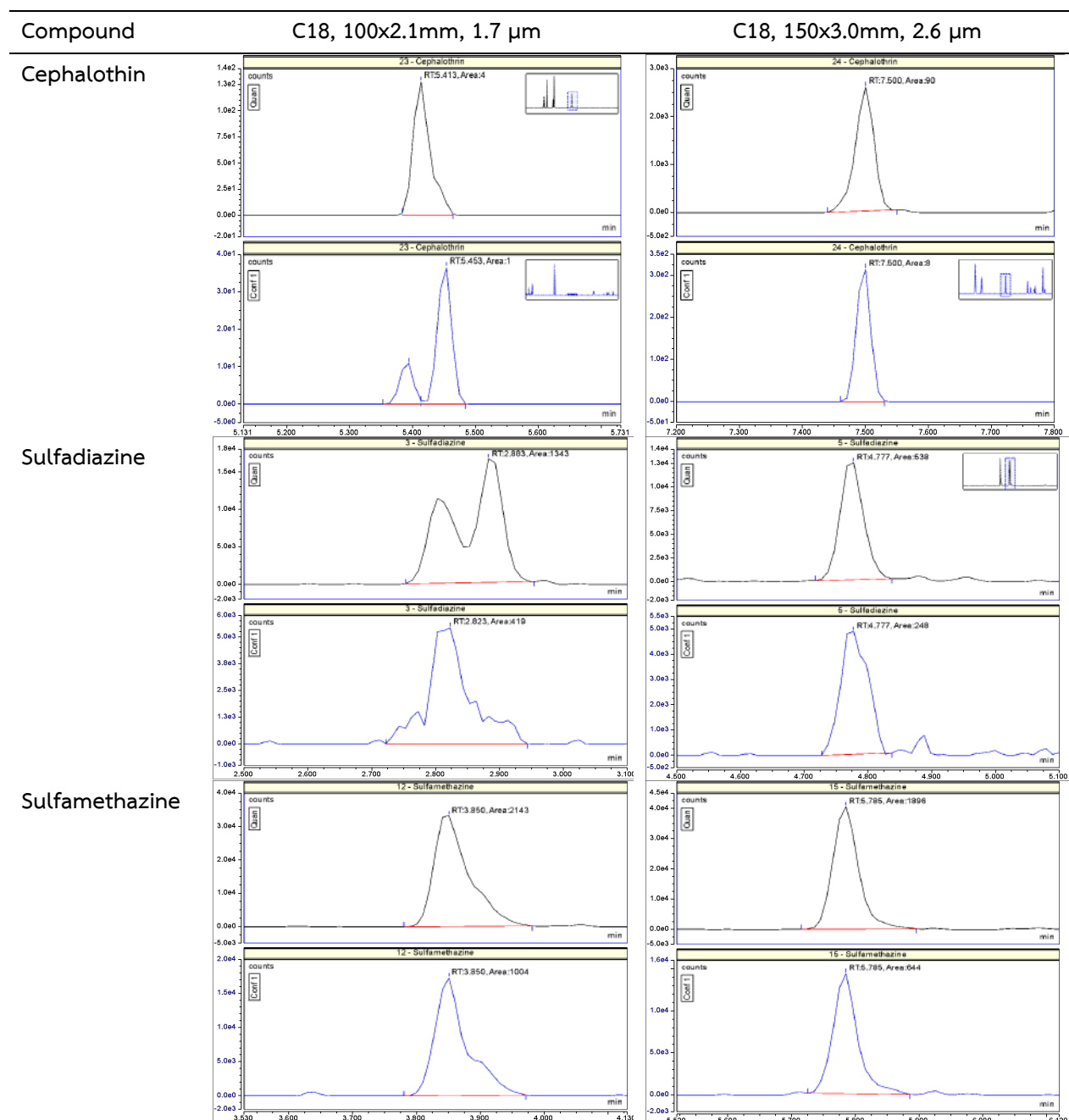
เมื่อพิจารณาโดยรวม แม้จะมีความแตกต่างบางส่วนตามลักษณะเฉพาะของสาร แต่คอลัมน์ 2.6 μ m มีแนวโน้มให้ค่า S/N ที่สูงกว่าและมีเสถียรภาพมากกว่าในสารส่วนใหญ่ จึงถือว่าคอลัมน์ Phenomenex Kinetex C18 (150 × 3.0 mm, 2.6 μ m) เหมาะสมกว่าสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณในขั้นต่อไป เนื่องจากให้ความไวและความเชื่อถือได้ที่ดีกว่า

ตารางที่ 7 Signal-to-noise (S/N) ratios ของสารทั้ง 21 ชนิด ที่ 1MRL จากการใช้ LC column 2 ขนาด (Phenomenex Kinetex C18, 100 × 2.1 mm, 1.7 µm และ 150 × 3.0 mm, 2.6 µm)

Compound	S/N (1.7 µm, 100 × 2.1 mm)	S/N (2.6 µm, 150 × 3.0 mm)
Albendazole	122	234
Cefradine	82	547
Cephalothrin	104	21
Ciprofloxacin	40	92
Chlortetracycline	7	4
Enrofloxacin	56	104
Flumequine	26	57
Lincomycin	103	122
Marbofloxacin	46	42
Nalidixic acid	47	104
Norfloxacin	38	38
Olaquinox	118	68
Orbifloxacin	117	158
Oxytetracycline	69	94
Sulfadiazine	60	45
Sulfadimethoxine	5	150
Sulfadoxine	4	145
Sulfamethazine	119	173
Sulfamethoxazole	21	40
Tetracycline	19	17
Trimethoprim	129	926

นอกจากการประเมินเชิงปริมาณโดยใช้ค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนแล้ว ยังได้พิจารณาสมรรถนะเชิงคุณภาพของคอลัมน์จากลักษณะของ peak อีกด้วย โดยได้คัดเลือกสารตัวอย่างบางชนิดที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างคอลัมน์ทั้งสอง เพื่อแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบ peak การพิจารณาใช้การสังเกตด้วยสายตาในด้านความสมมาตร ความแหลมคม และการแยกตัวของ peak ซึ่งให้ข้อมูลเชิงลึกเพิ่มเติมในการตัดสินใจเลือกคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบลักษณะ peak ของสารบางชนิดที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสองชนิด (Phenomenex Kinetex C18, 100 × 2.1 mm, 1.7 μ m และ 150 × 3.0 mm, 2.6 μ m)



โครมาโทแกรมของ cephalothin, sulfadiazine และ sulfamethazine ที่แสดงในตารางที่ 8 ใช้เพื่อเปรียบเทียบผลของขนาดคอลัมน์ต่อคุณภาพของ peak พบว่า cephalothin ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ 2.6 μ m ให้ peak ที่คมและสมมาตรมากกว่า เมื่อเทียบกับคอลัมน์ 1.7 μ m ที่ให้ peak กว้างกว่า มีลักษณะเป็น split peak ในทำนองเดียวกัน sulfadiazine แสดงลักษณะ split peak และมี tailing อย่างชัดเจนเมื่อใช้คอลัมน์ 1.7 μ m แต่คอลัมน์ 2.6 μ m ให้ peak ที่ชัดเจนและมีคุณภาพดีกว่า ส่วน sulfamethazine แม้ว่าทั้งสองคอลัมน์จะให้ peak

ตรวจพบได้ แต่คอลัมน์ 2.6 μm ให้ peak ที่กระชับและสมมาตรมากกว่า จึงเลือกคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิด C18, 150 $\times$ 3.0 mm, 2.6 μm เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

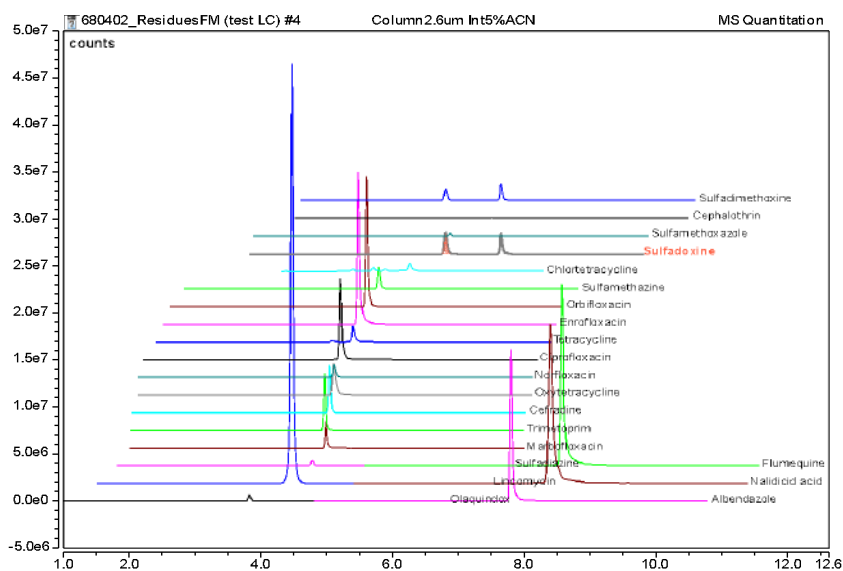
ตารางที่ 9 สรุปผลเปรียบเทียบการ run sample โดยใช้ Initial %B ที่ 2, 5, 10, 15 และ 20% กับคอลัมน์โครมาโทกราฟี C18, 150 $\times$ 3.0 mm, 2.6 μm

Initial %B	Retention time	S/N	Asymmetry	Theoretical plates	ข้อสังเกต
2%	ยาวที่สุด (5–8 นาทีขึ้นไป)	หลายสารต่ำ บางสารสูง (Sulfadimethoxine, Trimethoprim ดีมาก)	ค่อนข้างสมมาตร (1.1–1.4) แต่บางตัว >1.5	สูงที่สุด (>100,000 หลายสาร)	Resolution ดี แต่ run time นาน
5%	สั้นลง (4.5–7.5 นาที)	หลายสารมี S/N ดีขึ้น (Cefradine, Norfloxacin, Orbifloxacin)	ส่วนใหญ่สมมาตรดี (1.1–1.4)	Plates ลดลงบางส่วน (70,000–110,000)	สมดุลระหว่างเวลาและคุณภาพ peak
10%	4–6 นาที	S/N ดีในบางสาร (Enrofloxacin, Oxytetracycline, Sulfamethoxazole) แต่บางสารต่ำ	Asymmetry บางตัว >1.5	Plates ลดลงต่อเนื่อง	Retention สั้น เหมาะบาง analyte แต่ไม่ทุกตัว
15%	3–5 นาที	หลายสาร S/N สูง (Cefradine, Sulfadiazine) แต่มี asymmetry ผิดปกติ	Peak shape บางตัวบิดเบี้ยว (Asym. >1.5)	Plates ต่ำ (<50,000 หลายสาร)	เร็ว แต่เสีย resolution ไป
20%	สั้นที่สุด (2–4 นาที)	S/N สูงมากในบางสาร (Trimethoprim, Olaquinox) แต่ไม่สม่ำเสมอ	Asymmetry ไม่คงที่	Plates ต่ำมาก (10,000–40,000)	Run time เร็วสุด แต่เสีย efficiency

การศึกษาผลขององค์ประกอบตัวทำละลายเริ่มต้น (%B, ACN ผสม 0.1% FA) ต่อสมรรถนะของคอลัมน์ C18 (2.6 μm) ตามตารางที่ 9 พบว่าการเพิ่มสัดส่วน %B ส่งผลโดยตรงต่อเวลา retention, ค่า S/N, ลักษณะ peak และจำนวน theoretical plates ของสารทั้ง 21 ชนิด โดยทั่วไป เมื่อใช้ %B ต่ำ (2–5%) ทำให้ retention time ยาวขึ้น แต่ได้ theoretical plates สูงและ peak มีความสมมาตรดี อย่างไรก็ตาม ค่า S/N ของบางสารยังอยู่ในระดับไม่เพียงพอ ขณะที่การเพิ่ม %B เป็น 10–15% ทำให้เวลา retention สั้นลงและความไว (S/N) ดีขึ้นในบางสาร แต่มี

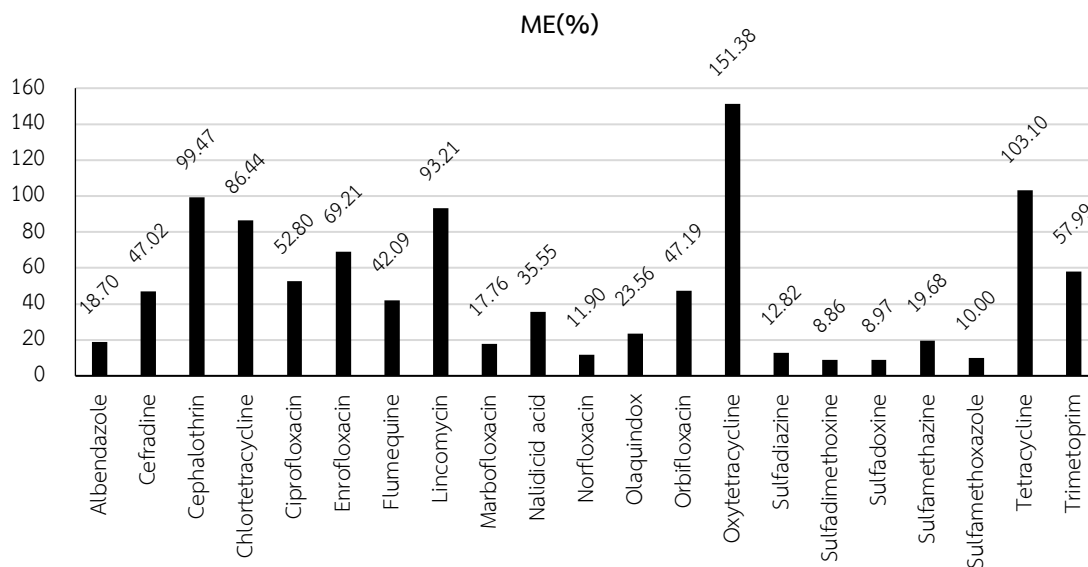
แนวโน้มสูญเสียความสมมาตรและจำนวน theoretical plates อย่างชัดเจน โดยเฉพาะเมื่อใช้ค่า $\geq 15\%$ ส่วน %B สูงสุดที่ 20% ทำให้เวลา retention สั้นที่สุดและค่า S/N ของสารบางชนิดสูงมาก (เช่น trimethoprim, olaquinox) แต่โดยรวมสูญเสีย efficiency ของคอลัมน์ และ peak shape มีความแปรปรวน สรุปได้ว่า initial %B ที่ระดับ 5–10% เป็นสภาวะที่สมดุลที่สุด โดยให้ retention time อยู่ในช่วงเหมาะสม ค่า S/N และ peak shape ดีในหลายสาร และยังคงรักษา theoretical plates ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

จากข้อมูลการพัฒนาวิธีข้างต้นจึงได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดย นำตัวอย่างน้ำหนักโคดิบ ปริมาตร 5 กรัม มาสกัดโดยการเติม 20% TCA (w/v) 2 mL เพื่อทำให้โปรตีนตกตะกอน จากนั้นทำการเขย่าเป็นเวลา 5 นาทีและเติม McIlvaine buffer 20 mL ก่อนจะ vortex เพิ่มอีก 1 นาที ส่วนผสมทั้งหมดถูกปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และนำส่วนใสที่ได้ไปผ่าน SPE ด้วย SPE Chromabond HLB (200 mg/6 mL) ซึ่งถูก condition และ equilibrate ด้วย MeOH 3 mL และน้ำกลั่น 2 mL ตัวอย่างถูกโหลดทั้งหมดลงใน SPE ตามด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น 4 mL และทำให้ SPE แห้งด้วยสุญญากาศเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นชะสารวิเคราะห์ด้วย MeOH 3 mL และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง N₂ evaporator ที่ 35 °C สุดท้าย ตัวอย่างถูกละลายกลับด้วยสารละลาย 0.1% FA ในน้ำและ 0.1% FA ใน ACN (98:2, v/v) ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 μ L และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC–MS/MS ในโหมด +ESI ขั้นตอนการสกัดดังกล่าวถูกนำไปใช้สำหรับการประเมิน matrix effect, % recovery, process efficiency และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทาง CIR 2021/808 ส่วนการแยกวิเคราะห์ทำบนคอลัมน์ Phenomenex Kinetex C18, 150 $\times$ 3.0 mm, 2.6 μ m พร้อม guard column ภายใต้ gradient elution โดยใช้ mobile phase A เป็นน้ำที่เติม 0.1% FA และ mobile phase B เป็น ACN ที่เติม 0.1% FA โปรแกรมการ gradient กำหนดให้เริ่มต้นที่ 20% B และคงไว้จนถึงเวลา 0.75 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 50% B ที่เวลา 7.0 นาที และเพิ่มต่อไปเป็น 100% B ที่เวลา 11.0 นาที คงไว้จนถึงเวลา 11.5 นาที แล้วลดกลับสู่ 20% B ที่เวลา 13.0 นาที เพื่อปรับสมดุลคอลัมน์ โดยมีอัตราการไหลคงที่ 0.40 mL/min และเวลาในการรันทั้งหมด 13 นาที ตามโครมาโทแกรมในภาพที่ 1



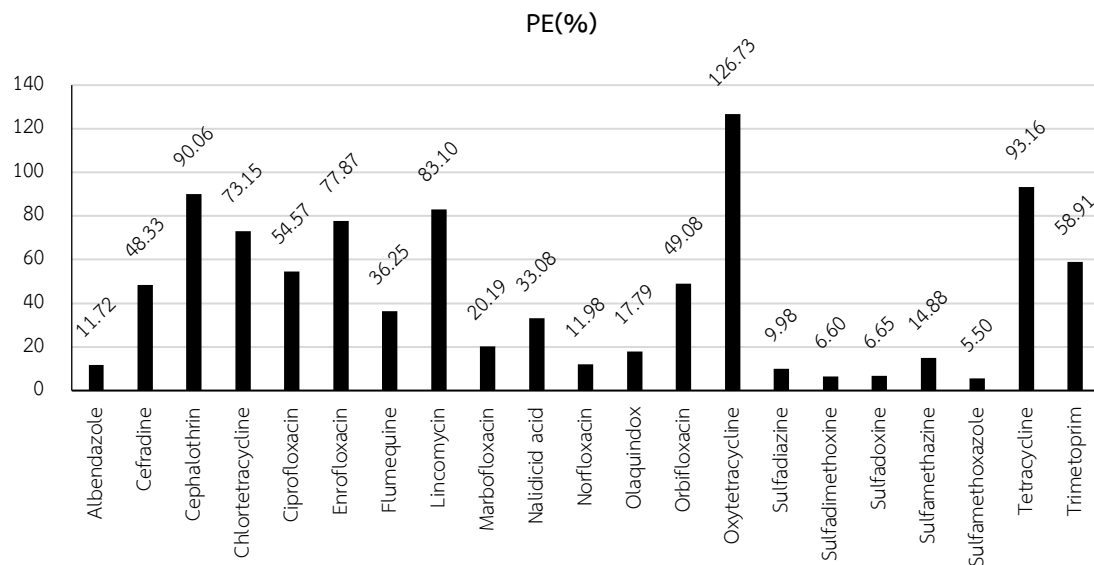
ภาพที่ 1 Overlay chromatogram ของสารตกค้างยาสัตว์ 21 ชนิด

4. การประเมิน matrix effect จากกราฟสอบเทียบ



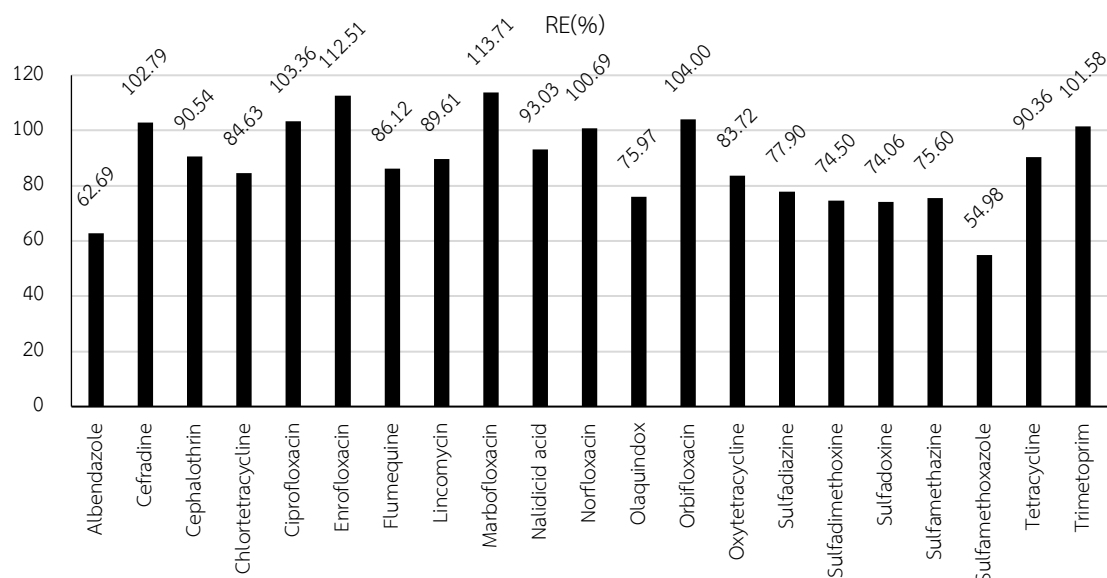
ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์ Matrix Effect (ME) ของสารตกค้างยาสัตว์ 21 ชนิดในน้ำนมโคดิบ

แสดงค่า ME (%) ที่ระดับเฉลี่ยความเข้มข้นต่าง ๆ โดยค่าที่ <100% สะท้อนการกดสัญญาณ (ion suppression) และค่าที่ >100% สะท้อนการเสริมสัญญาณ (ion enhancement)



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์ Process Efficiency (PE) ของสารตกค้างยาสัตว์ 21 ชนิดในน้ำนมโคดิบ

แสดงค่า PE (%) ที่สะท้อนผลรวมของ matrix effect และ recovery ของกระบวนการสกัด โดยเป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพโดยรวมของวิธีการตรวจวิเคราะห์



ภาพที่ 4 เปอร์เซ็นต์ Recovery (RE) ของสารตกค้างยาสัตว์ 21 ชนิดในนํ้านมโคดิบ

แสดงค่า RE (%) ที่คำนวณจากการเปรียบเทียบระหว่างการเดิมมาตรฐานก่อนและหลังการสกัด สะท้อนประสิทธิภาพ % recovery สารวิเคราะห์จากกระบวนการสกัด

จากผลการประเมิน matrix effect (ME), recovery (RE) และ process efficiency (PE) ของสารตกค้างยาสัตว์จำนวน 21 ชนิดในนํ้านมโคดิบ พบว่าส่วนใหญ่มีค่า ME ต่ำกว่า 100% ซึ่งสะท้อนถึงการเกิด ion suppression ในระดับต่าง ๆ ขณะที่บางชนิด เช่น oxytetracycline และ tetracycline แสดงค่า ME มากกว่า 100% บ่งชี้การเกิด ion enhancement ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารวิเคราะห์ในสภาวะจริงมีแนวโน้มถูกบิดเบือนจากอิทธิพลของ matrix อย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าค่า RE ของหลายสารอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามข้อกำหนด (ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 70–120%) แต่ค่า PE ส่วนใหญ่ต่ำกว่า 100% ซึ่งเป็นหลักฐานชัดเจนว่าผลของ matrix effect ร่วมกับ recovery ส่งผลให้ประสิทธิภาพโดยรวมของวิธีลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าสารบางชนิด เช่น albendazole, lincomycin และ nalidixic acid มีทั้งค่า ME และ PE ต่ำมาก ซึ่งอาจทำให้ค่าที่วัดได้ underestimate หากใช้เส้นสอบเทียบที่เตรียมจากสารมาตรฐานในสารละลาย

ดังนั้น การใช้ matrix-fortified calibration curve (pre-extraction spike) จึงมีความจำเป็น เนื่องจากสามารถสะท้อนผลกระทบจากทั้ง matrix effect และ recovery ได้พร้อมกัน ทำให้ค่าการตอบสนองที่ได้จากการวิเคราะห์มีความใกล้เคียงกับสภาวะจริงมากที่สุด อีกทั้งยังเป็นแนวทางที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล (CIR 2021/808; Matuszewski *et al.*, 2003) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ (confirmatory quantitative analysis) โดยเฉพาะในกรณีที่ไม่มีการใช้ stable isotope-labeled internal standard การเลือกใช้ matrix-fortified calibration curve จึงเป็นมาตรการสำคัญที่ช่วยเพิ่มความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของผลการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ในนํ้านมโคดิบ

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

5.1 Selectivity/Specificity

การประเมินความจำเพาะของวิธี LC-MS/MS ในน้ำนมโคดิบด้วยตัวอย่าง blank จากแหล่งที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 20 แหล่งขึ้นไปพบว่าไม่ปรากฏสัญญาณรบกวนที่ retention time (RT) สารเป้าหมายในช่องสัญญาณ SRM ที่กำหนด และไม่พบสัญญาณแฝงที่ทับซ้อนจนมีผลต่อการยืนยันชนิดสาร สรุปได้ว่าไม่มี blank interference สำหรับสารทั้ง 21 ชนิดภายใต้สภาวะการแยกโครมาโทกราฟีและการไอออนไนซ์ที่กำหนด การตรวจสอบความสม่ำเสมอของ RT แสดงว่า RT ของทุกสารอยู่ภายในช่วงความคลาดเคลื่อนที่กำหนดของวิธี โดยมี RT มากกว่า void volume อย่างน้อย 2 เท่า และความคลาดเคลื่อนจาก matrix-fortified standard ไม่เกิน ± 0.1 นาที ในการวิเคราะห์ซ้ำหลายชุดและหลายระดับความเข้มข้นใกล้เคียงค่า MRL สะท้อนความเสถียรของระบบแยกและการควบคุมสภาวะเครื่องมือที่เพียงพอสำหรับการยืนยันผลใน matrix ที่ซับซ้อนอย่างน้ำนมโคดิบ นอกจากนี้การประเมินอัตราส่วนไอออนระหว่าง qualifier/quantifier (ion ratio) โดยเทียบกับค่าอ้างอิงจากมาตรฐานภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่า deviation ของ ion ratio สำหรับทุกสารอยู่ภายในเกณฑ์ยอมรับไม่เกิน $\pm 40\%$ ตลอดช่วง 0.1–1.5 MRL แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการแตกตัวของไอออนค่อนข้างคงที่ และไม่ถูกรบกวนจาก matrix ในระดับมากจนทำให้สูญเสียความจำเพาะของสัญญาณภาพรวมผลดังกล่าวสอดคล้องกับข้อกำหนดของวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณตามแนวทาง CIR 2021/808 กล่าวคือวิธีนี้มีความจำเพาะเพียงพอต่อการยืนยันชนิดสาร โดยใช้ SRM อย่างน้อย 2 product ions ต่อสารเพื่อให้ได้ identification points ที่เพียงพอ

5.2 Linearity

จากผลการทดสอบความเป็นเชิงเส้นตรงของสารตกค้างยาสัตว์ทั้ง 21 ชนิด ในช่วงความเข้มข้น 0–2.5 MRL โดยใช้การทำซ้ำ 3 ครั้ง ตามตารางที่ 10 พบว่า calibration curve ทั้งหมดมีค่า R^2 เฉลี่ยไม่น้อยกว่า 0.9967 และทุกตัวมีค่า R^2 มากกว่า 0.997 ยกเว้นบางสาร เช่น lincomycin และ orbifloxacin ซึ่งยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามแนวทางการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณ ทั้งนี้ค่า %RSD ของ slope ส่วนใหญ่มีค่า $< 15\%$ แสดงถึงความสม่ำเสมอของความชัน calibration curve ในแต่ละชุดซ้ำ อย่างไรก็ตาม มีบางสารที่มีค่า %RSD ของ slope สูงกว่า 15% เช่น enrofloxacin (20.72%), norfloxacin (20.11%) และ sulfamethoxazole (20.48%) ซึ่งบ่งชี้ว่ามีความแปรปรวนของ slope ระหว่างการทำซ้ำมากกว่าสารอื่น ๆ อาจเกิดจากผลของ matrix หรือปัจจัยในขั้นตอนการสกัดและวิเคราะห์ แต่โดยรวมยังคงอยู่ในระดับที่สามารถยอมรับได้ เนื่องจาก calibration curve ยังคงมีค่า R^2 สูงและไม่กระทบต่อ linearity ของวิธีวิเคราะห์โดยรวม การประเมิน linearity ในการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นเชิงเส้นตรงดีสำหรับสารทั้งหมด 21 ชนิดในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ และแม้จะมีความแปรปรวนของ slope บางส่วน แต่ผลโดยรวมยังคงแสดงถึงความเหมาะสมของวิธีสำหรับการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ (quantitative confirmatory analysis)

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความเป็นเชิงเส้นตรง (linearity) ของสารตกค้างยาสัตว์ทั้ง 21 ชนิด

No. Compound	Regression Equation (n=3)	R ² mean $\pm$ SD (n=3)	%RSD ของ slope (n=3)
1 Albendazole	y= 662.67 x + (-28.33)	0.9975 $\pm$ 0.0018	5.15
2 Cefradine	y= 162.83 x + (-540.69)	0.9971 $\pm$ 0.0033	7.95
3 Cephalothrin	y= 4.46 x + 1.03	0.9983 $\pm$ 0.0009	19.53
4 Chlortetracycline	y= 81.76 x + (-202.30)	0.9989 $\pm$ 0.0012	9.59
5 Ciprofloxacin	y= 459.83 x + 352.14	0.9981 $\pm$ 0.0016	9.22
6 Enrofloxacin	y= 882.81 x + (-1412.05)	0.9977 $\pm$ 0.0026	20.72
7 Flumequine	y= 2181.09 x + (-1941.82)	0.9984 $\pm$ 0.0021	14.74
8 Lincomycin	y= 1190.95 x + 3199.87	0.9968 $\pm$ 0.0037	19.93
9 Marbofloxacin	y= 529.19 x + 370.01	0.9990 $\pm$ 0.0003	2.17
10 Nalidixic acid	y= 2416.58 x + (-669.66)	0.9978 $\pm$ 0.0008	17.58
11 Norfloxacin	y= 208.87 x + (-209.46)	0.9972 $\pm$ 0.0023	20.11
12 Olaquinox	y= 64.66 x + 23.89	0.9994 $\pm$ 0.0003	13.99
13 Orbifloxacin	y= 658.13 x + (-835.85)	0.9967 $\pm$ 0.0037	8.25
14 Oxytetracycline	y= 208.24 x + (-371.54)	0.9979 $\pm$ 0.0027	2.44
15 Sulfadiazine	y= 140.92 x + (-50.71)	0.9988 $\pm$ 0.0004	5.76
16 Sulfadimethoxine	y= 287.72 x + (-119.80)	0.9982 $\pm$ 0.0006	19.91
17 Sulfadoxine	y= 683.85 x + (-475.46)	0.9982 $\pm$ 0.0013	16.01
18 Sulfamethazine	y= 555.70 x + (-90.22)	0.9979 $\pm$ 0.0012	8.20
19 Sulfamethoxazole	y= 77.38 x + (-22.94)	0.9983 $\pm$ 0.0011	20.48
20 Tetracycline	y= 200.05 x + (-237.62)	0.9979 $\pm$ 0.0014	7.14
21 Trimetoprim	y= 574.73 x + 259.88	0.9984 $\pm$ 0.0011	5.62

หมายเหตุ: Linearity ประเมินในช่วงความเข้มข้น 0–2.5 MRL, n=3

5.3 Trueness (recovery), Precision (repeatability and within laboratory reproducibility)

ตารางที่ 11 ผล Trueness และ Within-laboratory reproducibility ของ Albendazole, Cefradine และ Cephalothin

Compounds	Fortification level	Day	Mean measured conc. $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Mean recovery $\pm$ SD (%)	RSDr (%)	Mean overall (n=18)	SD overall (n=18)	RSDwR (%)
Albendazole	0.1 MRL	1	10.5 $\pm$ 1.6	104.7 $\pm$ 15.6	14.90	10.5	2.20	20.87
		2	12.4 $\pm$ 3.2	123.6 $\pm$ 32.1	26.00			
		3	10.5 $\pm$ 1.0	105.4 $\pm$ 9.8	9.28			
	0.5 MRL	1	52.0 $\pm$ 2.6	104.0 $\pm$ 5.2	4.99	50.3	8.72	8.67
		2	54.9 $\pm$ 3.5	109.9 $\pm$ 7.1	6.44			
		3	52.4 $\pm$ 6.3	104.7 $\pm$ 12.5	11.96			
	1.0 MRL	1	106.8 $\pm$ 6.3	106.8 $\pm$ 6.3	5.94	101.6	8.18	8.05
		2	106.9 $\pm$ 10.9	106.9 $\pm$ 10.9	10.24			
		3	108.2 $\pm$ 8.1	108.2 $\pm$ 8.1	7.51			
	1.5 MRL	1	155.2 $\pm$ 7.6	103.5 $\pm$ 5.0	4.88	139.1	12.92	9.29
		2	135.6 $\pm$ 8.9	90.4 $\pm$ 5.9	6.58			
		3	149.8 $\pm$ 13.6	99.8 $\pm$ 9.1	9.07			
Cefradine	0.1 MRL	1	9.5 $\pm$ 1.4	95.3 $\pm$ 14.2	14.92	12.8	4.54	35.56
		2	19.5 $\pm$ 0.8	194.8 $\pm$ 7.8	4.03			
		3	11.4 $\pm$ 0.4	113.9 $\pm$ 4.3	3.80			
	0.5 MRL	1	51.0 $\pm$ 3.5	101.9 $\pm$ 7.0	6.82	47.6	8.41	8.83
		2	53.0 $\pm$ 4.4	106.1 $\pm$ 8.8	8.29			
		3	46.7 $\pm$ 2.0	93.5 $\pm$ 4.0	4.32			
	1.0 MRL	1	96.9 $\pm$ 3.5	96.9 $\pm$ 3.5	3.65	95.3	8.24	8.65
		2	108.3 $\pm$ 6.6	108.3 $\pm$ 6.6	6.05			
		3	96.7 $\pm$ 8.4	96.7 $\pm$ 8.4	8.65			
	1.5 MRL	1	141.6 $\pm$ 7.5	94.4 $\pm$ 5.0	5.30	134.7	8.26	6.13
		2	137.6 $\pm$ 8.2	91.7 $\pm$ 5.5	5.96			
		3	147.4 $\pm$ 7.0	98.3 $\pm$ 4.7	4.76			
Cephalothin	0.1 MRL	1	9.3 $\pm$ 3.1	92.6 $\pm$ 30.6	33.04	12.8	4.21	32.95
		2	16.3 $\pm$ 3.5	162.8 $\pm$ 35.1	21.54			
		3	14.9 $\pm$ 2.3	149.4 $\pm$ 23.0	15.42			
	0.5 MRL	1	47.5 $\pm$ 5.7	95.0 $\pm$ 11.4	12.02	48.9	10.47	10.70
		2	51.9 $\pm$ 3.8	103.8 $\pm$ 7.6	7.36			
		3	55.6 $\pm$ 2.5	111.2 $\pm$ 5.0	4.53			
	1.0 MRL	1	104.3 $\pm$ 6.0	104.3 $\pm$ 6.0	5.75	99.0	5.99	6.05
		2	105.5 $\pm$ 5.1	105.5 $\pm$ 5.1	4.84			
		3	103.5 $\pm$ 7.6	103.5 $\pm$ 7.6	7.33			
	1.5 MRL	1	154.2 $\pm$ 7.1	102.8 $\pm$ 4.7	4.58	138.0	11.66	8.45
		2	135.9 $\pm$ 12.6	90.6 $\pm$ 8.4	9.29			
		3	146.8 $\pm$ 6.9	97.9 $\pm$ 4.6	4.73			

ตารางที่ 12 ผล Trueness และ Within-laboratory reproducibility ของ Chlortetracycline, Ciprofloxacin และ Enrofloxacin

Compounds	Fortification level	Day	Mean measured conc. $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Mean recovery $\pm$ SD (%)	RSDr (%)	Mean overall (n=18)	SD overall (n=18)	RSDwR (%)
Chlortetracycline	0.1 MRL	1	10.5 $\pm$ 1.6	104.5 $\pm$ 16.0	15.32	11.9	2.62	22.08
		2	13.9 $\pm$ 3.4	138.6 $\pm$ 34.0	24.53			
		3	13.2 $\pm$ 1.1	132.3 $\pm$ 11.3	8.56			
	0.5 MRL	1	49.8 $\pm$ 5.3	99.5 $\pm$ 10.7	10.75	47.5	8.65	9.11
		2	52.7 $\pm$ 2.7	105.4 $\pm$ 5.4	5.16			
		3	47.9 $\pm$ 3.7	95.8 $\pm$ 7.4	7.72			
	1.0 MRL	1	99.0 $\pm$ 1.9	99.0 $\pm$ 1.9	1.93	96.0	7.27	7.57
		2	99.6 $\pm$ 9.5	99.6 $\pm$ 9.5	9.57			
		3	105.2 $\pm$ 7.5	105.2 $\pm$ 7.5	7.15			
	1.5 MRL	1	151.9 $\pm$ 3.4	101.3 $\pm$ 2.3	2.23	133.6	11.59	8.68
		2	135.1 $\pm$ 11.7	90.0 $\pm$ 7.8	8.66			
		3	136.1 $\pm$ 9.7	90.7 $\pm$ 6.5	7.14			
Ciprofloxacin	0.1 MRL	1	6.1 $\pm$ 2.0	60.6 $\pm$ 19.8	32.64	10.2	3.67	36.09
		2	13.8 $\pm$ 1.0	138.2 $\pm$ 9.7	7.05			
		3	12.3 $\pm$ 0.5	123.2 $\pm$ 5.1	4.11			
	0.5 MRL	1	54.6 $\pm$ 3.7	109.2 $\pm$ 7.5	6.84	49.7	6.83	6.87
		2	51.0 $\pm$ 4.0	102.0 $\pm$ 8.0	7.81			
		3	51.9 $\pm$ 1.2	103.8 $\pm$ 2.5	2.37			
	1.0 MRL	1	101.8 $\pm$ 1.1	101.8 $\pm$ 1.1	1.08	99.4	5.23	5.26
		2	108.5 $\pm$ 5.1	108.5 $\pm$ 5.1	4.69			
		3	104.4 $\pm$ 6.2	104.4 $\pm$ 6.2	5.94			
	1.5 MRL	1	152.7 $\pm$ 4.8	101.8 $\pm$ 3.2	3.12	139.2	9.83	7.06
		2	138.0 $\pm$ 11.3	92.0 $\pm$ 7.5	8.18			
		3	150.0 $\pm$ 5.5	100.0 $\pm$ 3.7	3.67			
Enrofloxacin	0.1 MRL	1	10.7 $\pm$ 2.7	107.0 $\pm$ 27.2	25.41	12.4	2.66	21.42
		2	15.7 $\pm$ 0.9	157.0 $\pm$ 8.9	5.69			
		3	12.9 $\pm$ 0.9	129.2 $\pm$ 8.8	6.82			
	0.5 MRL	1	54.2 $\pm$ 3.7	108.4 $\pm$ 7.4	6.83	49.6	7.15	7.20
		2	49.2 $\pm$ 3.0	98.4 $\pm$ 5.9	6.03			
		3	53.7 $\pm$ 1.6	107.5 $\pm$ 3.2	2.99			
	1.0 MRL	1	101.9 $\pm$ 2.8	101.9 $\pm$ 2.8	2.72	99.8	4.76	4.77
		2	108.2 $\pm$ 5.6	108.2 $\pm$ 5.6	5.21			
		3	105.8 $\pm$ 3.7	105.8 $\pm$ 3.7	3.50			
	1.5 MRL	1	146.3 $\pm$ 4.5	97.6 $\pm$ 3.0	3.07	136.8	9.27	6.77
		2	136.4 $\pm$ 11.2	90.9 $\pm$ 7.5	8.21			
		3	150.5 $\pm$ 4.5	100.3 $\pm$ 3.0	2.99			

ตารางที่ 13 ผล Trueness และ Within-laboratory reproducibility ของ Flumequine, Lincomycin และ Marbofloxacin

Compounds	Fortification level	Day	Mean measured conc. $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Mean recovery $\pm$ SD (%)	RSDr (%)	Mean overall (n=18)	SD overall (n=18)	RSDwR (%)
Flumequine	0.1 MRL	1	7.2 $\pm$ 2.4	143.1 $\pm$ 48.6	33.97	6.3	1.98	31.64
		2	7.5 $\pm$ 1.8	150.7 $\pm$ 36.3	24.10			
		3	5.2 $\pm$ 0.5	103.3 $\pm$ 10.8	10.47			
	0.5 MRL	1	23.8 $\pm$ 2.9	95.3 $\pm$ 11.6	12.19	23.9	9.08	9.51
		2	26.4 $\pm$ 1.3	105.4 $\pm$ 5.3	5.00			
		3	25.4 $\pm$ 1.9	101.6 $\pm$ 7.4	7.28			
	1.0 MRL	1	49.3 $\pm$ 1.0	98.5 $\pm$ 2.0	2.08	48.0	4.20	8.74
		2	51.1 $\pm$ 6.9	102.2 $\pm$ 13.7	13.43			
		3	51.7 $\pm$ 2.8	103.4 $\pm$ 5.6	5.42			
	1.5 MRL	1	78.8 $\pm$ 3.9	105.1 $\pm$ 5.1	4.89	71.3	6.65	9.33
		2	72.6 $\pm$ 5.2	96.8 $\pm$ 6.9	7.14			
		3	74.4 $\pm$ 9.2	99.1 $\pm$ 12.2	12.32			
Lincomycin	0.1 MRL	1	11.0 $\pm$ 3.2	73.6 $\pm$ 21.6	29.37	16.3	5.64	34.59
		2	23.5 $\pm$ 1.4	156.4 $\pm$ 9.3	5.97			
		3	17.1 $\pm$ 1.7	114.0 $\pm$ 11.5	10.12			
	0.5 MRL	1	80.4 $\pm$ 4.5	107.2 $\pm$ 5.9	5.55	75.7	9.93	9.85
		2	74.2 $\pm$ 9.8	99.0 $\pm$ 13.0	13.14			
		3	84.9 $\pm$ 2.2	113.2 $\pm$ 2.9	2.54			
	1.0 MRL	1	130.3 $\pm$ 3.4	86.8 $\pm$ 2.2	2.58	146.1	19.50	13.35
		2	159.9 $\pm$ 12.1	106.6 $\pm$ 8.1	7.56			
		3	172.5 $\pm$ 2.3	115.0 $\pm$ 1.5	1.30			
	1.5 MRL	1	207.5 $\pm$ 21.2	92.2 $\pm$ 9.4	10.24	208.5	24.72	11.86
		2	212.5 $\pm$ 27.9	94.5 $\pm$ 12.4	13.11			
		3	240.1 $\pm$ 10.6	106.7 $\pm$ 4.7	4.41			
Marbofloxacin	0.1 MRL	1	6.3 $\pm$ 1.4	83.7 $\pm$ 18.3	21.90	7.4	1.54	20.97
		2	9.4 $\pm$ 0.5	125.1 $\pm$ 6.3	5.03			
		3	7.6 $\pm$ 0.4	101.7 $\pm$ 4.8	4.74			
	0.5 MRL	1	39.4 $\pm$ 3.0	104.9 $\pm$ 8.1	7.72	36.6	6.20	6.35
		2	39.4 $\pm$ 1.9	105.2 $\pm$ 5.0	4.75			
		3	37.2 $\pm$ 1.3	99.1 $\pm$ 3.4	3.41			
	1.0 MRL	1	76.1 $\pm$ 2.4	101.5 $\pm$ 3.2	3.11	74.4	3.69	4.96
		2	81.3 $\pm$ 2.9	108.4 $\pm$ 3.9	3.61			
		3	78.0 $\pm$ 3.9	104.0 $\pm$ 5.2	5.05			
	1.5 MRL	1	108.5 $\pm$ 4.6	96.5 $\pm$ 4.1	4.20	103.4	6.44	6.23
		2	106.6 $\pm$ 9.1	94.7 $\pm$ 8.0	8.49			
		3	112.2 $\pm$ 4.3	99.7 $\pm$ 3.8	3.86			

ตารางที่ 14 ผล Trueness และ Within-laboratory reproducibility ของ Nalidixic acid, Norfloxacin และ Olaquinox

Compounds	Fortification level	Day	Mean measured conc. $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Mean recovery $\pm$ SD (%)	RSDr (%)	Mean overall (n=18)	SD overall (n=18)	RSDwR (%)
Nalidixic acid	0.1 MRL	1	6.3 $\pm$ 1.7	126.8 $\pm$ 33.2	26.19	5.7	1.76	30.60
		2	7.4 $\pm$ 1.4	147.7 $\pm$ 28.3	19.19			
		3	4.5 $\pm$ 0.6	89.0 $\pm$ 12.8	14.41			
	0.5 MRL	1	24.0 $\pm$ 2.4	95.9 $\pm$ 9.5	9.90	23.8	8.12	8.53
		2	26.5 $\pm$ 1.7	105.8 $\pm$ 6.9	6.56			
		3	24.9 $\pm$ 1.3	99.6 $\pm$ 5.0	5.05			
	1.0 MRL	1	52.6 $\pm$ 2.5	105.2 $\pm$ 5.0	4.73	48.8	3.98	8.15
		2	51.8 $\pm$ 4.3	103.5 $\pm$ 8.6	8.29			
		3	50.1 $\pm$ 5.0	100.2 $\pm$ 10.1	10.04			
	1.5 MRL	1	77.8 $\pm$ 4.9	103.7 $\pm$ 6.5	6.30	71.5	5.03	7.04
		2	73.7 $\pm$ 2.5	98.3 $\pm$ 3.4	3.42			
		3	74.9 $\pm$ 6.7	99.8 $\pm$ 9.0	8.97			
Norfloxacin	0.1 MRL	1	2.9 $\pm$ 0.5	57.8 $\pm$ 9.8	17.02	5.7	2.50	43.90
		2	8.6 $\pm$ 0.9	172.1 $\pm$ 17.6	10.20			
		3	6.5 $\pm$ 0.4	130.8 $\pm$ 7.8	5.99			
	0.5 MRL	1	23.8 $\pm$ 1.1	95.2 $\pm$ 4.3	4.53	22.6	5.09	5.63
		2	24.7 $\pm$ 1.4	98.8 $\pm$ 5.5	5.60			
		3	23.2 $\pm$ 1.0	92.7 $\pm$ 4.1	4.39			
	1.0 MRL	1	47.8 $\pm$ 3.9	95.5 $\pm$ 7.9	8.22	48.5	4.11	8.47
		2	53.6 $\pm$ 4.1	107.2 $\pm$ 8.3	7.71			
		3	52.3 $\pm$ 1.5	104.7 $\pm$ 3.1	2.95			
	1.5 MRL	1	74.0 $\pm$ 4.2	98.7 $\pm$ 5.5	5.62	68.9	5.51	7.99
		2	72.3 $\pm$ 6.8	96.4 $\pm$ 9.1	9.45			
		3	71.9 $\pm$ 6.0	95.8 $\pm$ 8.0	8.35			
Olaquinox	0.1 MRL	1	4.4 $\pm$ 0.4	87.7 $\pm$ 8.5	9.67	4.6	0.56	12.03
		2	5.0 $\pm$ 0.4	99.7 $\pm$ 8.1	8.14			
		3	5.3 $\pm$ 0.5	105.6 $\pm$ 9.2	8.71			
	0.5 MRL	1	25.9 $\pm$ 2.1	103.6 $\pm$ 8.5	8.24	24.0	7.39	7.70
		2	25.4 $\pm$ 2.1	101.7 $\pm$ 8.2	8.10			
		3	24.7 $\pm$ 1.4	98.7 $\pm$ 5.6	5.63			
	1.0 MRL	1	50.7 $\pm$ 1.8	101.3 $\pm$ 3.6	3.51	49.2	3.24	6.59
		2	54.1 $\pm$ 3.2	108.2 $\pm$ 6.5	5.99			
		3	51.2 $\pm$ 3.7	102.3 $\pm$ 7.5	7.32			
	1.5 MRL	1	80.1 $\pm$ 4.6	106.8 $\pm$ 6.2	5.80	70.3	7.56	10.76
		2	69.7 $\pm$ 9.7	92.9 $\pm$ 13.0	13.96			
		3	73.0 $\pm$ 3.2	97.3 $\pm$ 4.3	4.39			

ตารางที่ 15 ผล Trueness และ Within-laboratory reproducibility ของ Orbifloxacin, Oxytetracycline และ Sulfadiazine

Compounds	Fortification level	Day	Mean measured conc. $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Mean recovery $\pm$ SD (%)	RSDr (%)	Mean overall (n=18)	SD overall (n=18)	RSDwR (%)
Orbifloxacin	0.1 MRL	1	7.9 $\pm$ 1.5	79.3 $\pm$ 15.2	19.21	11.5	3.47	30.23
		2	15.8 $\pm$ 0.8	157.9 $\pm$ 7.9	5.02			
		3	12.6 $\pm$ 0.7	125.8 $\pm$ 6.7	5.34			
	0.5 MRL	1	54.3 $\pm$ 2.3	108.5 $\pm$ 4.6	4.23	48.7	6.32	6.49
		2	50.5 $\pm$ 3.0	101.0 $\pm$ 6.0	5.92			
		3	49.5 $\pm$ 2.2	99.0 $\pm$ 4.3	4.35			
	1.0 MRL	1	96.3 $\pm$ 2.3	96.3 $\pm$ 2.3	2.38	97.5	7.13	7.32
		2	107.0 $\pm$ 6.6	107.0 $\pm$ 6.6	6.12			
		3	105.5 $\pm$ 6.7	105.5 $\pm$ 6.7	6.35			
	1.5 MRL	1	142.4 $\pm$ 6.0	95.0 $\pm$ 4.0	4.23	134.7	11.05	8.20
		2	132.9 $\pm$ 12.0	88.6 $\pm$ 8.0	9.00			
		3	151.2 $\pm$ 5.8	100.8 $\pm$ 3.9	3.85			
Oxytetracycline	0.1 MRL	1	10.3 $\pm$ 1.2	102.9 $\pm$ 11.7	11.33	11.7	1.82	15.58
		2	14.2 $\pm$ 0.3	141.8 $\pm$ 3.1	2.19			
		3	12.5 $\pm$ 0.8	124.6 $\pm$ 8.1	6.51			
	0.5 MRL	1	55.0 $\pm$ 4.2	110.1 $\pm$ 8.3	7.58	49.3	7.87	7.98
		2	50.5 $\pm$ 3.8	101.0 $\pm$ 7.6	7.48			
		3	50.5 $\pm$ 2.1	101.1 $\pm$ 4.3	4.24			
	1.0 MRL	1	98.4 $\pm$ 3.1	98.4 $\pm$ 3.1	3.12	97.2	4.85	4.99
		2	105.4 $\pm$ 4.8	105.4 $\pm$ 4.8	4.59			
		3	104.0 $\pm$ 3.7	104.0 $\pm$ 3.7	3.57			
	1.5 MRL	1	147.2 $\pm$ 4.4	98.1 $\pm$ 2.9	2.97	137.5	10.11	7.35
		2	136.8 $\pm$ 12.9	91.2 $\pm$ 8.6	9.44			
		3	151.3 $\pm$ 5.3	100.9 $\pm$ 3.5	3.49			
Sulfadiazine	0.1 MRL	1	2.9 $\pm$ 0.4	116.2 $\pm$ 17.3	14.87	2.7	0.42	15.64
		2	2.9 $\pm$ 0.5	114.0 $\pm$ 18.4	16.10			
		3	2.7 $\pm$ 0.4	107.4 $\pm$ 16.1	15.00			
	0.5 MRL	1	13.9 $\pm$ 0.9	110.9 $\pm$ 6.9	6.24	12.4	8.73	8.81
		2	12.4 $\pm$ 1.2	99.3 $\pm$ 9.8	9.82			
		3	12.9 $\pm$ 0.7	103.5 $\pm$ 5.7	5.54			
	1.0 MRL	1	26.6 $\pm$ 1.5	106.5 $\pm$ 6.0	5.63	23.2	2.23	9.63
		2	23.1 $\pm$ 2.0	92.6 $\pm$ 7.9	8.48			
		3	23.7 $\pm$ 1.6	95.0 $\pm$ 6.5	6.79			
	1.5 MRL	1	39.2 $\pm$ 3.9	104.4 $\pm$ 10.3	9.88	33.8	3.90	11.53
		2	34.5 $\pm$ 3.6	92.0 $\pm$ 9.6	10.42			
		3	33.5 $\pm$ 1.5	89.4 $\pm$ 3.9	4.34			

ตารางที่ 16 ผล Trueness และ Within-laboratory reproducibility ของ Sulfadimethoxine, Sulfadoxine และ Sulfamethazine

Compounds	Fortification level	Day	Mean measured conc. $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Mean recovery $\pm$ SD (%)	RSDr (%)	Mean overall (n=18)	SD overall (n=18)	RSDwR (%)
Sulfadimethoxine	0.1 MRL	1	3.1 $\pm$ 0.5	123.7 $\pm$ 20.3	16.40	2.8	0.66	23.93
		2	2.9 $\pm$ 1.0	115.1 $\pm$ 41.7	36.20			
		3	2.8 $\pm$ 0.3	111.9 $\pm$ 12.2	10.92			
	0.5 MRL	1	12.0 $\pm$ 1.4	95.8 $\pm$ 10.9	11.43	11.7	9.66	10.35
		2	12.7 $\pm$ 1.1	101.5 $\pm$ 9.2	9.04			
		3	12.3 $\pm$ 1.2	98.1 $\pm$ 9.6	9.83			
	1.0 MRL	1	27.4 $\pm$ 2.0	109.6 $\pm$ 8.0	7.33	25.1	2.55	10.17
		2	26.7 $\pm$ 3.5	106.9 $\pm$ 14.2	13.26			
		3	25.4 $\pm$ 1.7	101.4 $\pm$ 6.9	6.78			
	1.5 MRL	1	40.1 $\pm$ 4.4	106.9 $\pm$ 11.8	11.08	34.2	4.56	13.33
		2	34.0 $\pm$ 4.0	90.6 $\pm$ 10.6	11.70			
		3	34.3 $\pm$ 2.7	91.5 $\pm$ 7.2	7.84			
Sulfadoxine	0.1 MRL	1	3.0 $\pm$ 0.6	121.2 $\pm$ 23.3	19.23	3.0	0.39	13.08
		2	3.4 $\pm$ 0.2	135.7 $\pm$ 6.6	4.86			
		3	3.0 $\pm$ 0.2	119.7 $\pm$ 7.0	5.88			
	0.5 MRL	1	13.1 $\pm$ 0.7	104.5 $\pm$ 5.9	5.66	12.4	8.78	8.86
		2	13.9 $\pm$ 1.1	111.2 $\pm$ 8.7	7.80			
		3	12.3 $\pm$ 0.9	98.0 $\pm$ 6.9	7.01			
	1.0 MRL	1	25.2 $\pm$ 2.1	100.9 $\pm$ 8.3	8.26	23.0	2.33	10.16
		2	25.5 $\pm$ 1.6	101.9 $\pm$ 6.3	6.13			
		3	22.1 $\pm$ 1.7	88.2 $\pm$ 6.9	7.77			
	1.5 MRL	1	37.9 $\pm$ 2.3	101.1 $\pm$ 6.2	6.16	33.5	2.99	8.94
		2	34.4 $\pm$ 3.4	91.8 $\pm$ 9.0	9.84			
		3	33.8 $\pm$ 1.3	90.1 $\pm$ 3.5	3.87			
Sulfamethazine	0.1 MRL	1	2.5 $\pm$ 0.6	98.7 $\pm$ 24.6	24.95	2.7	0.45	16.80
		2	3.0 $\pm$ 0.2	121.3 $\pm$ 7.9	6.52			
		3	3.0 $\pm$ 0.2	120.6 $\pm$ 6.7	5.59			
	0.5 MRL	1	14.1 $\pm$ 0.6	112.7 $\pm$ 4.4	3.93	12.0	12.58	13.06
		2	13.2 $\pm$ 1.1	105.3 $\pm$ 8.8	8.38			
		3	10.9 $\pm$ 0.5	86.8 $\pm$ 4.0	4.57			
	1.0 MRL	1	26.6 $\pm$ 1.2	106.2 $\pm$ 4.9	4.64	23.6	2.42	10.29
		2	25.7 $\pm$ 1.7	103.0 $\pm$ 6.9	6.70			
		3	22.3 $\pm$ 1.8	89.1 $\pm$ 7.1	7.93			
	1.5 MRL	1	40.2 $\pm$ 3.2	107.3 $\pm$ 8.4	7.85	34.1	4.44	13.03
		2	34.4 $\pm$ 4.8	91.8 $\pm$ 12.8	13.97			
		3	33.3 $\pm$ 0.8	88.7 $\pm$ 2.0	2.27			

ตารางที่ 17 ผล Trueness และ Within-laboratory reproducibility ของ Sulfamethoxazole, Tetracycline และ Trimethoprim

Compounds	Fortification level	Day	Mean measured conc. $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Mean recovery $\pm$ SD (%)	RSDr (%)	Mean overall (n=18)	SD overall (n=18)	RSDwR (%)
Sulfamethoxazole	0.1 MRL	1	2.6 $\pm$ 0.7	102.4 $\pm$ 27.3	26.67	2.8	0.71	25.11
		2	3.1 $\pm$ 0.9	122.4 $\pm$ 37.3	30.51			
		3	3.3 $\pm$ 0.2	131.7 $\pm$ 6.1	4.62			
	0.5 MRL	1	12.4 $\pm$ 1.3	99.5 $\pm$ 10.3	10.34	11.8	11.78	12.46
		2	13.9 $\pm$ 0.7	111.2 $\pm$ 5.5	4.98			
		3	11.1 $\pm$ 0.7	88.7 $\pm$ 5.4	6.13			
	1.0 MRL	1	25.1 $\pm$ 1.7	100.5 $\pm$ 6.9	6.84	23.5	2.30	9.80
		2	25.5 $\pm$ 1.9	102.1 $\pm$ 7.8	7.60			
		3	23.6 $\pm$ 3.0	94.6 $\pm$ 11.9	12.61			
	1.5 MRL	1	37.0 $\pm$ 2.4	98.8 $\pm$ 6.3	6.41	33.5	2.67	7.98
		2	35.3 $\pm$ 2.1	94.1 $\pm$ 5.5	5.81			
		3	33.8 $\pm$ 2.8	90.0 $\pm$ 7.5	8.37			
Tetracycline	0.1 MRL	1	6.4 $\pm$ 1.9	64.4 $\pm$ 18.9	29.36	11.3	4.62	41.02
		2	16.8 $\pm$ 1.6	168.3 $\pm$ 16.0	9.49			
		3	12.4 $\pm$ 1.1	123.7 $\pm$ 11.0	8.87			
	0.5 MRL	1	52.2 $\pm$ 4.7	104.4 $\pm$ 9.4	9.03	49.6	7.47	7.53
		2	51.5 $\pm$ 4.1	103.0 $\pm$ 8.1	7.87			
		3	53.4 $\pm$ 2.6	106.8 $\pm$ 5.1	4.81			
	1.0 MRL	1	86.3 $\pm$ 4.6	86.3 $\pm$ 4.6	5.31	96.9	13.15	13.57
		2	106.0 $\pm$ 7.2	106.0 $\pm$ 7.2	6.82			
		3	114.7 $\pm$ 2.5	114.7 $\pm$ 2.5	2.15			
	1.5 MRL	1	133.3 $\pm$ 10.1	88.8 $\pm$ 6.7	7.56	132.3	14.83	11.21
		2	134.7 $\pm$ 20.1	89.8 $\pm$ 13.4	14.92			
		3	150.9 $\pm$ 3.3	100.6 $\pm$ 2.2	2.18			
Trimethoprim	0.1 MRL	1	3.5 $\pm$ 1.0	69.9 $\pm$ 20.2	28.82	5.1	1.58	30.88
		2	6.8 $\pm$ 0.5	136.9 $\pm$ 9.2	6.70			
		3	5.9 $\pm$ 0.4	118.1 $\pm$ 7.8	6.59			
	0.5 MRL	1	26.3 $\pm$ 2.9	105.1 $\pm$ 11.8	11.20	24.4	8.40	8.62
		2	24.4 $\pm$ 1.5	97.6 $\pm$ 6.1	6.26			
		3	26.4 $\pm$ 0.9	105.8 $\pm$ 3.7	3.52			
	1.0 MRL	1	49.4 $\pm$ 1.6	98.8 $\pm$ 3.1	3.19	49.3	3.41	6.93
		2	52.8 $\pm$ 3.4	105.6 $\pm$ 6.7	6.36			
		3	53.8 $\pm$ 3.7	107.5 $\pm$ 7.3	6.82			
	1.5 MRL	1	74.9 $\pm$ 4.3	99.9 $\pm$ 5.7	5.70	69.8	5.30	7.59
		2	69.6 $\pm$ 4.8	92.7 $\pm$ 6.5	6.96			
		3	76.5 $\pm$ 4.7	102.0 $\pm$ 6.2	6.11			

ผลการประเมิน trueness และ within-laboratory reproducibility ของวิธีวิเคราะห์ของสารทั้งหมด 21 ชนิดในตารางที่ 11-17 พบว่าค่า %recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 86.3 – 115.0% (0.5 – 1.5 MRL) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามแนวทางของ CIR 2021/808 (80–120%, ที่ระดับ ≥ 10 $\mu\text{g/kg}$) แสดงว่าวิธีมีความถูกต้อง (accuracy) ที่ดี นอกจากนี้ค่าร้อยละความแปรปรวนสัมพัทธ์ (%CV) ของการทำซ้ำระหว่างวัน (n=3 วัน) อยู่ในช่วง 4.96–13.57% ซึ่งแม้ว่าบางสารมีค่าค่อนข้างสูง เช่น tetracycline ที่ประมาณ 13.57% แต่ยังคงต่ำกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (<15%) และสอดคล้องกับผลของสารอื่น ๆ ที่ส่วนใหญ่มี %CV ต่ำกว่า 10% สะท้อนถึงความแม่นยำและเสถียรภาพของวิธีภายในห้องปฏิบัติการ (within-laboratory reproducibility) ได้อย่างเหมาะสม ขณะเดียวกัน ค่าการตัดสินใจเชิงสถิติ ($CC\alpha$) ที่คำนวณได้สำหรับแต่ละสารตามตารางที่ 18 ยืนยันว่าสารส่วนใหญ่สามารถจัดเป็น วิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ (confirmatory quantitative method) ได้ เนื่องจากผ่านเกณฑ์ทั้งด้านความถูกต้อง ความแม่นยำ และมีค่า $CC\alpha/CC\beta$ ที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม ที่ระดับ 0.1 MRL พบว่าสารบางชนิดไม่เป็นไปตามเกณฑ์ของ trueness และ precision ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดใน CIR 2021/808 ที่ไม่ได้บังคับให้ระดับ 0.1 MRL ต้องผ่าน แต่กำหนดให้ 0.5 MRL เป็นต้นไปเป็นตำแหน่งต่ำสุดที่จำเป็นต้องผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ วิธีจึงยังคงถือว่า ผ่านตามข้อกำหนด และสามารถใช้ผลการทดสอบที่ 0.1 MRL เป็นเพียงการตรวจสอบความไว (sensitivity check) หรือใช้เป็น วิธีคัดกรอง (screening method) ได้ ทั้งนี้ หากสัญญาณมีความเสถียรมีค่าปริมาณไม่แน่นอน อาจจัดเป็น screening แบบกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative) แต่หากค่ามีความแปรปรวนสูงและไม่สามารถตีความเชิงปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือจะจัดเป็น screening เชิงคุณภาพ (qualitative screening)

ตารางที่ 18 $CC\alpha$ ของสารที่มี MRL และ $CC\beta$ ของสารที่ไม่ได้มีการกำหนด MRL ในน้ำมันโคดิบไว้ในปัจจุบัน

No.	Compounds With MRL	MRL ($\mu\text{g/kg}$)	$CC\alpha$ ($\mu\text{g/kg}$)	No.	Compounds No MRL	STC ($\mu\text{g/kg}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g/kg}$)
1	Albendazole	100	117.9	1	Cefradine	10	17.8
2	Chlortetracycline	100	112.9	2	Cephalothrin	10	16.6
3	Ciprofloxacin	100	108.8	3	Nalidixic acid	5	7.9
4	Enrofloxacin	100	107.8	4	Norfloxacin	5	9.0
5	Flumequine	50	56.9	5	Olaquinox	5	6.0
6	Lincomycin	150	184.0	6	Orbifloxacin	10	16.0
7	Marbofloxacin	75	81.6	7	Sulfadiazine	2.5	3.2
8	Oxytetracycline	100	108.0	8	Sulfadoxine	2.5	3.3
9	Sulfadimethoxine	25	30.8	9	Sulfamethoxazole	2.5	3.7
10	Sulfamethazine	25	29.0				
11	Tetracycline	100	121.1				
12	Trimetoprim	50	55.7				

5.4 Robustness

ตารางที่ 19 ผลการทดสอบ Robustness ของ Albendazole โดยใช้การออกแบบแบบ Youden's test

Factor	1	2	3	4	5	6	7	8			สรุป
1. %TCA	A	A	A	A	a	a	a	a	A-a	29.73	29.73
2. ปริมาตร TCA ที่เติม	B	B	b	b	B	B	b	b	B-b	-65.20	65.20
3. ปริมาตร McIlvaine ที่เติม	C	c	C	c	C	c	C	c	C-c	22.29	22.29
4. เวลาในการ shake	D	D	d	d	d	d	D	D	D-d	-55.25	55.25
5. ระยะเวลาในการ centrifuge	E	e	E	e	e	E	e	E	E-e	-22.40	22.40
6. ความเร็วในการ centrifuge	F	f	f	F	F	f	f	F	F-f	-2.22	2.22
7. ปริมาตรการ elute	G	g	g	G	g	G	G	g	G-g	-49.82	49.82
Result	49.42	62.46	92.54	79.56	67.22	44.14	66.00	68.91			
SD	15.41										
root2*SD	21.80										

การทดสอบความทนทานของวิธี (robustness) โดยใช้การออกแบบแบบ Youden's test แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนามีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของบางปัจจัย ยกตัวอย่างกรณีของ Albendazole ในตารางที่ 19 พบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาตร TCA ที่เติม เวลาในการเขย่า (shake) และปริมาตรการ elute ส่งผลต่อค่าผลลัพธ์อย่างมีนัยสำคัญ (เบี่ยงเบนสัมพัทธ์ประมาณ 50–65%) แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเหล่านี้ต้องได้รับการควบคุมอย่างเคร่งครัดในการปฏิบัติจริงเพื่อคงความถูกต้องของผลวิเคราะห์ ขณะที่ปัจจัยอื่น เช่น ความเร็วในการ centrifuge มีผลกระทบน้อยมาก (<5%) บ่งชี้ว่าวิธีมีความเสถียรต่อความแปรปรวนในเงื่อนไขดังกล่าว

ผลการทดสอบในสารตกค้างยาสัตว์อีก 20 ชนิดแสดงแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ วิธีโดยรวมมีความทนทานเพียงพอต่อการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของปัจจัยส่วนใหญ่ แต่ยังคงมีบางตัวแปรหลักที่จำเป็นต้องควบคุมอย่างเข้มงวด เช่น ปริมาตรของตัวทำละลายในการสกัดและเวลาในการเขย่า สอดคล้องกับแนวทางการประเมิน method validation ตาม Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 ที่ระบุว่า การทดสอบความทนทานเป็นขั้นตอนสำคัญในการยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ (confirmatory method)

6. การทดสอบตัวอย่างจริงด้วยวิธีที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

จากผลการวิเคราะห์นํ้านมโคดิบจำนวน 30 ตัวอย่าง ไม่พบว่ามีตัวอย่างใดที่ตรวจพบสารตกค้างยาสัตว์เกินเกณฑ์ CC α ที่ระดับ 1 MRL ของสารตกค้างยาสัตว์ที่มี MRL ทั้ง 12 ชนิด และไม่พบตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด (non-compliant) ที่ระดับ CC β ของสารตกค้างที่ยังไม่กำหนด MRL ทั้ง 9 ชนิดด้วยเช่นกัน แสดงให้เห็นถึงการควบคุมสารตกค้างยาสัตว์ที่ดีของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ และสะท้อนว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในงานตรวจสอบเชิงปฏิบัติการจริงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค LC-MS/MS และทำการทวนสอบวิธีตามเกณฑ์ของ Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 และแนวทางสากลอื่น ๆ ผลการทวนสอบพบว่าวิธีที่พัฒนามีความเป็นเชิงเส้นตรงสูง ($R^2 > 0.997$) สำหรับสารทั้ง 21 ชนิด โดยมีค่า matrix effect ส่วนใหญ่ในลักษณะการกดสัญญาณระดับปานกลางแต่สามารถควบคุมได้เมื่อใช้ calibration curve แบบ matrix-fortified calibration curve ซึ่งให้ความแม่นยำและเสถียรภาพที่ดี trueness และ within-laboratory reproducibility อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (%recovery ประมาณ 86.3 – 115.0% และ %CV ส่วนใหญ่ <15%) และสามารถคำนวณค่า $CC\alpha$ ได้อย่างเหมาะสมตามกรอบ confirmatory method รวมถึง $CC\beta$ สำหรับการคัดกรองแบบ screening ผลการทดสอบความทนทาน (robustness) แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขเล็กน้อยในหลายปัจจัย แต่ต้องควบคุมปัจจัยหลักบางประการ เช่น ปริมาตรสารสกัดและเวลาในการเขย่า อย่างเคร่งครัดเพื่อคงคุณภาพของวิธี

เมื่อประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์นํ้านมโคดิบจำนวน 30 ตัวอย่าง ไม่พบตัวอย่างใดที่มีผล non-compliant ที่ระดับ $CC\alpha$ และ $CC\beta$ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการใช้งานจริงในห้องปฏิบัติการเพื่อการเฝ้าระวังและควบคุมคุณภาพนํ้านมโคดิบ ทั้งนี้ วิธีนี้มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็น quantitative confirmatory method สำหรับยาสัตว์ตกค้างที่มี MRL จำนวน 12 ชนิด และเป็น semi-quantitative screening method สำหรับยาสัตว์ตกค้าง 9 ชนิดที่ยังไม่มีการกำหนดค่า MRL มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และสอดคล้องกับข้อกำหนดสากลสำหรับการตรวจสอบสารตกค้างยาสัตว์ในนํ้านมโคดิบ

ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นจะแสดงให้เห็นถึงความถูกต้อง ความแม่นยำ และความน่าเชื่อถือที่เพียงพอต่อการใช้เป็น quantitative confirmatory method แล้ว แต่ยังสามารถพัฒนาต่อยอดได้ในอนาคต เช่น การเพิ่มการประเมินค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) โดยอ้างอิงจากอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N) ตลอดจนการขยายการทวนสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับต่ำกว่า 0.5 MRL เพื่อเสริมศักยภาพของวิธีในการตรวจสอบสารตกค้างยาสัตว์ในระดับที่ต่ำยิ่งขึ้น การพัฒนาต่อยอดดังกล่าวจะช่วยเพิ่มความครอบคลุมและความมั่นใจในการประยุกต์ใช้วิธีในงานเฝ้าระวังด้านความปลอดภัยอาหารในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน สัตวแพทย์หญิงเนาวรัตน์ กำภูศิริ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่ให้การอนุเคราะห์ตัวอย่างนํ้านมโคดิบในการตรวจวิเคราะห์ และบุคลากรงานพัฒนา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบด้านการปศุสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. (2550). *ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง*. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 108 ง (4 กันยายน 2550).
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2553). มาตรฐานสินค้าเกษตร: นํ้านมโคดิบ (มกษ. 6003-2553) [Thai Agricultural Standard: Raw Cow Milk (TAS 6003-2010)]. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Alija, G., Hajrulai-Musliu, Z., & Uzunov, R. (2020). Development and validation of confirmatory LC–MS/MS method for multi-residue analysis of antibiotic drugs in bovine milk. *SN Applied Sciences*, 2(9), Article 9. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03361-2>
- Bion, C., Beck Henzelin, A., Qu, Y., Pizzocri, G., Bolzoni, G., & Buffoli, E. (2015). Analysis of 27 antibiotic residues in raw cow's milk and milk-based products – validation of Delvotest® T. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1104731>
- Clark, S. B., Storey, J. M., & Turnipseed, S. B. (2011). Optimization and Validation of a Multiclass Screening and Confirmation Method for Drug Residues in Milk Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 94(2), Article 2. <https://doi.org/10.1093/jaoac/94.2.383>
- Codex Alimentarius Commission. (2024). *Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods (CXM 2-2024)*. FAO/WHO.
- European Commission. (2010). 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, 1–72.
- European Commission. (2021). Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Union, L180, 84–109.
- Guo, X., Tian, H., Yang, F., Fan, S., Zhang, J., Ma, J., Ai, L., & Zhang, Y. (2022). Rapid determination of 103 common veterinary drug residues in milk and dairy products by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Frontiers in Nutrition*, 9, 879518. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.879518>
- Hajrulai-Musliu, Z., Uzunov, R., Jovanov, S., Kerluku, M., Jankuloski, D., Stojkovski, V., Pendovski, L., & Sasanya, J. J. (2022). Determination of veterinary drug residues, mycotoxins, and pesticide residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ionisation –tandem mass

- spectrometry. *Journal of Veterinary Research*, 66(2), Article 2. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0027>
- Imamoglu, H., & Oktem Olgun, E. (2016). Analysis of Veterinary Drug and Pesticide Residues Using the Ethyl Acetate Multiclass/Multiresidue Method in Milk by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/2170165>
- Islas, G., Ibarra, I. S., Hernandez, P., Miranda, J. M., & Cepeda, A. (2017). Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2017/8215271>
- Koloka, O., Koulama, M., Hela, D., Albanis, T., & Konstantinou, I. (2023). Determination of Multiclass Pharmaceutical Residues in Milk Using Modified QuEChERS and Liquid-Chromatography-Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometry: Comparison of Clean-Up Approaches and Validation Studies. *Molecules*, 28(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/molecules28166130>
- Li, X., Xu, C., Liang, B., Kastelic, J. P., Han, B., Tong, X., & Gao, J. (2023). Alternatives to antibiotics for treatment of mastitis in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1160350. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1160350>
- Linehan, K., Patangia, D., Ross, R., & Stanton, C. (2024). Production, Composition and Nutritional Properties of Organic Milk: A Critical Review. *Foods*, 13(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/foods13040550>
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- Navrátilová, P. (2008). Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk—A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(6), Article 6. <https://doi.org/10.17221/2438-CJFS>
- Özdemir, Z., & Traş, B. (2018). İlaçların Sütteki Davranışları—Derleme. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.319443>

- Rajala-Schultz, P., Nødtvedt, A., Halasa, T., & Persson Waller, K. (2021). Prudent Use of Antibiotics in Dairy Cows: The Nordic Approach to Udder Health. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 623998. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623998>
- Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M., & Hussani, S. (2019). Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f350>
- Terashi, Y., Hirata, Y., & Asai, T. (2023). Antimicrobial usage surveys using electronic medical records in cattle practice in Gifu Prefecture. *Journal of Veterinary Medical Science*, 85(10), Article 10. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0233>
- Tomanić, D., Samardžija, M., & Kovačević, Z. (2023). Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review. *Antibiotics*, 12(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040683>
- Turnipseed, S. B., Andersen, W. C., Karbiwnyk, C. M., Madson, M. R., & Miller, K. E. (2008). Multi-class, multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry screening and confirmation methods for drug residues in milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(10), Article 10. <https://doi.org/10.1002/rcm.3532>