

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มา

Enrofloxacin เป็นยาปฏิชีวนะ กลุ่ม Quinolones ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายในสัตว์ที่เลี้ยงไว้เพื่อจำหน่ายเป็นอาหารสำหรับมนุษย์ พบได้ในหมู วัว ไก่ ปลา และกุ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่และไข่ซึ่งมีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด หากมียาปฏิชีวนะปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบย่อมส่งผลให้อาหารเหล่านั้นไม่มีคุณภาพ และส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ผู้บริโภคด้วย เช่น ทำให้เกิดการแพ้ ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์ด้วยยาปฏิชีวนะเดิมไม่ได้ผล เนื่องจากการดื้อยาของจุลชีพ เป็นต้น ผลกระทบด้านเศรษฐกิจ เช่น สินค้าส่งออกประเภทเนื้อไก่และไข่ ที่ส่งไปยังประเทศในกลุ่มยุโรป จะต้องถูกตรวจสอบและประเมินปริมาณสารตกค้างชนิดต่างๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะด้วย การตรวจสอบสารตกค้างของยา enrofloxacin ในผลิตภัณฑ์อาหารโดยปกติจะใช้ Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง (6-10 ล้านบาท) ทำให้เป็นข้อจำกัดของหน่วยงานภาครัฐ เช่น ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ในต่างจังหวัดไม่สามารถจัดหาได้ อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง เช่น ค่า แก๊สใน โตรเจน ที่ใช้กับ LC-MS มีราคาสูงมากต่อ 1 ตัวอย่าง จึงเห็นสมควรที่จะมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ ง่าย สะดวก ราคาถูกและรวดเร็วกว่า และถ่ายทอดวิธีการตรวจสอบดังกล่าวให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของยา enrofloxacin เบื้องต้น (screening test) นอกจากนี้ยังเป็นการศึกษาถึงคุณภาพและการปนเปื้อนของ

ของยาปฏิชีวนะดังกล่าวในเนื้อไก่และไข่ที่จำหน่ายในท้องตลาด เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคภายในประเทศ และใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นประกอบการส่งเสริมการส่งออก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการตรวจสอบเบื้องต้น (Screening test) ในการหาปริมาณ enrofloxacin ในเนื้อไก่และไข่

2. นำวิธีที่พัฒนามาศึกษาการปนเปื้อนของ enrofloxacin ในตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ที่

จำหน่ายในท้องตลาดของกรุงเทพมหานคร

3. ถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวให้กับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และหน่วยงานอื่นของรัฐ และ เอกชนที่เกี่ยวข้อง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. การตีพิมพ์ผลงานในวารสาร และการเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ

2. การถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวให้กับหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้อง

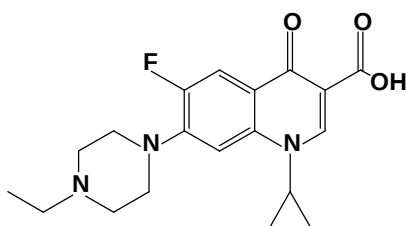
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นประกอบการส่งเสริมการส่งออกซึ่งจะเพิ่มความมั่นใจของผู้บริโภคเนื้อไก่และไข่ในกรณีที่ตรวจไม่พบสารตกค้าง

4. กระตุ้นให้หน่วยงานของรัฐที่เกี่ยวข้องและเกษตรกรแก้ไขปัญหาในกรณีที่ตรวจพบสารตกค้าง

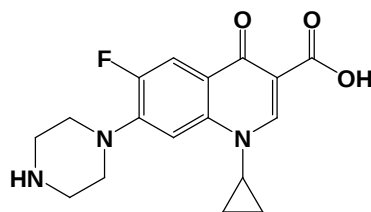
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

Enrofloxacin เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่ม Quinolones ซึ่งได้รับการพัฒนามาจาก nalidixic acid ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, *Chlamydia*, *Legionella* และ *Brucella* โดยยับยั้งการสร้าง topoisomerase II (DNA gyrase) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกระบวนการสร้างดีเอ็นเอและยังยับยั้ง topoisomerase IV ในแบคทีเรียแกรมบวก ยานี้เป็นพิษต่อมนุษย์ จึงให้ใช้สำหรับสัตว์เท่านั้น(1) enrofloxacin มี metabolites หลัก ได้แก่ enrofloxacin glucuronide และ ciprofloxacin (2) โครงสร้างยา enrofloxacin และ ciprofloxacin (metabolite) แสดงดังรูปที่ 1 และ 2



รูปที่ 1 โครงสร้างยา enrofloxacin



รูปที่ 2 โครงสร้างยา ciprofloxacin (metabolite)

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของยา enrofloxacin

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสง ultraviolet enrofloxacin มีค่าการดูดกลืนสูงสุดที่ความยาวคลื่นต่างกันในแต่ละตัวทำละลาย เช่น ใน acetate buffer มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 276 และ 318 nm ส่วน ในสารละลาย ethanol และ methanol มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากันที่ 280 และ 322 nm และค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวทำละลายก็มีผลต่อการดูดกลืนแสงโดย ช่วง pH 2.8 – 8.8 จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดระหว่าง 276 – 270 nm และ 314 – 322 nm เป็นต้น (3)

คุณสมบัติในการเรืองแสง fluorescence ที่ pH 6.8 สารจะ emission สูงสุดที่ความยาวคลื่น 439 nm และ excitation ที่ 315 nm

Enrofloxacin มีได้ 4 รูปแบบ ได้แก่ acidic cation, neutral unionized species, intermediate zwitterion และ basic ion ซึ่งขึ้นอยู่กับช่วงความเป็นกรดต่างโดยมีค่า pKa1 เท่ากับ 5.94 และ pKa2 เท่ากับ 8.70

การละลายของยา enrofloxacin ขึ้นกับค่าความเป็นกรดต่าง ค่าการละลายสูงสุดอยู่ที่ pH 5.02 และสามารถเพิ่มการละลายใน acetate buffer ได้โดยการเพิ่มความเข้มข้น เมื่อ acetate buffer มีความเข้มข้น 1.178 M สามารถละลายยาได้มากถึง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การใช้ยา enrofloxacin และผลกระทบของการใช้ยาในสัตว์ปีก

ยา enrofloxacin มีการใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 โดยการรับรองของคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาเพื่อใช้ลดอัตราการตายของไก่และไก่งวงซึ่งเป็นโรคติดเชื้อจุลชีพ *Escherichia coli* และ *Pasteurella multocida* โดยจำกัดให้ใช้เฉพาะเมื่อมีความจำเป็นในการรักษาโรคเท่านั้น การใช้ยาในไก่นั้นจะให้ผสมกับน้ำกินภายในโรงเรือนซึ่งการใช้ยาในลักษณะนี้จะทำให้สัตว์อื่นซึ่งไม่ได้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพด้วย ปัจจุบันได้มีการถอนการใช้ยาในการใช้สำหรับสัตว์ปีกเนื่องจากส่งผลกระทบด้านสุขภาพต่อมนุษย์ ก็ทำให้การดื้อยาของกลุ่ม Fluoroquinolones ต่อเชื้อ *Campylobacter* ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในไก่และไก่งวง เชื้อ *Campylobacter* เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ และเชื้อ *Campylobacter* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม Fluoroquinolones สามารถเจริญเติบโตในลำไส้ของสัตว์ปีกได้โดยอาจไม่ทำให้สัตว์ป่วย แต่อาจแพร่กระจายไปตามบริเวณเพาะเลี้ยงสัตว์รวมถึงโรงฆ่าสัตว์ด้วย เมื่อส่งผ่านมาถึงคนก็ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่มนี้ในคนด้วย (4) และยังทำให้เกิดการแพ้มากขึ้น ทำให้อัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นอันเนื่องมาจากการดื้อยาของเชื้อจุลชีพ (5)

Maximum residue limit (MRLs)

กลุ่มสหภาพยุโรป (EU) ได้กำหนดเกณฑ์การยอมรับสูงสุดของยา enrofloxacin ในสัตว์ปีก

(6) วัสดุรายละเอียดใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์การยอมรับสูงสุดของยา enrofloxacin ในสัตว์ปีก

ชื่อสาร	ชื่อสารตกค้าง	ชื่อสัตว์	ปริมาณที่ยอมรับได้ MRLs (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ชนิดของเนื้อเยื่อ
Enrofloxacin	Enrofloxacin	สัตว์ปีก	100	กล้ามเนื้อ
	และ		100	หนังและไขมัน
	ciprofloxacin		200	ตับ
			300	ไต
หมายเหตุ	ห้ามใช้ในสัตว์ที่เลี้ยงไว้กินไข่			

วิธีการตรวจยา enrofloxacin ตกค้างในสัตว์ปีก

จากผลกระทบจากการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ที่เลี้ยงไว้เป็นอาหารซึ่งมีการรายงานไว้โดย Tollefson L and Karp BE (4) ได้แก่ ทำให้เกิดการแพ้มากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้อัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นอันเนื่องมาจากการดื้อยาของเชื้อจุลชีพ ทำให้หลายหน่วยงานในหลายประเทศตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และอาหารที่ปรุงจากเนื้อสัตว์ ตัวอย่างเช่น ประเทศในกลุ่มยุโรป ได้แก่ European Union Council Directive 96/23/EC ได้กำหนดมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนกลุ่มยาปฏิชีวนะด้วยเครื่องมือต่างๆ ไว้เป็นแนวทางแก่ประเทศสมาชิก และประเทศอื่นๆ (7)

Hoof VN และคณะ (8) ได้รายงานการตรวจวิเคราะห์ยาต้านจุลชีพกลุ่ม quinolone รวมทั้ง enrofloxacin ในเนื้อหมูและนมด้วยวิธี LC-MS (ESI) พบว่าเป็นวิธีที่ดีเนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่วิเคราะห์และสามารถวิเคราะห์สารในระดับความเข้มข้นต่ำได้

Clemente M และคณะ (9) ได้รายงานการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และ ปริมาณของยากลุ่ม quinolone รวมทั้ง enrofloxacin ในเนื้อไก่ด้วยวิธี HPLC LC-MS และ LC-MS/MS

ปัจจุบันการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนยา enrofloxacin สามารถใช้วิธีการทดสอบทางจุลชีววิทยา ซึ่งมีความไวเท่ากับ 87% อาศัยหลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่สามารถตรวจในระดับต่ำได้ (10) โดยสามารถใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ ชีวรั่ว และปัสสาวะ ข้อจำกัดของวิธีนี้คือมีความยุ่งยากในการเตรียมอุปกรณ์สำหรับทดสอบ และเสียค่าใช้จ่ายมากในการครอบครองเชื้อแบคทีเรีย อีกทั้งยังมีความไวในการทดสอบต่ำด้วย นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธี enzyme immunoassay (11-12) ซึ่งมีความไวประมาณ 100 – 200 ppb ทั้งนี้ European Union ได้กำหนดเกณฑ์การยอมรับสำหรับปริมาณ enrofloxacin ตกค้างในเนื้อสัตว์ไว้เท่ากับ 100 ppb ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ มีอายุการใช้งานจำกัด จึงทำให้มีราคาแพง และต้องใช้เครื่องมือเฉพาะสำหรับอ่านผลด้วย งานวิจัยนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อพัฒนาวิธีคัดกรองการปนเปื้อนของยา enrofloxacin โดยวิธีโครมาโตกราฟีแนวราบ ซึ่งสามารถแยกสารดังกล่าวออกจากสารอื่นที่ผสมอยู่พร้อมทั้งตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารได้ นอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดสารออกจากตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่โดยวิธี solid phase extraction ซึ่งช่วยเพิ่มความเข้มข้นของ enrofloxacin ที่สกัดจากสารตัวอย่าง ทำให้วิธีตรวจคัดกรองมีความ แม่นยำมากขึ้น

บทที่ 3

วิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ

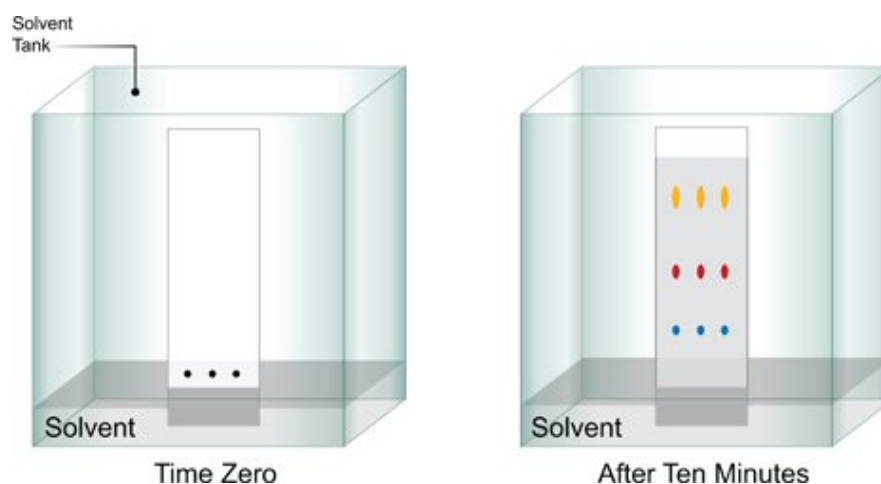
โครมาโทกราฟีแนวราบ (high performance thin layer chromatography) เป็นวิธีการแยกสารที่อาศัยหลักการทาง chromatography ที่ใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาวิจัยด้านต่างๆ โดยเฉพาะในการพิสูจน์เอกลักษณ์ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ วิธีนี้ได้รับความนิยมเนื่องจากความง่ายและสะดวกในการใช้งาน ค่าใช้จ่ายของวิธีโดยรวมค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับวิธีวิเคราะห์อื่นๆ การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้สารตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อย และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้พร้อมกันที่หลายตัวอย่าง นอกจากนี้ยังให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ (13)

โครมาโทกราฟีแนวราบจัดเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในสารตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีนี้เป็นที่นิยมแพร่หลายในการตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากแหล่งต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดหายากจากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ในงานควบคุมคุณภาพยา อาหาร ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ และยังสามารถนำมาใช้เป็นวิธีในการตรวจพิสูจน์เบื้องต้นในงานต่างๆ อาทิ เช่น การตรวจหาสารเจือปน การตรวจหาสารเสพติดและสารพิษในสิ่งแวดล้อมและชีววัตถุ เป็นต้น

หลักการแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ

โครมาโทกราฟีแนวราบเป็นวิธีที่ใช้สำหรับแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดในสารตัวอย่างออกจากกันบนแผ่นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ที่เคลือบอยู่บนวัสดุรองรับที่เป็นแผ่นระนาบ อาจ

เป็นแผ่นแก้ว แผ่นอะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก โดยการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมในการนำพาสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่นวัฏภาคคงที่และทำให้เกิดการแยกสารออกจากกัน



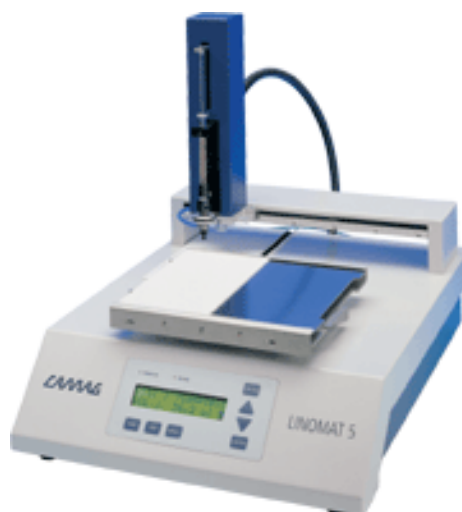
รูปที่ 3 การแยกสารโดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟีแนวราบ

ส่วนประกอบของเครื่องมือ

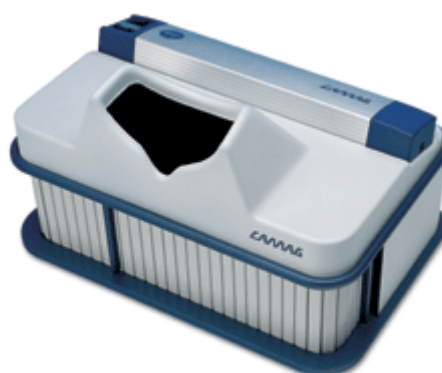
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ ได้แก่ HPTLC plate, developing chamber (รูปที่ 4), เครื่องจุดสารละลาย (รูปที่ 5) และเครื่องส่องแสง ultraviolet (รูปที่ 6)



รูปที่ 4 Developing chamber



รูปที่ 5 เครื่องจุดสารละลาย



รูปที่ 6 เครื่องส่องแสง ultraviolet

สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ไปบนวัฏภาคคงที่เป็นระยะทางมากน้อยแตกต่างกันขึ้นกับคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของสาร ชนิดของวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยตำแหน่งที่ปรากฏของสารแต่ละจุดแสดงได้ด้วยค่า Rf ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}$$

โดยทั่วไปแล้วสารที่มีสัมพรรคภาพ (affinity) ดี กับวัฏภาคเคลื่อนที่ จะสามารถเคลื่อนที่ไปบนแผ่นวัฏภาคคงที่ได้ไกลกว่าสารที่มีสัมพรรคภาพต่ำ อันตรกิริยาระหว่างสารแต่ละชนิดกับวัฏภาคคงที่มีผลต่อการแยกสารออกจากกันเช่นกัน สารที่มีแรงในการดูดซับบนวัฏภาคคงที่สูงจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางน้อยกว่าสารที่เกิดการดูดซับได้น้อย

การวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ

วิธีโครมาโทกราฟีแนวราบเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถ นำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพยาทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ วิธีนี้มีข้อดี คือ ราคาไม่แพง สามารถจัดทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก เครื่องมือที่ใช้ไม่ยุ่งยากและไม่ต้องการการบำรุงรักษามากเท่าเครื่องมือชนิดอื่น ตำรายาของประเทศต่างๆ ยังคงมีการใช้โครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์และทดสอบความบริสุทธิ์ของยาและเภสัชภัณฑ์หลายตำรับ การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบต้องมีจุดหรือแถบของสารมาตรฐานที่ใช้เป็นสารอ้างอิง เทียบกับจุดสารตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์และดูผลโครมาโทแกรมเปรียบเทียบค่า ขนาด รูปร่างและสีของจุดหรือแถบต่างๆ ที่ปรากฏบนแผ่นวัฏภาคคงที่ ภายหลังการตรวจพบด้วยวิธีทางกายภาพหรือทางเคมี หากสารตัวอย่างและสารมาตรฐานเป็นสารชนิดเดียวกัน ค่า Rf และลักษณะต่างๆ ที่ตรวจพบของสารทั้งสองต้องเหมือนกัน

การประยุกต์ใช้ในงานด้านการตรวจสอบสารตกค้างในเนื้อสัตว์

อาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร อาจพบว่ามีสารปนเปื้อนของสารต่างๆ โดยเฉพาะยาและเคมีภัณฑ์ที่ไม่ควรอยู่ในผลิตภัณฑ์นั้นๆ เนื่องจากในปัจจุบัน ฟาร์มสัตว์ที่เลี้ยงไว้เป็นอาหาร มักใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโตและยาต้านจุลชีพเพื่อป้องกันและรักษาโรค ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ การตรวจหาสารเจือปนในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร จึงจำเป็นสำหรับการ

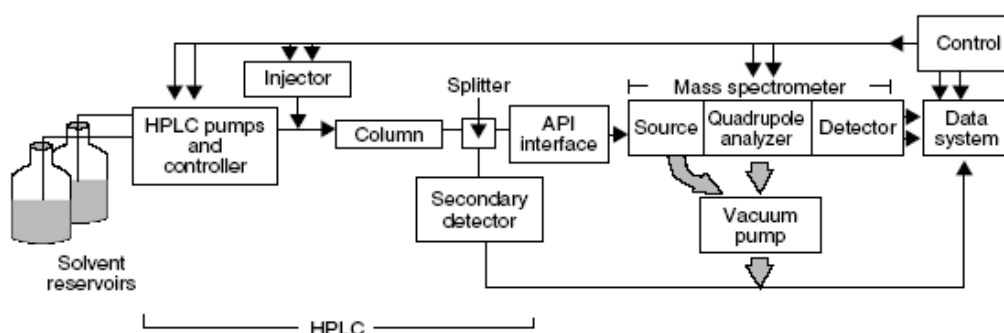
ควบคุมคุณภาพและการติดตามเฝ้าระวังการปนเปื้อนหรือตกค้างในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว การใช้วิธีโครมาโทกราฟีแนวราบในการตรวจคัดกรองเบื้องต้นจะช่วยลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาโดยรวมในการตรวจวิเคราะห์หลังได้ ตัวอย่างใดที่ปรากฏการปนเปื้อนหรือเข้าข่ายน่าสงสัยควรนำส่งต่อเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารปนเปื้อนด้วยเทคนิคขั้นสูงต่อไป Quinolones เป็นยาต้านจุลชีพที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ปีกและหมู มีการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนยาในเนื้อหมูด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบโดยใช้ terbium chloride ในการตรวจพบซึ่งช่วยเพิ่มความไวในการตรวจพบได้ถึงระดับไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการตรวจหาสารปนเปื้อนในอาหารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ คือ การเตรียมตัวอย่าง เนื่องจากเนื้อสัตว์มีส่วนประกอบหลากหลาย จึงมักมีการใช้ SPE ที่เหมาะสมในการสกัดขั้นสุดท้ายเพื่อให้ตัวอย่างมีความสะอาดมากขึ้นและมีความเข้มข้นสูงขึ้น หากมีการเตรียมตัวอย่างไม่เหมาะสม อาจไม่สามารถตรวจเจอสารปนเปื้อนได้ เนื่องจากมีความเข้มข้นในตัวอย่างต่ำกว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้

บทที่ 4

วิธีลิวิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี

หลักการ

LC-MS เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อกับตัวตรวจวัดชนิด Mass Spectrometer ในส่วนของ LC ก็ใช้หลักการแยกสารที่อยู่ในสถานะของเหลวโดยใช้หลักการโครมาโทกราฟี ซึ่งประกอบด้วย HPLC pumping system, injector, and column ต่อกับส่วน Interface จะเชื่อมต่อระหว่างเครื่อง LC กับเครื่อง Mass Spectrometer (MS) ทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็นไอออนก่อนที่จะเข้าไปยัง analyzer และ detector ของ Mass Spectrometer แล้วให้ผลการตรวจวัดออกมาเป็น Total ion chromatogram (TIC) และ molecular weights ของสาร ส่วนประกอบของเครื่อง LC-MS (14) แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ส่วนประกอบของเครื่อง LC-MS

ส่วนประกอบของเครื่องมือ

1. Pump ทำหน้าที่ดันสารละลายตัวพา (mobile phase) ให้พาดวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ ยังสามารถเลือกใช้งาน pump ได้หลายชนิด ขึ้นกับอัตราส่วนสารละลายตัวพาระหว่างการวิเคราะห์ เช่น isocratic pump สำหรับสารละลายตัวพา 1 ตัวที่อัตราส่วนผสมคงที่ตลอดการวิเคราะห์ ส่วน binary pump ternary pump หรือ quaternary pump สำหรับสารละลายตัวพา 2, 3, 4 ตัว ตามลำดับ
2. คอลัมน์ ทำหน้าที่ในการแยกสาร เลือกใช้ตามความเหมาะสมโดยเทคนิค HPLC
3. Interface จะเชื่อมต่อระหว่างเครื่อง LC กับเครื่อง MS ทำหน้าที่ให้โมเลกุลของสารในสภาพสารละลายแตกตัวเป็นไอออนก่อนที่จะเข้าไปยัง MS ระบบของ Interface จึงเป็นหัวใจสำคัญสำหรับเทคนิค LC-MS ซึ่งปัจจุบันระบบ interface ที่นิยมใช้กับ LC คือ Atmospheric Pressure Ionization ได้แก่ Electrospray Ionization (ESI) และ Atmospheric Pressure Chemical Ionization สำหรับกระบวนการเกิด Electrospray Ionization สารละลายตัวอย่างถูกพ่นออกจากปลาย capillary ของ ESI probe เป็นลักษณะละอองหยดขนาดใหญ่ ที่ส่วนปลายของ capillary มีการให้ค่าศักย์ไฟฟ้าสูงประมาณ 3-5 KV ก่อให้เกิดสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูงซึ่งมีผลทำให้ตัวทำละลายถูกสเปรย์จากปลายของ capillary และเนื่องจากตามแนวความยาวของ capillary มีแก๊สไนโตรเจน ซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งตัวช่วยในการสเปรย์สารละลาย และทำหน้าที่ช่วยระเหยตัวทำละลายออกจากหยดของสารตัวอย่าง ทำให้หยดสารละลายขนาดใหญ่มีขนาดเล็กลงเนื่องจากตัวทำละลายถูกระเหยออกไป จึงมีผลทำให้ความเข้มประจุเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ประจุจึงเคลื่อนที่มาอยู่บริเวณผิวหน้าและในที่สุดเกิดการแตกตัวเป็นไอออนระเหยเข้าสู่ ส่วน analyzer รูปที่ 8 แสดงส่วนประกอบเครื่อง LC/MS และ Interface (ชนิด ESI)

4. Analyzer ได้แก่ quadrupole และ time-of-flight ซึ่งเป็นส่วนที่คัดเลือกไอออนของสารจากสัญญาณที่เป็นคลื่นวิทยุซึ่งจะแตกต่างกันตามขนาดไอออน ลำเลียงไปยังตัวตรวจวัด
5. Detector เป็นหน่วยตรวจนับสัญญาณแล้วรายงานผลผ่านคอมพิวเตอร์



LCMS-2010EV + DUIS-2010

(A)



DUIS-2010

(B)

รูปที่ 8 เครื่องมือ LC/MS (A) และ Interface ชนิด ESI (B)

การประยุกต์ใช้ในงานด้านการตรวจสอบตกค้างในเนื้อสัตว์

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค LC/MS มาใช้ในงานวิเคราะห์สารตกค้างในเนื้อสัตว์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ในระดับต่ำและสามารถตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้โดยสามารถบ่งชี้โครงสร้างของสารนั้นๆจึงนำมาใช้เป็น confirmatory method สำหรับงานด้านการตรวจสอบตกค้างในเนื้อสัตว์ ได้มีผู้พัฒนาวิธี LC/MS เพื่อใช้ในการตรวจยาากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนส์ตกค้างในเนื้อสัตว์ (15) ทั้งนี้มีพัฒนาในส่วนเครื่องมือส่วนต่างๆ เช่น Interface (electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization , atmospheric pressure photoionization), analyzer (quadrupole, ion trap, time-of-flight) เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง เช่น liquid liquid extraction, liquid solid extraction ร่วมกับการใช้ solid phase extraction เป็นต้น

บทที่ 5

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

5.1 ตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่

5.1.1 การคัดเลือกตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ที่ใช้ในการศึกษาการปนเปื้อนยา enrofloxacin ในเนื้อไก่ส่วนกล้ามเนื้ออก 500 กรัม เท่านั้น และไข่ไก่ จำนวน 10 – 20 ฟอง ซึ่งเป็นวัตถุดิบจากแหล่งวัตถุดิบ 3 ประเภท (16) ได้แก่

ตลาดประเภทที่ 1 ได้แก่ ตลาดที่มีโครงสร้างอาคารและดำเนินการเป็นการประจำหรืออย่างน้อยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ได้แก่ ห้างสรรพสินค้า

ตลาดประเภทที่ 2 ได้แก่ ตลาดที่ไม่มีโครงสร้างอาคารและดำเนินการเป็นการประจำหรืออย่างน้อยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ได้แก่ ตลาดสดขนาดเล็กถึงใหญ่

ตลาดประเภทที่ 3 ได้แก่ ตลาดที่ไม่มีโครงสร้างอาคารและดำเนินการชั่วคราวหรือเป็นครั้งคราวหรือตามวันที่กำหนด ได้แก่ ตลาดสดและร้านชำขนาดเล็ก

5.1.2 จำนวนประชากร

ปริมาณตัวอย่างที่สุ่มแสดงดังตารางที่ 2 และรายชื่อแหล่งวัตถุดิบที่ได้สุ่มตัวอย่างดูภาคผนวก ข

ตารางที่ 2 จำนวนประชากรที่ทำการศึกษา

ชนิดตัวอย่าง	แหล่งวัตถุดิบ			รวม
	ห้างสรรพสินค้า	ตลาดสด	ตลาดนัด	
เนื้อไก่	27	32	57	116
ไข่ไก่	5	40	17	62

การเก็บรักษาตัวอย่าง เก็บในถุงพลาสติกสองชั้นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5.1.3 การสุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างถูกสุ่มจากแหล่งวัตถุดิบประเภทต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัด
ปริมณฑลตามรายการในภาคผนวก ข โดยผู้ช่วยวิจัยเป็นผู้สุ่มตัวอย่างซึ่งจะสุ่มตัวอย่างเนื้อไก่ส่วน
ออกจำนวนประมาณ 500 กรัมใส่ในถุงพลาสติกปิดมิดชิดสองชั้นและสุ่มตัวอย่างไข่ไก่จำนวน 10 –
20 ฟองใส่ในถุงพลาสติก และจัดเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

5.2 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

5.2.1 สารเคมี

Ammonium acetate AR	Ajax Finechem, Australia
Acetonitrile HPLC grade	Lab-Scan Analytical Sciences, Thailand
Acetic acid AR	Lab-Scan Analytical Sciences, Thailand
25% Ammonia solution	Carlo erba, Italy
Enrofloxacin standard	Xinchang, China

Ciprofloxacin hydrochloride	Zhejiang guobang pharmaceutical co.,Ltd., China
Trifluoroacetic acid AR	Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, Germany
Methanol AR	Lab-Scan Analytical Sciences, Thailand
Methylene chloride AR	Lab-Scan Analytical Sciences, Thailand

5.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

Analytical balance	AL204, Mettler Toledo
Centrifuge	Labofuge200, Heraeus
Densitometer	Camag, Linomat5, TLC scanner
Liquid Chromatography Mass Spectrometer	LC-10ADVB (pump), DGU-12AM (degasser), SCL-10AVP (system controller), LCMS-2010IV (LCMS), Shimadzu, Japan
HPTLC aluminum sheets Silica gel 60F 254	Merck, Germany
Nylon filter 0.2 mm, 13 and 46 mm in diameter	National Scientific, UK
Sep pack Vac 500 mg 3cc	Water, America

5.3 วิธีดำเนินการวิจัย

5.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

5.3.2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่

1. ปั่นตัวอย่างเนื้อไก่ 500 กรัม ให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างจำนวน 20 กรัม ใส่ลงใน flask
2. เติม 0.1% trifluoroacetic acid ใน methanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
3. เขย่านาน 30 นาที กรองเอาสารละลายใส่ใน centrifuge tube
4. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 10,000g นาน 10 นาที ถ่ายสารละลายใส่ส่วนบน ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงอีกหลอดหนึ่ง เติม sodium sulphate anhydrous 2 กรัม และปั่นผสมให้เข้ากัน
5. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 10,000g นาน 10 นาที
6. Pipet สารสกัดใส่ส่วนบนปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดระเหย
7. ระเหยสารสกัดให้แห้งโดยวางบนอ่างน้ำอุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส และแก๊สไนโตรเจน
8. เมื่อสารสกัดแห้งแล้วเติม 0.1% trifluoroacetic acid ในน้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารสกัดที่ได้ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น
9. สกัดให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์ขึ้น (clean up) โดย Sep-Pak C₁₈ ซึ่งได้ precondition โดยผ่าน methanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สกัดสารตัวอย่างด้วย 0.1% trifluoroacetic acid ใน acetonitrile 1.5 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร acetonitrile
10. ระเหยแห้งสารสกัดที่ผ่าน Sep-Pak C₁₈ โดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน
11. เติม 0.1% trifluoroacetic acid ใน methanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายสารสกัดที่ได้และนำไปตรวจคัดกรองด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบราบ

5.3.2.1 การเตรียมตัวอย่างไข่ไก่

1. ปั่นตัวอย่างไข่ไก่ให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างจำนวน 30 กรัม ใส่ลงใน flask
2. เติม 0.75 M sodium hydroxide ใน acetonitrile ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
3. เขย่านาน 30 นาที กรองเอาสารละลายใส่ใน centrifuge tube
4. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 10,000g นาน 10 นาที ถ่ายสารละลายใสส่วนบน ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงอีกหลอดหนึ่ง เติม sodium sulphate anhydrous 2 กรัม และปั่นผสมให้เข้ากัน
5. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 10,000g นาน 10 นาที
6. Pipet สารสกัดใสส่วนบนปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดระเหย
7. ระเหยสารสกัดให้แห้งโดยวางบนอ่างน้ำอุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส และแก๊สไนโตรเจน
8. เมื่อสารสกัดแห้งแล้วเติม 0.1% trifluoroacetic acid ในน้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารสกัดที่ได้ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น
9. สกัดให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์ขึ้น (Clean up) โดย Sep-Pak C₁₈ ซึ่งได้ precondition โดยผ่าน methanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สกัดสารตัวอย่างด้วย 0.1% trifluoroacetic acid ใน acetonitrile 1.5 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร
10. ระเหยแห้งสารสกัดที่ผ่าน Sep-Pak C₁₈ โดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน
11. เติม 0.1% trifluoroacetic acid ใน methanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายสารสกัดที่ได้และนำไปตรวจคัดกรองด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ

5.3.2 การตรวจคัดกรองยาต้านจุลชีพ enrofloxacin ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ

วิธีตรวจคัดกรองนี้ใช้สำหรับตรวจหาต้านจุลชีพ enrofloxacin ตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่ (ส่วนอก) โดยสกัดแยกสารออกจากตัวอย่างด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม และตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ (HPTLC) ซึ่งสามารถตรวจคัดกรองสาร (screening test) ที่ระดับความไวรับ (detection limit) เท่ากับ 100 µg/kg ซึ่งเป็นปริมาณยาสูงสุดที่รองรับได้ (MRL; Maximum Residue Limit) วิธีการตรวจคัดกรองมีวิธีดังนี้

5.3.3 การตรวจคัดกรองด้วยโครมาโทกราฟีแนวราบ (HPTLC) มีระบบดังนี้

วัฏภาคคงที่: HPTLC Si 60 F 254

วัฏภาคเคลื่อนที่: propanol: methanol : 25% ammonia 5:5:2

ปริมาตรสาร: 10 ไมโครลิตร

ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่: 75 มิลลิเมตร

การตรวจวัด: การเรืองแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

การอ่านผล: แถบสารเรืองแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ที่ได้จากสารสกัด

ตัวอย่างจะต้องมีความเข้มข้นไม่เกินกว่าความเข้มข้นของแถบสารที่ได้จากสารมาตรฐาน

การพัฒนาระบบวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับการตรวจคัดกรองด้วยโครมาโทกราฟีแนวราบ (HPTLC) ขึ้นหลายระบบ ซึ่งสามารถเลือกนำมาใช้ได้ ระบบดังกล่าวได้แก่

1. CH₂Cl₂ : methanol : 25% NH₄OH : acetonitrile (4:4:2:1)
2. CH₂Cl₂ : ethanol : 25% NH₄OH (2:2:1)
3. CH₂Cl₂ : methanol : 25% NH₄OH (150:75:15)
4. Methanol : H₂O : CH₂Cl₂ : toluene : diethylamine (40:8:40:20:14)

5. CH_2Cl_2 : methanol : 2-propanol : 25% NH_4OH (3:3:5:2)

6. Methanol : 2-propanol : 25% NH_4OH (5:5:2)

7. Acetone : methanol : 25% NH_4OH (5:3:2)

5.3.4 การทดสอบหาความไวรับ (Detection limit)

เติมสารมาตรฐาน enrofloxacin และ ciprofloxacin ในสารสกัดตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นของสารทั้งสอง เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ปริมาณยาสูงสุดที่ยอมรับได้) แล้วตรวจคัดกรองตามวิธีในข้อ 5.3.3 โดยใช้ปริมาตรสาร 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ไมโครลิตร เพื่อหาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

5.3.5 การตรวจความน่าเชื่อถือของวิธีคัดกรอง

ทำการวิเคราะห์ชุดตรวจสอบในการตรวจพบ (Positive sample) และชุดตรวจสอบในการตรวจไม่พบ (Negative sample) จำนวนอย่างละ 20 ตัวอย่าง แล้วคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) และความแม่นยำ (Accuracy) ได้ดังนี้

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{ผลบวกจริง} \times 100}{\text{จำนวนชุดทดสอบในการตรวจพบ}}$$

$$\text{Specificity} = \frac{\text{ผลลบจริง} \times 100}{\text{จำนวนชุดทดสอบในการตรวจไม่พบ}}$$

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{ผลบวกจริง} + \text{ผลลบจริง} \times 100}{\text{จำนวนชุดทดสอบทั้งหมด}}$$

5.3.5.1 การเตรียมชุดทดสอบในการตรวจพบ (Positive sample)

เติมสารละลายมาตรฐาน enrofloxacin และ ciprofloxacin ในตัวอย่างเนื้อไก่ ให้มีความเข้มข้นของสารทั้งสอง เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 20 ตัวอย่าง แล้วทำการตรวจคัดกรองโดยโครมาโทกราฟีแบบราบตามข้อ 5.3.2

5.3.5.2 การเตรียมชุดทดสอบในการตรวจไม่พบ (Negative sample)

ใช้ตัวอย่างที่ไม่มีสารจุลชีพตกค้างหรือมีสารตกค้างไม่เกินระดับการยอมรับ (ตรวจปริมาณสารโดย LC-MS แล้วว่าไม่เกินระดับการยอมรับ) จำนวน 20 ตัวอย่าง แล้วทำการตรวจคัดกรองโดยโครมาโทกราฟีแบบราบตามข้อ 5.3.2

5.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณและยืนยันโดยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี(LC-MS)

การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี(LC-MS) ใช้เพื่อหาปริมาณยา enrofloxacin ในตัวอย่าง และเป็นการตรวจยืนยันผลจากการตรวจคัดกรองเบื้องต้น

LC condition;

Column; Hypersil GOLD (3 μ , 2.1-mm I.D. x 150 mm)

Mobile phase; 0.02 M ammonium acetate (pH 2.5): acetonitrile 88:12

Flow rate; 0.3 ml/min

MS condition;

Acquisition mode : SIM (+)

Interface temperature : 250 °C, CDL temperature : 230 °C

Nebulizing Gas Flow : 0.18 L/min, Heat Block : 200 °C

Voltage; 1.6 kV

Detection; m/z; Ciprofloxacin = 331.05, Enrofloxacin = 359.00 and Norfloxacin = 319.10

5.3.7 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี LC-MS

5.3.7.1 Limit of detection (LOD)

เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้โดยความเข้มข้นดังกล่าวมี

อัตราส่วนความสูงระหว่าง peak ของสารและ noise (signal to noise ratio) เท่ากับ 3:1 ทำได้โดยการ

ฉีดวิเคราะห์สารมาตรฐาน enrofloxacin และ ciprofloxacin ที่ความเข้มข้น 0.06 และ 0.1 ppb

ตามลำดับ ฉีดวิเคราะห์โดย LC-MS

5.3.7.2 Limit of quantitation (LOQ)

เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณได้ โดยความเข้มข้น

ดังกล่าวมีอัตราส่วนความสูงระหว่าง peak ของสาร และ noise (signal to noise ratio) เท่ากับ 10:1

ทำการทดลอง ทำได้โดยการฉีดวิเคราะห์สารมาตรฐาน enrofloxacin และ ciprofloxacin ที่ความ

เข้มข้น 0.18 และ 0.31 ppb ตามลำดับ

5.3.7.3 Linearity and range

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.72, 2.40, 4.80, 9.60, 12.0 และ 24

ppb ของ enrofloxacin และ ciprofloxacin ฉีดวิเคราะห์โดย LC-MS และสร้างกราฟระหว่างความ

เข้มข้นของสารและอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกับ norfloxacin (internal standard)

คำนวณหาค่า correlation coefficient

5.3.7.4 Accuracy

ศึกษาความถูกต้องของวิธีโดยเติม enrofloxacin และ ciprofloxacin ลงในสารสกัดเนื้อไก่ (Spike sample) แล้ววิเคราะห์ปริมาณด้วย LC/MS จากนั้นคำนวณ % recovery จากสมการ

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณสารที่ตรวจพบในตัวอย่างที่เติมสาร} - \text{ปริมาณสารที่ตรวจพบในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสาร}}{\text{ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่}}$$

ค่าของ %Recovery ควรได้อยู่ระหว่าง 80-120%

5.3.7.5 Precision

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 9.6, 12 และ 24 ppb วิเคราะห์ด้วย LC-MS ความเข้มข้นละ 6 ครั้ง แล้วคำนวณหาความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (%RSD) ของปริมาณสารที่ได้

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{Mean}}$$

SD = Standard deviation ของการวิเคราะห์ปริมาณสาร

Mean = ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้

เกณฑ์การยอมรับ RSD (AOAC 1993) ค่า %RSD ควรน้อยกว่า 11.0 %

5.3 การประเมินคุณภาพด้านการตกค้างของยาต้านจุลชีพ enrofloxacin ในเนื้อไก่จากแหล่งวัตถุดิบ

สุ่มตัวอย่างเนื้อไก่และไขไก่จากแหล่งวัตถุดิบหรือตลาดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล เตรียมตัวอย่างและตรวจคัดกรองโดยโครมาโทกราฟีแนวราบ หากพบตัวอย่างใดมีปริมาณการปนเปื้อนของยา enrofloxacin สูงเกินกว่า 100 ppb (MRL)ให้นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์ยืนยันและหาปริมาณซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี LC-MS

บทที่ 6

ผลการวิจัย

6.1 การพัฒนาระบบการแยกสาร enrofloxacin ด้วยโครมาโทกราฟีแนวราบ

ระบบสำหรับการใช้ในการตรวจคัดกรองด้วยโครมาโทกราฟีแนวราบได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้ วัสดุภาคลงที่เป็น TLC silica gel 60F₂₅₄ และ HPTLC silica gel 60F254 และวัสดุภาคลื่อนที่แบบ ต่างๆ จำนวน 7 ระบบ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการแยกสาร enrofloxacin และ ciprofloxacin ได้ แตกต่างกันโดยค่าการเคลื่อนที่ของสารบนวัสดุภาคลงที่ TLC silica gel 60F₂₅₄ แสดงดังตารางที่ 3 และค่าการเคลื่อนที่ของสารบนวัสดุภาคลงที่ HPTLC silica gel 60F254 แสดงดังตารางที่ 4

จากการทดลองพบว่าการเคลื่อนที่บนวัสดุภาคลงที่และระบบวัสดุภาคลื่อนที่ต่างๆ ในตาราง ข้างต้น ให้การแยกสารที่ดี ระบบวัสดุภาคลื่อนที่บน HPTLC silica gel 60F254 ที่สามารถเลือกใช้ ได้ เช่น ระบบที่ 1 และ 3 - 7 แต่เมื่อได้ทดลองกับสารสกัดตัวอย่างแล้วพบว่าการเคลื่อนที่ของสาร จะแตกต่างจากเดิมเนื่องจากการรบกวนขององค์ประกอบอื่นๆ ตัวอย่างแต่ยังให้การแยกที่ดี สามารถตรวจวัดได้ ดังนั้นสามารถเลือกใช้ระบบเหล่านี้ในการตรวจคัดกรองด้วยวิธีโครมาโทกราฟี แนวราบได้

ตารางที่ 3 ค่า R_f value ของสาร enrofloxacin และ ciprofloxacin ในวัฏภาคเคลื่อนที่ต่างๆ โดย

วัฏภาคคงที่เป็น TLC silica gel 60 F₂₅₄

วัฏภาคเคลื่อนที่	ค่า R _f	
	Enrofloxacin	Ciprofloxacin
1. CH ₂ Cl ₂ : methanol : 25% NH ₄ OH : acetonitrile (4:4:2:1)	0.62	0.57
2. CH ₂ Cl ₂ : ethanol : 25% NH ₄ OH (2:2:1)	0.68	0.49
3. CH ₂ Cl ₂ : methanol : 25% NH ₄ OH (150:75:15)	0.71	0.36
4. Methanol : H ₂ O : CH ₂ Cl ₂ : toluene : diethylamine (40:8:40:20:14)	0.21	0.09
5. CH ₂ Cl ₂ : methanol : 2-propanol : 25% NH ₄ OH (3:3:5:2)	0.47	0.37
6. Methanol : 2-propanol : 25% NH ₄ OH (5:5:2)	0.41	0.27
7. Acetone : methanol : 25% NH ₄ OH (5:3:2)	0.54	0.36

หมายเหตุ สารมาตรฐาน: Enrofloxacin 20 µg/mL และ Ciprofloxacin 20 µg/mL ใน methanol

ปริมาณ: 10 µL x 6 mm

ตรวจสอบโดย การเรืองแสง (Fluorescence) 366 nm

ตารางที่ 4 ค่า R_f value ของสาร enrofloxacin และ ciprofloxacin ในวัฏภาคเคลื่อนที่ต่างๆ โดย

วัฏภาคคงที่เป็น HPTLC silica gel 60F254

วัฏภาคเคลื่อนที่	ค่า R _f	
	Enrofloxacin	Ciprofloxacin
1. CH ₂ Cl ₂ : methanol : 25% H ₄ OH : acetronitrile (4:4:2:1)	0.67	0.63
2. CH ₂ Cl ₂ : ethanol : 25% NH ₄ OH (2:2:1)	0.25	0.10
3. CH ₂ Cl ₂ : methanol : 25% NH ₄ OH (150:75:15)	0.51	0.33
4. Methanol : H ₂ O : CH ₂ Cl ₂ : toluene : diethylamine (40:8:40:20:14)	0.72	0.61
5. CH ₂ Cl ₂ : methanol : 2-propanol : 25% NH ₄ OH (3:3:5:2)	0.45	0.38
6. Methanol : 2-propanol : 25% NH ₄ OH (5:5:2)	0.42	0.33
7. Acetone : methanol : 25% NH ₄ OH (5:3:2)	0.45	0.35

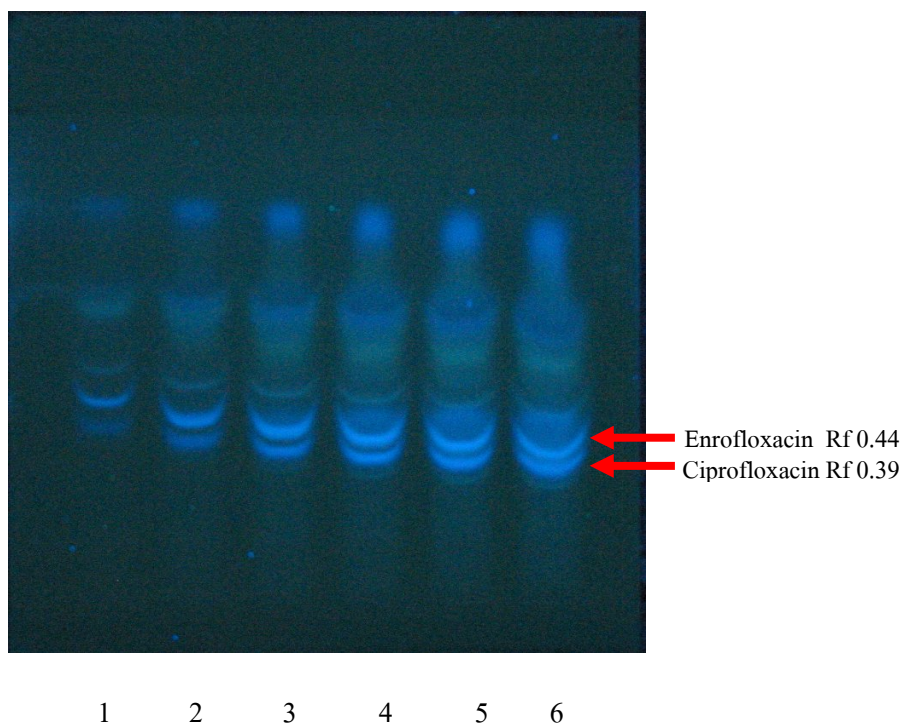
หมายเหตุ สารมาตรฐาน: Enrofloxacin 20 µg/mL และ Ciprofloxacin 20 µg/mL ในmethanol

ปริมาณ: 10 µL

ตรวจสอบโดย การเรืองแสง (Fluorescence) 366 nm

6.2 ทดสอบความไวรับ (detection limit) ของวิธีคัดกรอง

เพื่อหาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ เติมสารมาตรฐาน enrofloxacin และ ciprofloxacin ในสารสกัดตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ปริมาณยาสูงสุดที่ยอมรับได้) แล้วทำการตรวจวัดโดยโครมาโทกราฟีแนวราบโดยจุดสารละลายมาตรฐานลงบนวัสดุภาคลงที่ปริมาตรต่างๆ ดังนี้ 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 ไมโครลิตร ทั้งนี้แต่ละจุดจะมีเนื้อสารเท่ากับ 25, 50, 75, 100 และ 150 นาโนกรัม ตามลำดับ วิธีนี้มีความสามารถตรวจวัดสารที่ระดับ 50 นาโนกรัมต่อกรัม ต่อแถบสาร (10 ไมโครลิตร) ซึ่งตรงกับจุดสารที่ 2 ในรูปที่ 9 เป็นจุดที่มองเห็น แถบสารเรืองแสงสีฟ้าได้ชัดเจน (Rf value ของ enrofloxacin และ ciprofloxacin เท่ากับ 0.44 และ 0.39 ตามลำดับ) ทั้งนี้จึงต้องใช้สารตัวอย่างปริมาณ 10 - 25 ไมโครลิตร จึงจะสามารถมองเห็นผลการตรวจคัดกรองได้ชัดเจน



รูปที่ 9 โครมาโทแกรมของชุดทดสอบความไวรับ

วัฏภาคคงที่: HPTLC Si 60 F 254

วัฏภาคเคลื่อนที่: propanol: methanol : 25% ammonia 5:5:2

ปริมาตรสาร: 10 ไมโครลิตร

ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่: 75 มิลลิเมตร

การตรวจวัด: การเรือง (แสงสีฟ้า) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

แถบที่ 1- 6 enrofloxacin และ ciprofloxacin 25, 50, 75, 100 และ 150

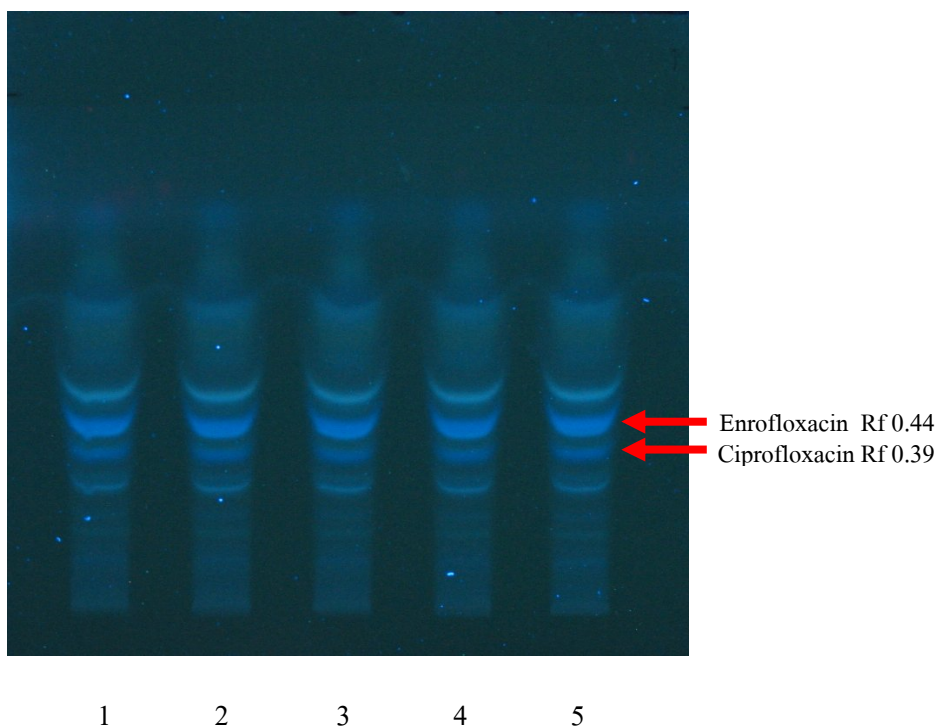
นาโนกรัม ตามลำดับ

6.3 การทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีคัดกรอง

ทำการวิเคราะห์ชุดตรวจสอบในการตรวจพบ(Positive sample) และชุดตรวจสอบในการตรวจไม่พบ (Negative sample) จำนวนอย่างละ 20 ตัวอย่าง แล้วคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) และความแม่นยำ (Accuracy) ผลการตรวจพบว่า การตรวจคัดกรองยาในตัวอย่างเนื้อไก่ มีค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) และความแม่นยำ (Accuracy) เท่ากับ 90, 100, 95 % ตามลำดับ และ ตรวจคัดกรองยาในตัวอย่างไข่ไก่ มีค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) และความแม่นยำ (Accuracy) เท่ากับ 80, 100, 88 % ตามลำดับ ดังแสดงดังตารางที่ 5 และโครมาโทแกรมที่ได้จากการตรวจชุดทดสอบผลบวกและลบในเนื้อไก่ แสดงดังรูปที่ 10, 11 ตามลำดับ และโครมาโทแกรมที่ได้จากการตรวจชุดทดสอบผลบวกและลบในไข่ไก่ แสดงดังรูปที่ 12, 13 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีคัดกรอง

ชนิด ตัวอย่าง	จำนวนชุดทดสอบผลบวก			จำนวนชุดทดสอบผลลบ			ความน่าเชื่อถือ %		
	ผลบวกจริง	ผลลบเท็จ	รวม	ผลลบจริง	ผลบวกเท็จ	รวม	Sensitivity	Specificity	Accuracy
เนื้อไก่	18	2	20	20	0	20	90	100	95
ไข่ไก่	12	3	15	11	0	11	80	100	88



รูปที่ 10 โครมาโทแกรมของชุดทดสอบผลบวกในเนื้อไก่

วัฏภาคคงที่: HPTLC Si 60 F 254

วัฏภาคเคลื่อนที่: propanol: methanol : 25% ammonia 5:5:2

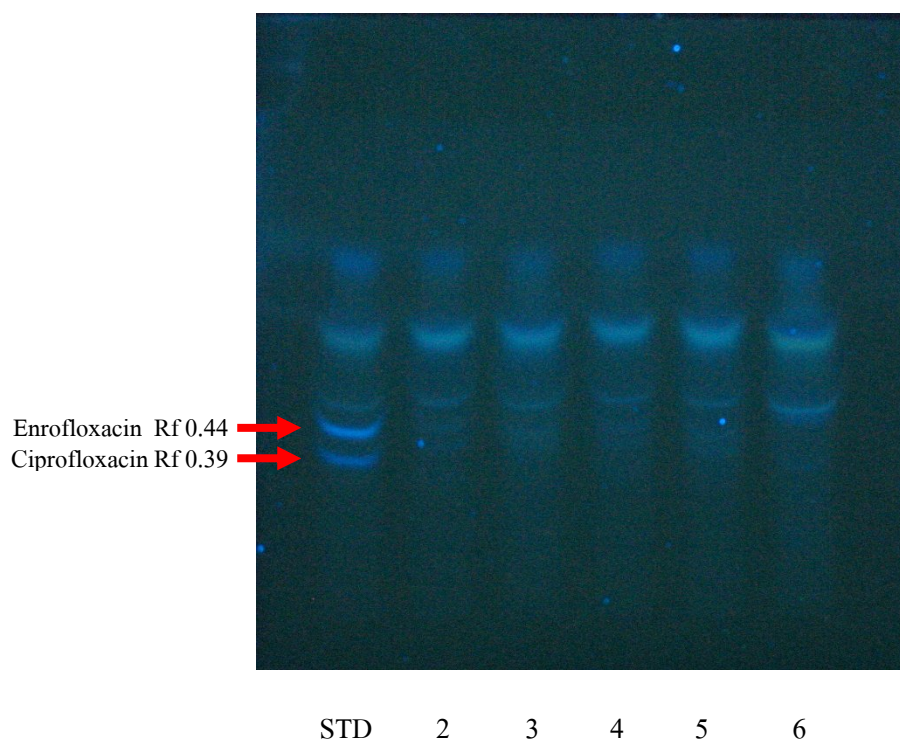
ปริมาตรสาร: 10 ไมโครลิตร

ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่: 75 มิลลิเมตร

การตรวจวัด: การเรือง (แสงสีฟ้า) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

แถบที่ 1 - 5 เป็นโครมาโทแกรมที่ได้จากชุดทดสอบผลบวกจะเห็นแถบเรืองแสงสีน้ำเงิน

สองแถบ คือ enrofloxacin และ ciprofloxacin (Rf value เท่ากับ 0.44 และ 0.39 ตามลำดับ)



รูปที่ 11 โครมาโทแกรมของชุดทดสอบผลลบในเนื้อไก่

วัฏภาคคงที่: HPTLC Si 60 F 254

วัฏภาคเคลื่อนที่: propanol: methanol : 25% ammonia 5:5:2

ปริมาตรสาร: 10 ไมโครลิตร

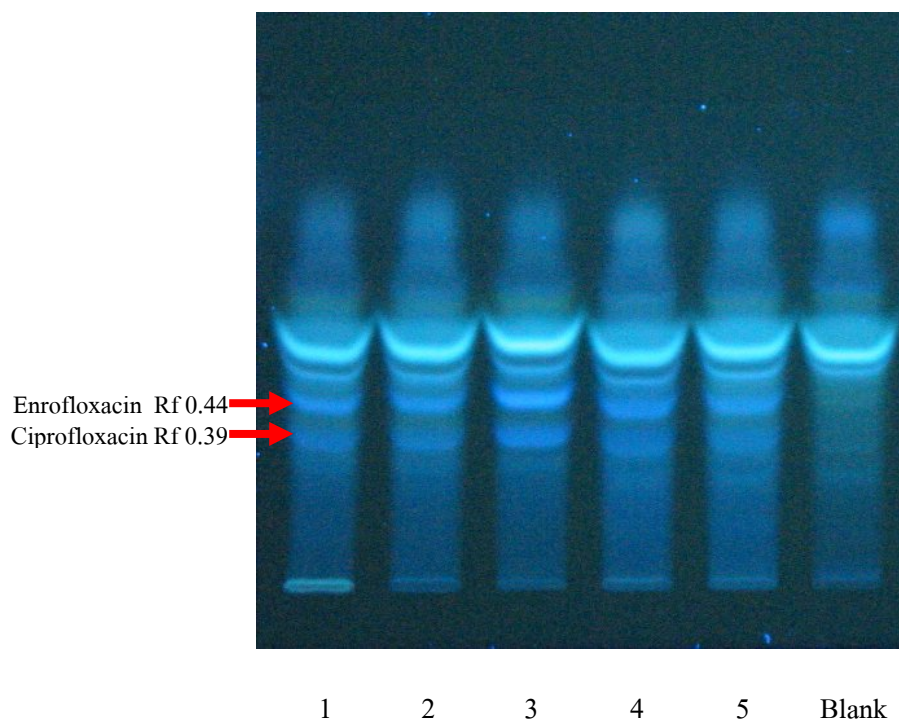
ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่: 75 มิลลิเมตร

การตรวจวัด: การเรือง (แสงสีฟ้า) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

แถบที่ 1 enrofloxacin และ ciprofloxacin เป็นโครมาโทแกรมสาร

มาตรฐาน แถบที่ 2-6 เป็นชุดทดสอบผลลบ จะเห็นว่าในชุดทดสอบผลลบไม่มีแถบเรือง

แสงสีฟ้าที่ตรงกับแถบสารมาตรฐานทั้งสอง



รูปที่ 12 โครมาโทแกรมของชุดทดสอบผลบวกในไขไก่

วัฏภาคคงที่: HPTLC Si 60 F 254

วัฏภาคเคลื่อนที่: propanol: methanol : 25% ammonia 5:5:2

ปริมาตรสาร: 10 ไมโครลิตร

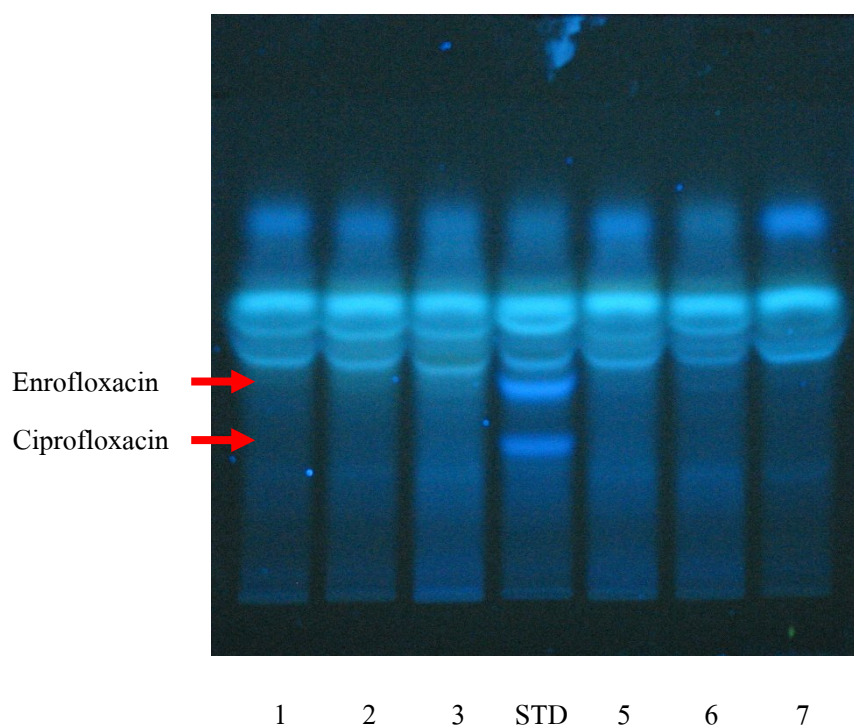
ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่: 75 มิลลิเมตร

การตรวจวัด: การเรือง (แสงสีฟ้า) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

แถบที่ 1 - 5 เป็นโครมาโทแกรมที่ได้จากชุดทดสอบผลบวกจะเห็นแถบเรืองแสงสีน้ำเงิน

สองแถบ คือ enrofloxacin และ ciprofloxacin (Rf value เท่ากับ 0.44 และ 0.39 ตามลำดับ) แถบที่ 6

เป็น blank



รูปที่ 13 โครมาโทแกรมของชุดทดสอบผลลบในไขไก่

วัฏภาคคงที่: HPTLC Si 60 F 254

วัฏภาคเคลื่อนที่: propanol: methanol : 25% ammonia 5:5:2

ปริมาตรสาร: 10 ไมโครลิตร

ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่: 75 มิลลิเมตร

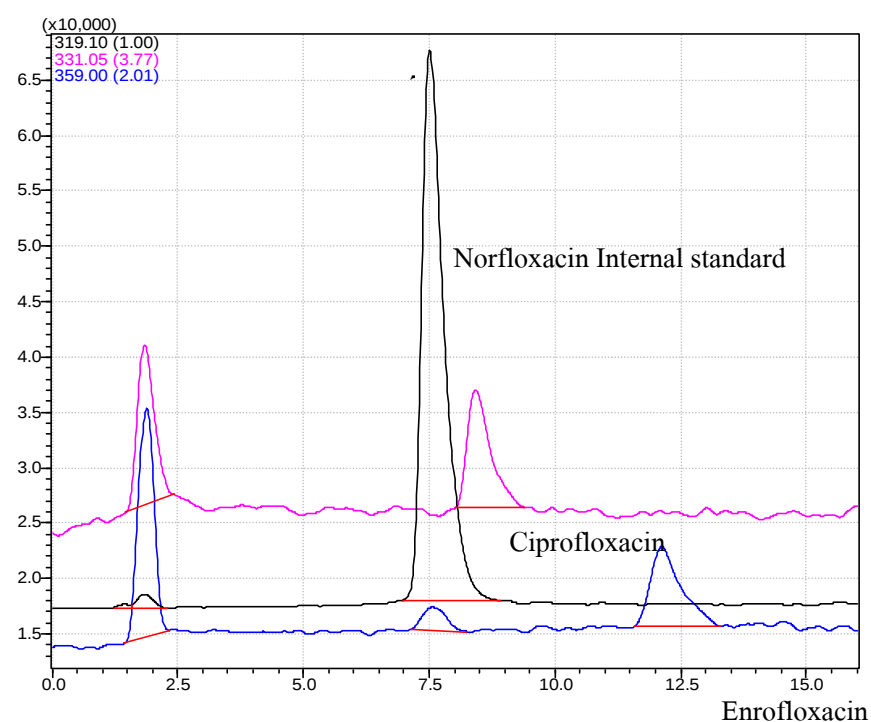
การตรวจวัด: การเรือง (แสงสีฟ้า) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

แถบที่ 1-3, 5-7 เป็นโครมาโทแกรมชุดทดสอบผลลบ แถบที่ 4 เป็นสารมาตรฐาน จะเห็นว่า

ในชุดทดสอบผลลบไม่มีแถบเรืองแสงสีฟ้าที่ตรงกับแถบสารมาตรฐานทั้งสอง

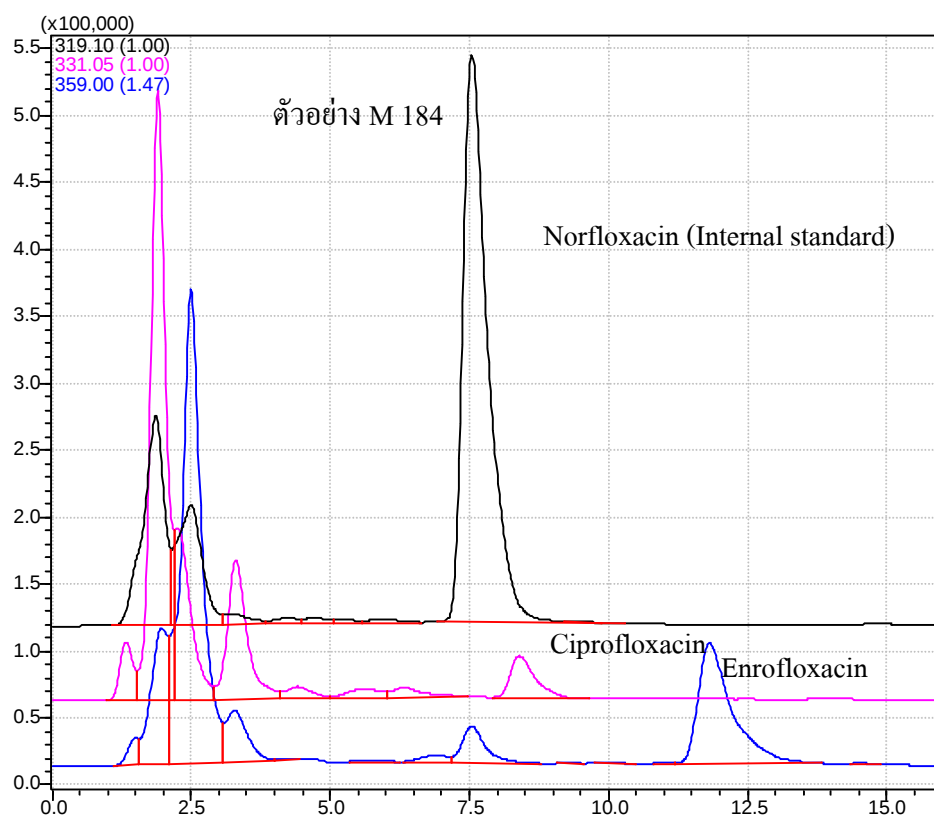
6.4 การตรวจยืนยันผลด้วย LC-MS

LC-MS โครมาโทแกรมของยา enrofloxacin, ciprofloxacin และ norfloxacin (internal standard) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS ที่ระดับความเข้มข้น 0.18, 0.31 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 LC-MS โครมาโทแกรมของยา enrofloxacin (m/z 359), ciprofloxacin (m/z 331.05) และ norfloxacin (internal standard, m/z 319.10)

LC-MS โครมาโทแกรมของยา enrofloxacin, ciprofloxacin และ norfloxacin (internal standard) จากการวิเคราะห์สารสกัดจากตัวอย่างเนื้อไก่(M187) ที่สุ่มจากแหล่งวัตถุดิบด้วยวิธี LC-MS แสดงดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 LC-MS โครมาโทแกรมของยา enrofloxacin (m/z 359), ciprofloxacin

(m/z 331.05) และ norfloxacin (internal standard, m/z 319.10) จากการวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ (M187)

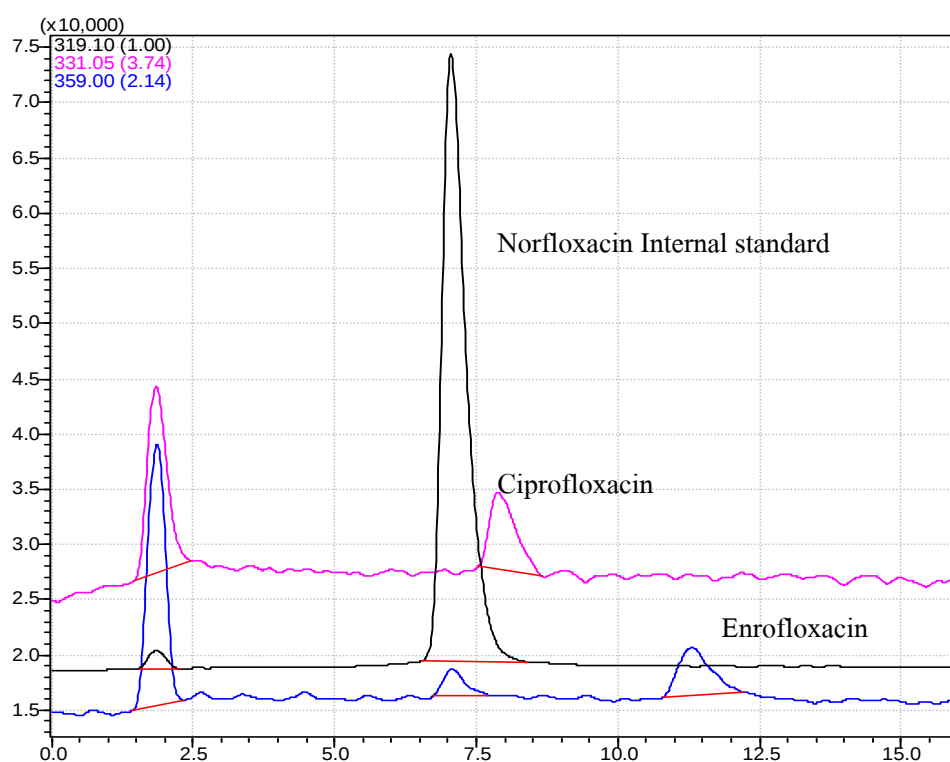
6.54 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี LC-MS

6.5.1 Limit of detection (LOD)

คือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้โดยความเข้มข้นดังกล่าวมีอัตราส่วน

ความสูงระหว่าง Peak height ของสารและ noise (signal to noise ratio) เท่ากับ 3:1 LOD ของ

enrofloxacin = 0.06 ppb และ ciprofloxacin = 0.10 ppb แสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 LC-MS โครมาโทแกรมของยา enrofloxacin, ciprofloxacin 0.06 ppb และ

0.10 ppb ตามลำดับ

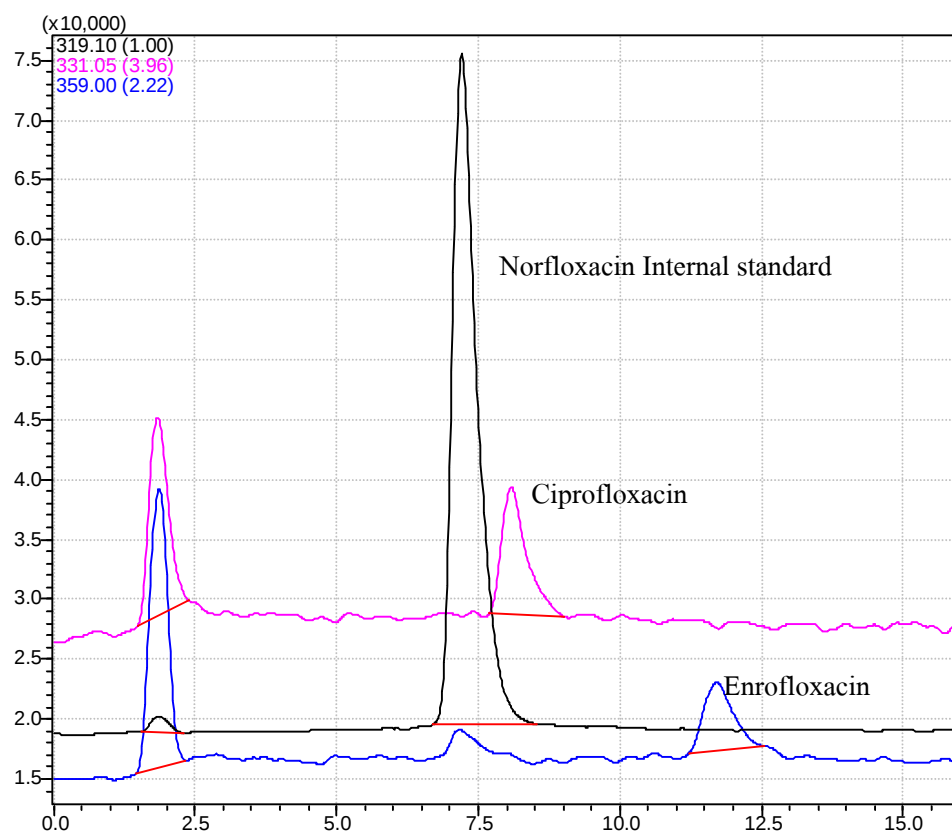
6.5.2 Limit of quantitation (LOQ)

คือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณได้ โดยความ

เข้มข้นดังกล่าวมีอัตราส่วนความสูงระหว่าง Peak ของสารและ noise (signal to noise ratio)

เท่ากับ 10:1 LOQ ของ enrofloxacin = 0.18 ppb และ ciprofloxacin = 0.31 ppb

โครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 17

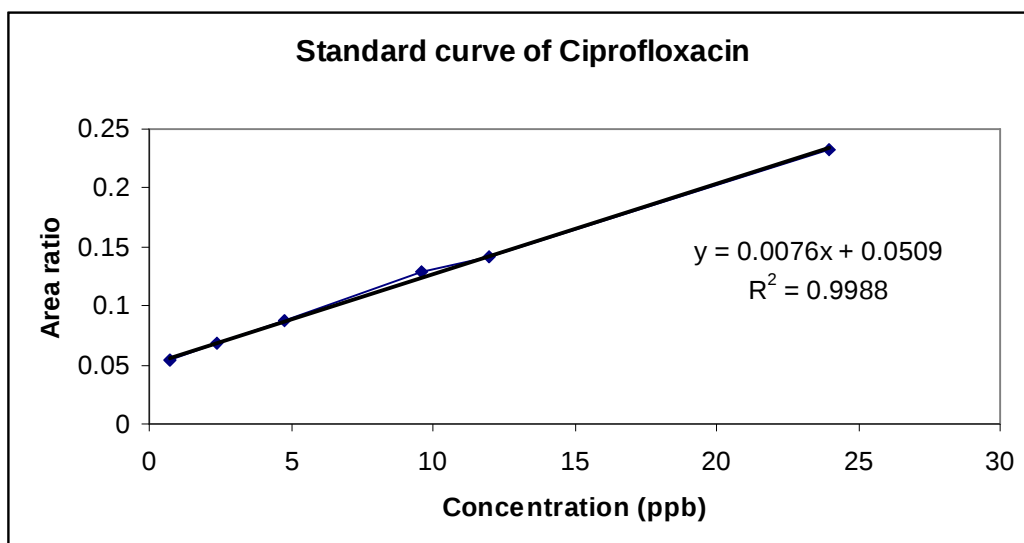


รูปที่ 17 LC-MS โครมาโทแกรมของยา enrofloxacin, ciprofloxacin 0.18 ppb และ

0.31 ppb ตามลำดับ

6.5.3 Linearity

ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ทำโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของ ciprofloxacin และ enrofloxacin ในช่วงความเข้มข้น 0.72 – 24 ppb ด้วยวิธี LC-MS แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเป็นแกน x อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกับ norfloxacin (internal standard) เป็นแกน y กราฟมาตรฐานของ ciprofloxacin และ enrofloxacin แสดงดังรูปที่ 18 และ 19 ตามลำดับ



รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน ciprofloxacin ในช่วงความเข้มข้น 0.72-24 ppb

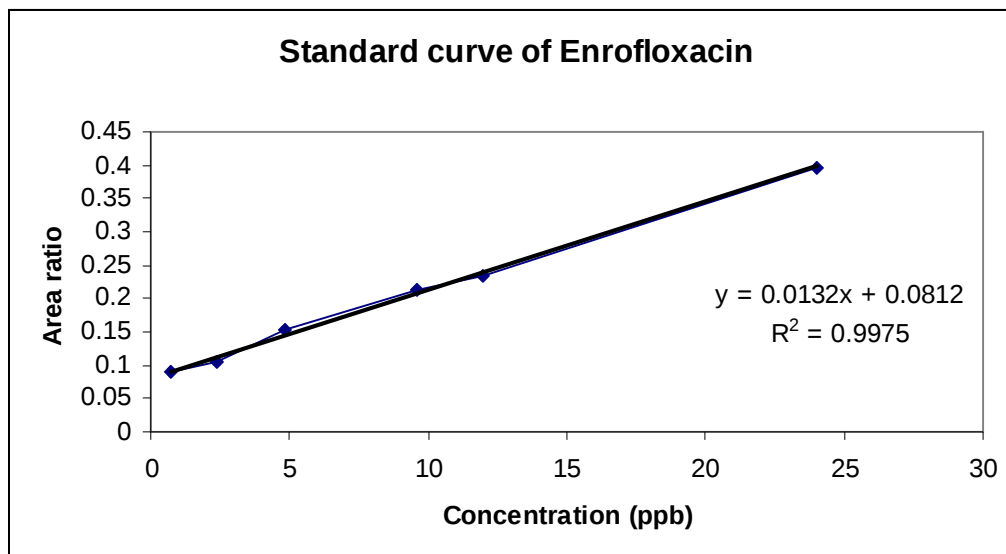
สมการแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน ciprofloxacin คือ

$$y = 0.0076x + 0.0509$$

โดยที่ y = อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน ciprofloxacin ต่อ

พื้นที่ใต้พีคของ Norfloxacin

x = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ciprofloxacin ในหน่วย ppb



รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Enrofloxacin ในช่วงความเข้มข้น 0.72-24 ppb

สมการแสดงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน enrofloxacin คือ

$$y = 0.0132x + 0.0812$$

โดยที่ y = อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน enrofloxacin ต่อ

พื้นที่ใต้พีคของ norfloxacin (internal standard)

x = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Enrofloxacin ในหน่วยของ ppb

ตารางที่ 6 และ 7 แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ของ

ciprofloxacin และ enrofloxacin ตามลำดับ

จะเห็นว่าค่า Correlation coefficients (R^2) ของทั้งสองกราฟสามารถยอมรับได้

(R^2 ควรมากกว่าหรือเท่ากับ 0.995) ดังนั้นกราฟมาตรฐานนี้สามารถนำไปวิเคราะห์

Ciprofloxacin และ Enrofloxacin ในตัวอย่างเนื้อไก่ได้

ตารางที่ 6 Peak area ratio of standard ciprofloxacin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Injection no.	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	0.72	2.4	4.8	9.6	12	24
1	0.04485	0.07204	0.09159	0.12419	0.14393	0.22798
2	0.05763	0.06459	0.08629	0.12491	0.14264	0.22914
3	0.05906	0.05493	0.09576	0.13555	0.14001	0.24143
Average	0.05385	0.06385	0.09121	0.12822	0.14219	0.23285
SD	0.00638	0.00858	0.00475	0.00636	0.00199	0.00745
%RSD	14.52	13.44	5.20	4.96	1.41	3.20
Slope				0.0076		
y-intercept				0.0509		
r^2				0.9988		

ตารางที่ 7 Peak area ratio of standard Enrofloxacin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Injection	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
no.	0.72	2.4	4.8	9.6	12	24
1	0.07436	0.11539	0.12949	0.22664	0.22324	0.38955
2	0.09841	0.11508	0.15099	0.19812	0.23961	0.41129
3	0.09451	0.12066	0.14944	0.24349	0.24365	0.40800
Average	0.089093	0.117043	0.143307	0.22275	0.2355	0.402947
SD	0.012908	0.003136	0.011991	0.022934	0.010808	0.011718
%RSD	14.48	2.68	8.36	10.29	4.57	2.91
Slope				0.0132		
y-intercept				0.0812		
r^2				0.9975		

6.3.4 Accuracy

ศึกษาความถูกต้องของวิธีโดยสกัด enrofloxacin และ ciprofloxacin ที่เติมลงใน

ตัวอย่างเนื้อไก่ (spike sample) แล้ววิเคราะห์ปริมาณด้วย LC-MS จากนั้นคำนวณ % recovery พบว่า

% recovery ของ ciprofloxacin และ enrofloxacin เท่ากับ 108.58 % และ 113.04 % ตามลำดับ แสดง

ดังตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการสกัดนี้สามารถนำไปวิเคราะห์

ciprofloxacin และ enrofloxacin ในตัวอย่างเนื้อไก่ได้

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery) ของ ciprofloxacin ในตัวอย่างเนื้อไก่

Amount added	Total amount	Amount found	% Recovery
(μg)	(μg)	(μg)	
blank	42.57	-	-
120	172.75	130.18	108.58

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery) ของ enrofloxacin ในตัวอย่างเนื้อไก่

Amount added	Total amount	Amount found	% Recovery
(μg)	(μg)	(μg)	
blank	80.78	-	-
120	216.43	135.65	113.04

6.4.5 Precision

เมื่อนำสารละลายมาตรฐาน ciprofloxacin และ enrofloxacin ที่ระดับความเข้มข้น 9.6, 12 และ 24 ppb วิเคราะห์ด้วย LC-MS ซ้ำกัน ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าความเบี่ยงเบน (%RSD) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสาร ciprofloxacin และ enrofloxacin 9.6 ppb มีค่า %RSD เท่ากับ 4.96 และ 3.58 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของ ciprofloxacin และ

enrofloxacin 12 ppb มีค่า %RSD เท่ากับ 1.41 และ 4.58 ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นของ

ciprofloxacin และ enrofloxacin 24 ppb มีค่า %RSD เท่ากับ 3.20 และ 3.14 ตามลำดับ

ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 Peak area ratio of standard ciprofloxacin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Injection no.	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		
	9.6	12	24
1	0.12419	0.14393	0.22798
2	0.12491	0.14264	0.22914
3	0.13555	0.14001	0.24143
Average	0.12822	0.14219	0.23285
SD	0.00636	0.00199	0.00745
%RSD	4.96	1.41	3.20

ตารางที่ 11 Peak area ratio of standard enrofloxacin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Injection no.	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		
	9.6	12	24
1	0.22664	0.22324	0.38955
2	0.20451	0.23961	0.41129
3	0.22323	0.24365	0.40800
Average	0.218127	0.23550	0.402947
SD	0.011915	0.010808	0.011718
%RSD	5.46	4.57	2.91

สรุปผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย LC-MS

จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแสดงว่าการวิเคราะห์ enrofloxacin และ ciprofloxacin ในเนื้อไก่และไข่ด้วยวิธี LC-MS นั้นจะให้ผลที่น่าเชื่อถือได้โดยผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย LC-MS แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สรุปผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี LC-MS

หัวข้อการตรวจสอบ	ผลการตรวจสอบ
Limit of detection (LOD)	Ciprofloxacin = 0.10 ppb, Enrofloxacin = 0.06 ppb
Limit of quantitation (LOQ)	Ciprofloxacin = 0.31ppb, Enrofloxacin = 0.18 ppb
Linearity and range	0.72-24 ppb
Accuracy	% recovery ของ Ciprofloxacin = 108.58% และ Enrofloxacin = 113.04%
Precision	ระดับความเข้มข้น 9.60 ppb % RSD ของ Ciprofloxacin = 4.96, Enrofloxacin = 3.58 ระดับความเข้มข้น 12 ppb % RSD ของ Ciprofloxacin = 1.41, Enrofloxacin = 4.58 ระดับความเข้มข้น 24 ppb % RSD ของ Ciprofloxacin = 3.20, Enrofloxacin = 3.14

6.4.6 ผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้นโดยโครมาโทกราฟีเนวราบในตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่จาก

แหล่งวัตถุดิบต่างๆ

จากการสุ่มตัวอย่างจากแหล่งวัตถุดิบและตรวจคัดกรองด้วยวิธีคัดกรองที่พัฒนาขึ้น พบ ตัวอย่างเนื้อไก่ที่ตรวจไม่ผ่านคือมีปริมาณยาตกค้างเกินกว่าระดับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 1 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 116 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตัวอย่างนี้มาจาก ตลาดประเภทที่ 1 ห้างสรรพสินค้าแห่งหนึ่ง ส่วนตัวอย่างไข่ไก่ตรวจผ่านทั้งหมด 62 ตัวอย่าง ผลการตรวจแสดงดังตารางที่ 13-14

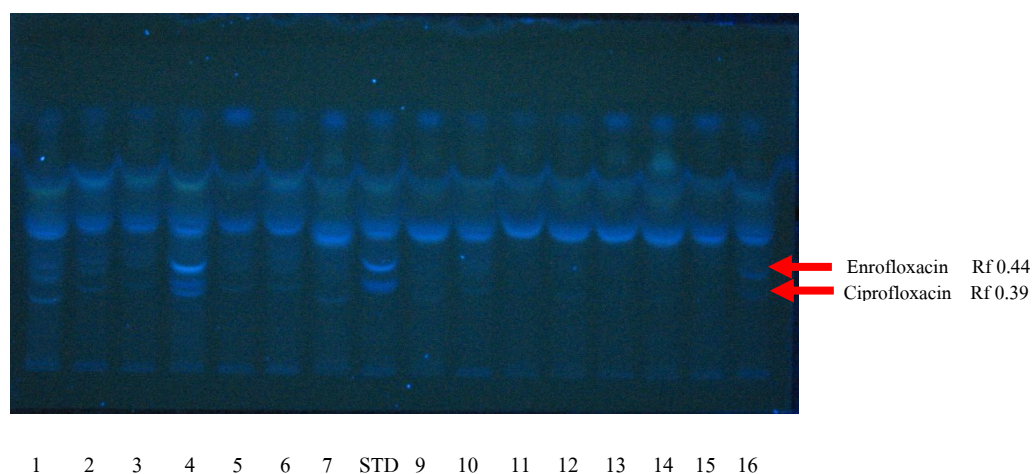
โครมาโทแกรมของตัวอย่างจากการตรวจคัดกรองแสดงดังรูปที่ 20

ตารางที่ 13 ผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้นโดยโครมาโทกราฟีเนวราบในตัวอย่างเนื้อไก่จากแหล่ง วัตถุดิบต่างๆ

ประเภทตลาด	จำนวนตัวอย่างที่สุ่ม	จำนวนตัวอย่างที่ ตรวจผ่าน	จำนวนตัวอย่างที่ ตรวจไม่ผ่าน
ประเภท 1 ห้างสรรพสินค้า	27	26	1
ประเภท 2 ตลาดสด	52	52	0
ประเภท 3 ตลาดนัด	37	37	0
รวม	116	115	1

ตารางที่ 14 ผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้นโดยโครมาโทกราฟีแนวราบในตัวอย่างไข่ไก่จากแหล่ง
วัตถุดิบต่างๆ

ประเภทตลาด	จำนวนตัวอย่างที่สุ่ม	จำนวนตัวอย่างที่ ตรวจผ่าน	จำนวนตัวอย่างที่ ตรวจไม่ผ่าน
ประเภท 1 ห้างสรรพสินค้า	5	5	0
ประเภท 2 ตลาดสด	40	40	0
ประเภท 3 ตลาดนัด	17	17	0
รวม	62	62	0



รูปที่ 20 โครมาโทแกรมจากการตรวจคัดกรองตัวอย่างเนื้อไก่จากแหล่งวัตถุดิบต่างๆ โดย

โครมาโทกราฟีแนวราบ

วัฏภาคคงที่: HPTLC Si 60 F 254

วัฏภาคเคลื่อนที่: propanol: methanol : 25% ammonia 5:5:2

ปริมาตรสาร: 10 ไมโครลิตร

ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่: 75 มิลลิเมตร

การตรวจวัด: การเรือง (แสงสีฟ้า) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

แถบที่ 1 - 7 และ แถบที่ 9 - 16 เป็นตัวอย่างทดสอบ แถบที่ 8 เป็นสารมาตรฐาน enrofloxacin และ ciprofloxacin ที่ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าตัวอย่างแถบที่ 4 หมายเลขตัวอย่าง M190 มีแถบเรืองแสงสีฟ้าตรงกับแถบสารมาตรฐานและความเข้มของแถบใกล้เคียงกัน นั่นคือตรวจไม่ผ่าน ซึ่งต้องนำตัวอย่างนี้ไปวิเคราะห์ยืนยันและหาปริมาณซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี LC-MS

6.4.7 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณและยืนยันผลด้วย LC-MS ในตัวอย่างจากแหล่งวัตถุดิบ

ตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ที่ผ่านการตรวจคัดกรองเบื้องต้นแล้ว เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณและยืนยันผลด้วยวิธี LC-MS ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธี ผลการทดสอบพบว่า ตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ที่ตรวจผ่านด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ (negative) จำนวน 25 และ 11 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS พบว่ามีปริมาณ enrofloxacin อยู่ระหว่าง $< 0.4 - 58.38$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเนื้อไก่ (ตารางที่ 15) และ $< 0.4 - 5.6$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างไข่ไก่ (ตารางที่ 17) ซึ่งแสดงว่าทั้งสองวิธีให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน คือ มีปริมาณการปนเปื้อน enrofloxacin ไม่เกินเกณฑ์การยอมรับ (100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

เมื่อนำตัวอย่างจากชุดทดสอบผลบวกในเนื้อไก่จำนวน 20 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS พบว่า ตัวอย่างเนื้อไก่กลุ่มที่ให้ผลเป็นบวกจริง (true positive) มีปริมาณ enrofloxacin อยู่ระหว่าง $45.6 - 84.4$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 16) ทั้งนี้การวิเคราะห์ปริมาณยาในชุดทดสอบผลบวกนี้เป็นการหาค่าการได้คืนกลับของวิธี (recovery) ได้ด้วย นั่นคือวิธีนี้มีค่าการได้คืนกลับของวิธี (recovery) ในเนื้อไก่เท่ากับ $45.6-84.4\%$ ส่วนตัวอย่างที่ตรวจให้เป็นผลลบเท็จ (false negative) มีปริมาณ enrofloxacin อยู่ระหว่าง $2.0 - 6.8$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 17) ดังนั้นความคลาดเคลื่อนของวิธีคัดกรองน่าจะมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการสกัดสารหรือปัจจัยอื่นที่มีผลต่อ

ปริมาณยาในตัวอย่างทำให้สารสกัดมีปริมาณยาน้อยและตรวจไม่พบ สำหรับการตรวจชุดทดสอบผลบวกในไขไก่ด้วยวิธี LC-MS จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างไขไก่กลุ่มที่ให้ผลเป็นบวกจริง (true positive) มีปริมาณ enrofloxacin อยู่ระหว่าง 36.8 – 70.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 18) ทั้งนี้การวิเคราะห์ปริมาณยาในชุดทดสอบผลบวกนี้เป็นการหาค่าการได้คืนกลับของวิธี (recovery) ได้ นั่นคือวิธีนี้มีค่าการได้คืนกลับของวิธี (recovery) เท่ากับ 36.8-70.4% ส่วนตัวอย่างที่ตรวจให้เป็นผลลบเท็จ (false negative) มีปริมาณ enrofloxacin อยู่ระหว่าง 26.4 – 30.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นความคลาดเคลื่อนของวิธีคัดกรองน่าจะมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการสกัดสารหรือปัจจัยอื่นที่มีผลต่อปริมาณยาในตัวอย่างทำให้สารสกัดมีปริมาณยาน้อยและตรวจไม่พบ

จากตัวอย่างเนื้อไก่ที่ตรวจไม่ผ่านการตรวจคัดกรองเบื้องต้น นำมาวิเคราะห์ปริมาณและยืนยันผลด้วย LC-MS พบว่า เนื่องจากสารสกัดตัวอย่างที่ทดสอบในครั้งแรกเก็บไว้นานกว่า 1 เดือน จึงแห้งไป ผู้วิจัยจึงได้ทำการสกัดตัวอย่างใหม่อีกครั้งแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย LC-MS พบว่ามีปริมาณยา enrofloxacin น้อยกว่า 0.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้เกิดความไม่สอดคล้องกันขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุจากสุ่มตัวอย่างในส่วนที่ต่างกัน หรืออาจเกิดจากสภาวะการเก็บรักษาตัวอย่างไม่เหมาะสมทำให้เกิดการสลายตัวของตัวยาทำให้ตรวจไม่พบในครั้งที่สอง

ตารางที่ 15 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ที่ตรวจผ่านการตรวจคัดกรองด้วย LC-MS

ตัวอย่างที่	ผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้น	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้โดย LC-MS ($\mu\text{g/kg}$)	
		Ciprofloxacin	Enrofloxacin
1 (M244)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
2 (M187)	ตรวจไม่พบ	7.0000	30.2424
3 (M188)	ตรวจไม่พบ	9.6844	53.0304
4 (M230)	ตรวจไม่พบ	12.6844	54.0304
5 (M234)	ตรวจไม่พบ	2.4212	58.3024
6 (M002)	ตรวจไม่พบ	< 0.24*	< 0.4*
7 (M041)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
8 (M044)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
9 (M049)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
10 (M052)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
11 (M056)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
12 (M074)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
13 (M076)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
14 (M149)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
15 (M150)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
16 (M174)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
17 (M178)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
18 (M181)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
19 (M240)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*
20 (M200)	ตรวจไม่พบ	<0.24*	<0.4*

หมายเหตุ; * = น้อยกว่า LOD (0.24 $\mu\text{g/kg}$ สำหรับ Ciprofloxacin และ สำหรับ Enrofloxacin),

ตรวจไม่พบ คือมีปริมาณยาปนเปื้อนน้อยกว่า 100 $\mu\text{g/kg}$

ตารางที่ 16 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่จากชุดทดสอบผลบวกด้วย LC-MS

ตัวอย่างที่	ผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้น	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้โดย LC-MS ($\mu\text{g/kg}$)	
		Ciprofloxacin	Enrofloxacin
1 M001	ตรวจพบ	59.6	78.8
2 M048	ตรวจพบ	43.2	51.2
3 M104	ตรวจพบ	55.6	72.8
4 M223	ตรวจพบ	61.2	70.0
5 M238	ตรวจพบ	48.4	53.6
6 M205	ตรวจพบ	59.6	74.4
7 M180	ตรวจพบ	54.4	69.6
8 M153	ตรวจพบ	54.4	68.0
9 M186	ตรวจพบ	42.0	58.0
10 M202	ตรวจพบ	68.8	79.2
11 M204	ตรวจพบ	56.0	80.0
12 M216	ตรวจพบ	51.6	51.2
13 M217	ตรวจพบ	50.4	60.8
14 M229	ตรวจพบ	60.0	72.8
15 M242	ตรวจพบ	60.8	84.4
16 M171	ตรวจพบ	43.2	57.6
17 M194	ตรวจพบ	46.4	60.8
18 M152	ตรวจไม่พบ	5.2	6.8
19 M206	ตรวจไม่พบ	0.4	2.0
20 M195	ตรวจพบ	41.6	45.6

หมายเหตุ; * = น้อยกว่า LOD ($0.24 \mu\text{g/kg}$ สำหรับ Ciprofloxacin และ สำหรับ Enrofloxacin),

ตรวจไม่พบ คือมีปริมาณยาปนเปื้อนน้อยกว่า $100 \mu\text{g/kg}$ ตรวจพบ คือมีปริมาณยาปนเปื้อนมากกว่า

$100 \mu\text{g/kg}$

ตารางที่ 17 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่ที่ตรวจผ่านการตรวจคัดกรองด้วย LC-MS

ตัวอย่างที่	ผลการตรวจคัดกรอง เบื้องต้น	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้โดย LC-MS (µg/kg)	
		Ciprofloxacin	Enrofloxacin
1 E009	ตรวจไม่พบ	<0.24*	5.6
2 E041	ตรวจไม่พบ	5.2	<0.4*
3 E020	ตรวจไม่พบ	4.8	<0.4*
4 E029	ตรวจไม่พบ	4.8	<0.4*
5 E037	ตรวจไม่พบ	2.4	<0.4*
6 E047	ตรวจไม่พบ	4.0	2.8
7 E011	ตรวจไม่พบ	7.8	0.6
8 E014	ตรวจไม่พบ	3.2	1.5
9 E023	ตรวจไม่พบ	0.8	0.5
10 E051	ตรวจไม่พบ	2.9	2.2
11 E034	ตรวจไม่พบ	8.0	1.5

หมายเหตุ; * = น้อยกว่า LOD (0.24 µg/kg สำหรับ Ciprofloxacin และ สำหรับ Enrofloxacin),

ตรวจไม่พบ คือมีปริมาณยาปนเปื้อนน้อยกว่า 100 µg/kg ตรวจพบ คือมีปริมาณยาปนเปื้อนมากกว่า

100 µg/kg

ตารางที่ 18 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่จากชุดทดสอบผลบวกด้วย LC-MS

ตัวอย่างที่	ผลการตรวจคัดกรอง เบื้องต้น	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้โดย LC-MS (µg/kg)	
		Ciprofloxacin	Enrofloxacin
1 (E019)	ตรวจพบ	47.6	68.8
2 (E030)	ตรวจพบ	55.2	69.6
3 (E036)	ตรวจพบ	59.6	70.4
4 (E038)	ตรวจพบ	54.8	60.8
5 (E049)	ตรวจพบ	45.2	60.4
6 (E022)	ตรวจพบ	8.0	39.6
7 (E031)	ตรวจพบ	<0.40*	36.8
8 (E046)	ตรวจพบ	9.6	51.2
9 (E043)	ตรวจไม่พบ	<0.40*	30.8
10 (E017)	ตรวจไม่พบ	2.4	26.4
11(E001)	ตรวจไม่พบ	0.8	30.0

หมายเหตุ; * = น้อยกว่า LOD (0.24 µg/kg สำหรับ Ciprofloxacin และ สำหรับ Enrofloxacin),

ตรวจไม่พบ คือมีปริมาณยาปนเปื้อนน้อยกว่า 100 µg/kg ตรวจพบ คือมีปริมาณยาปนเปื้อนมากกว่า

100 µg/kg

บทที่ 7

วิจารณ์ผล

การทดสอบตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ที่มียา enrofloxacin พบว่าวิธีการตรวจคัดกรองเบื้องต้นนี้มีประสิทธิภาพดี สามารถตรวจพบยา enrofloxacin ที่ตกค้างในปริมาณความเข้มข้นของยาน้อยที่สุด (detection limit) ในระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเท่ากับระดับการยอมรับที่กำหนด (MRL)

การทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีคัดกรองนี้ พบว่าเป็นวิธีที่สามารถตรวจคัดกรองในตัวอย่างเนื้อไก่ได้ดี โดยมีค่า sensitivity (ความสามารถในการให้ผลบวกถ้ามียาด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่) ร้อยละ 90 มีค่า specificity (ความสามารถในการให้ผลลบถ้าไม่มียาด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่) ร้อยละ 100 สำหรับการคัดกรองในตัวอย่างไข่ไก่นั้นสามารถตรวจคัดกรองยา enrofloxacin ได้โดยมีค่า sensitivity ร้อยละ 80 มีค่า specificity ร้อยละ 100 ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการคัดกรองนี้ไม่สามารถตรวจ ciprofloxacin ซึ่งเป็น metabolite ของยาในระดับต่ำได้ อาจมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการสกัดยังไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดกรอง ciprofloxacin ในตัวอย่างไข่ไก่ได้ การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจตัวอย่างด้วยวิธีคัดกรองกับวิธีลิควิด โครมาโทกราฟี แมสสเปกโทเมตรี (LC-MS) พบว่า ผลการตรวจตัวอย่างจากทั้งสองวิธีสอดคล้องกัน ดังนั้น วิธีตรวจคัดกรองนี้จึงเป็นทางเลือกในการตรวจเบื้องต้นสำหรับยา enrofloxacin ตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ได้

ค่าใช้จ่ายในการตรวจคัดกรองโดยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ

ค่าใช้จ่ายโดยประมาณในการตรวจคัดกรองโดยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบต่อตัวอย่าง

แสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ค่าใช้จ่ายในการตรวจคัดกรองโดยวิธีโครมาโทกราฟีแนวราบ

ค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
หมวดค่าสารเคมี	150-200
หมวดทั่วไปค่าแก๊สในโตรเจน	50
หมวดค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	50-100
หมวดอื่นๆ เช่น ค่าสาธารณูปโภค	10 % ของค่าใช้จ่ายทั้งหมด
รวม	270- 440

หมายเหตุ ค่าใช้จ่ายนี้เป็นค่าใช้จ่ายโดยประมาณเท่านั้น

การเปรียบเทียบวิธีคัดกรองโดยโครมาโทกราฟีแนวราบและวิธี LC-MS

การเปรียบเทียบวิธีคัดกรองโดยโครมาโทกราฟีแนวราบและวิธี LC-MS ที่ใช้สำหรับการตรวจสารตกค้างในเนื้อไก่และไข่ไก่ แสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 การเปรียบเทียบวิธีคัดกรอง โดยโครมาโทกราฟีแนวราบและวิธี LC-MS

หัวข้อ	โครมาโทกราฟีแนวราบ (HPTLC)	LC-MS
ค่าใช้จ่ายโดยประมาณ (บาท)	300 -500	3,000-5,000
เวลาในการวิเคราะห์ (ชม)	3-5	4-6
ความไวในการวิเคราะห์ (ppb)	100	0.06 (LOD)
ความจำเพาะของวิธี	100	-
ความถูกต้องของวิธี (%recovery)	45-80 %	113 %
ความแม่นยำ (% RSD)	-	4 %

โดยสรุป วิธีคัดกรองโดยโครมาโทกราฟีแนวราบ (HPTLC) ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการคัดกรองการปนเปื้อนของยา enrofloxacin ในเนื้อไก่และไข่ เป็นวิธีที่ดี รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายน้อย จึงเหมาะจะนำมาใช้ในงานคัดกรองตัวอย่างที่มีปริมาณมาก สามารถใช้ในหน่วยงานที่มีงานประจำด้านการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนได้ ทั้งนี้วิธีนี้มีความไวและความถูกต้องในระดับหนึ่งดังนั้น หากต้องการงานที่มีความละเอียดสูง ควรเลือกใช้วิธีอื่น เช่น HPLC หรือ LC-MS เป็นต้น

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เมื่อได้ทำการตรวจคัดกรองตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ที่สุ่มมาจากแหล่งวัตถุดิบจำนวน 116 และ 62 ตัวอย่าง พบมี เนื้อไก่ 1 ตัวอย่างที่มีปริมาณยา enrofloxacin ตกค้างเกินระดับการยอมรับที่ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้ตัวอย่างที่เกินมาตรฐานควรนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณเพื่อยืนยันผลซ้ำด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทเมทรี (LC-MS) ต่อไป

ข้อมูลที่ได้จากการคัดกรองตัวอย่างนี้ แสดงให้เห็นว่าแม้ปัจจุบันจะมีการห้ามใช้ยา enrofloxacin ในสัตว์สัตว์ปีกแล้ว ยังมีการใช้อยู่จริงในพื้นที่ที่สุ่มตัวอย่างซึ่งสะท้อนปัญหาด้านต่างๆ ในสังคม เช่น การศึกษาและการเผยแพร่ความรู้ที่จำเป็นแก่เกษตรกร การควบคุมการใช้ยาเกินความจำเป็นและการใช้ยาผิดประเภทหรือลักลอบใช้ ปัญหามลภาวะเป็นพิษที่เกิดจากสารตกค้างต่างๆ เหล่านี้ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และด้านเศรษฐกิจของประเทศ

ทั้งนี้อาจมีปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของวิธีคัดกรองด้วยวิธีโครมาโทกราฟี แนวรายนี้นี้ ได้แก่

1. องค์ประกอบในตัวอย่างซึ่งมีความแปรปรวนตามธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างจะส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ได้
2. การเตรียมวัตถุดิบ เช่น เนื้อเยื่อแต่ละส่วนของตัวอย่างนั้นจะมีองค์ประกอบแตกต่างกัน รวมถึงการเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนการบดตัวอย่างความละเอียดของตัวอย่างย่อมส่งผลต่อการสกัดสารออกจากตัวอย่างด้วย
3. สภาพะในการทดสอบตัวอย่าง เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความพร้อมของเครื่องมือและสารเคมีต่างๆ ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการทดสอบได้

4. สถานะการเก็บรักษาตัวอย่าง จะส่งผลการเสื่อมสลายของยาได้ซึ่งควรได้รับการศึกษาต่อไปเพื่อให้วิธีมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

1. Sarkozy G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet Med* 2001; 46: 257-74.
2. Bugyei K, Black WD, McEwen S. Pharmacokinetics of Enrofloxacin given by the oral, intravenous and intramuscular routes in broiler chickens. *Can J Res* 1999; 63: 193-200.
3. Lizondo M, Pons M, Gallardo M, Estelrich J. Physicochemical properties of enrofloxacin. *Pharmaceut Biomed* 1997; 15: 1845-49.
4. U.S. Food and Drug Administration. Withdrawal of approval of the new animal drug application for enrofloxacin in poultry. Final decision of commissioner Docket no. 2000N-1571.
5. Tollefson L, Karp BE. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Médecine et maladies infectieuses* 2004; 34:514–521.
6. The commission of the European communities. Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Council Regulation (EEC) No 2377/90.
7. The Commission of the European communities. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results 2002 August
8. Hoof NV, Wascha KD, Okermana L, Reybroeckb W, Poelmansa S. Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Analytica Chimica Acta* 2005; 529: 265–72.
9. Clemente M, Hermo MP, Barrón D, Barbos J. A Confirmatory and quantitative analysis using experimental design for the extraction and liquid chromatography–UV, liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass

- spectrometry/massspectrometry determination of quinolones in turkey muscle. J Chromatogr A 2006; 1135: 170-178.
10. Okerman L, Wasch KD, Hoof JV. Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix. Analyst 1998; 123:2361-65
 11. Chalermchaikit T, Lertworapreecha, Poonsook K, Kantaprom S. CM-test : The antimicrobial residue screening test kit in meat, serum, and urine [online].

Available:http://lib.vet.chula.ac.th/Data_files/ebook/Research/CD_Research/54.pdf

; 2007. December 26.
 11. Wang Z, Zhu Y, Ding S, He F, Beier RC, Li J. Development of a Monoclonal Antibody-Based Broad-Specificity ELISA for Fluoroquinolone Antibiotics in Foods and Molecular Modeling Studies of Cross-Reactive Compounds. Anal Chem 2007; 79: 4471-83.
 12. Gerardo R, Haasnoot MW, Delahaut P, Gerçek H, Nielen MF. Dual biosensor immunoassay-directed identification of fluoroquinolones in chicken muscle by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. Anal Chim Acta 2007; 586: 259-68.
 - 13 รงคเลขาพิวบาง การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ปณัสดา พัฒนวิสิน พ.ศ. 2550
 14. Marvin CM. LC/MS a practical user's guide. A john wiley & son,INC; 2005
 15. Bogialli S, Corcia AD. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. Anal Bioanal Chem 2009.
 16. มาตรฐานตลาด กรมส่งเสริมการปกครองท้องถิ่น กระทรวงมหาดไทย ลำดับที่ 403
 17. Choma MI. TLC Separation of Fluoroquinolones: Searching for better selectivity. J Liq Chromatogr R T 2003; 26: 2673-85.

ภาคผนวก ก

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. นงลักษณ์ เรืองวิเศษ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ 02-6448677-91 ต่อ 5406, 5402 โทรสาร 02-644-8695

e-mail pynrw@mahidol.ac.th

ผู้ร่วมงานวิจัย

อาจารย์ ดร. ปิยนุช โรจน์สง่า ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ 02-6448677-91 ต่อ 5404 โทรสาร 02-644-8695

e-mail piyanuch043@yahoo.co.uk

น.ส. ทศนีย์ โชคเจริญรัตน์ กลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางเคมีฟิสิกส์ สำนักยาและ

วัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จ.นนทบุรี

โทรศัพท์ 02-951-0000 ต่อ 99154, 99145

e-mail tasanee@dmisc.moph.go.th

ที่ปรึกษาโครงการงานวิจัย

รศ.ดร. โอภา วัชรคุปต์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ 02-6448677-91 ต่อ 5401 โทรสาร 02-644-8695

e-mail pyovj@mahidol.ac.th

ภาคผนวก ข

รายชื่อแหล่งวัตถุดิบสำหรับตัวอย่างเนื้อไก่

ลำดับที่	รหัส	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	หมายเหตุ
1	M001	ตลาดสดราชวัตร	2/6/52	ตลาดสด
2	M002	ตลาดสดราชวัตร 2	2/7/52	ตลาดสด
3	M003	ตลาดสดราชวัตร 3	2/8/52	ตลาดสด
4	M004	เตาปูน 1	2/9/52	ตลาดสด
5	M006	ตลาดบางแค 1	7/6/52	ตลาดสด
7	M008	พระสมุทรเจดีย์ 2	7/8/52	ตลาดสด
8	M010	ตลาดบางแค2	7/9/52	ตลาดสด
9	M011	ตลาด อตก.1	7/10/52	ตลาดสด
10	M041	ตลาดสดมักกะสัน	14/06/52	ตลาดสด
11	M042	ตลาดสดมักกะสัน 2	14/06/52	ตลาดสด
12	M043	ตลาดสดห้วยขวาง	14/06/52	ตลาดสด
13	M044	ตลาดสดห้วยขวาง	14/06/52	ตลาดสด
14	M045	ตลาด แฮปปี้แลนด์ 1	14/06/52	ตลาดสด
15	M047	ตลาดโชคชัย 4 ร้านที่1	14/06/52	ตลาดสด
16	M048	ตลาดโชคชัย 4 ร้านที่2	14/06/52	ตลาดสด
17	M049	ตลาดบางกะปิ 1	14/06/52	ตลาดสด
18	M050	ตลาดบางกะปิ 2	14/06/52	ตลาดสด
19	M051	ตลาดบางจาก 1	14/06/52	ตลาดสด
20	M052	ตลาดบางจาก 2	14/06/52	ตลาดสด
21	M053	ตลาดอ่อนนุช 1	14/06/52	ตลาดสด
22	M054	ตลาดอ่อนนุช 2	14/06/52	ตลาดสด
23	M055	ตลาดสดพระโขนง1	14/06/52	ตลาดสด
24	M056	ตลาดบางเขน 1	16/06/52	ตลาดสด
25	M068	ตลาดธนบุรี 1	18/06/52	ตลาดสด

26	M069	ตลาดธนบุรี 2	18/06/52	ตลาดสด
27	M070	ตลาดบางขุนนนท์ 1	18/06/52	ตลาดสด
28	M071	ตลาดบางขุนนนท์ 2	18/06/52	ตลาดสด
29	M072	ตลาดชัยพฤกษ์	18/06/53	ตลาดสด
30	M073	ตลาดบางขุนศรี 2	18/06/52	ตลาดสด
31	M076	ตลาดสามย่าน 1	19/06/52	ตลาดสด
32	M081	ตลาดสี่พระยา 3	19/06/52	ตลาดสด
33	M090	ตลาดเจริญกรุง 3	19/06/52	ตลาดสด
34	M096	ตลาดสำเหร่ 1	22/06/52	ตลาดสด
35	M098	ตลาดสวนหลวง 1	24/06/52	ตลาดสด
36	M099	ตลาดสวนหลวง 2	24/06/52	ตลาดสด
37	M150	ตลาดแสงดาว 1	7/7/52	ตลาดสด
38	M151	ตลาดบางบอน 1	7/7/52	ตลาดสด
39	M152	ตลาดบางบอน 2	7/7/52	ตลาดสด
40	M159	ตลาดพระปิ่น 3 -2	8/7/52	ตลาดสด
41	M170	ตลาดสมภพ 2	11/7/52	ตลาดสด
42	M186	ตลาดห้วยขวาง 3	13/07/52	ตลาดสด
43	M214	ตลาดโพธิ์สามต้น 1	17/07/52	ตลาดสด
44	M215	ตลาดโพธิ์สามต้น 2	17/07/52	ตลาดสด
45	M222	ตลาดรัตนโกสินทร์ 200 ปี 1	19/07/52	ตลาดสด
46	M223	ตลาดรัตนโกสินทร์ 200 ปี 2	19/07/52	ตลาดสด
47	M227	ตลาดอตก. 2	19/07/52	ตลาดสด
48	M228	ตลาดอตก. 3	19/07/52	ตลาดสด
49	M229	ตลาดสะพานขาว 1	19/07/52	ตลาดสด
50	M233	ตลาดคลองแค 1	20/07/52	ตลาดสด
51	M244	ตลาดกลางบางใหญ่ 1	22/07/52	ตลาดสด
52	M246	ตลาดกลางบางใหญ่ 3	22/07/52	ตลาดสด
53	M005	โลตัสเตาปูน 1	2/6/52	ห้างสรรพสินค้า

54	M009	Big C พระประแดง 1	7/7/52	ห้างสรรพสินค้า
55	M022	Emporium 1	11/6/52	ห้างสรรพสินค้า
56	M023	Siam Paragon 1	11/6/52	ห้างสรรพสินค้า
57	M024	The Mall ท่าพระ 1	11/6/52	ห้างสรรพสินค้า
58	M025	โลตัส อ่อนนุช 1	11/6/52	ห้างสรรพสินค้า
59	M026	โลตัส พระราม 1	11/6/52	ห้างสรรพสินค้า
60	M074	Macro จรัญสนิทวงศ์	18/06/52	ห้างสรรพสินค้า
61	M075	Tops บางรัก 1	19/06/52	ห้างสรรพสินค้า
62	M147	โลตัสเตาปูน 2	7/7/52	ห้างสรรพสินค้า
63	M148	โลตัสบางแค2	7/7/52	ห้างสรรพสินค้า
64	M149	The Mallบางแค 2	7/7/52	ห้างสรรพสินค้า
65	M156	คาร์ฟูร์บางใหญ่	8/7/52	ห้างสรรพสินค้า
66	M171	Big C อ้อมใหญ่1	11/7/52	ห้างสรรพสินค้า
67	M178	โลตัสเอกซ์เพรส วัดใหญ่ใน คลองบางปลากด	12/7/52	ห้างสรรพสินค้า
68	M179	โลตัสเอกซ์เพรส วัดแคในคลอง บางปลากด	12/7/52	ห้างสรรพสินค้า
69	M190	Tops มานูญครอง	13/07/52	ห้างสรรพสินค้า
70	M195	โลตัสปิ่นเกล้า 14/07/52	14/07/52	ห้างสรรพสินค้า
71	M197	Save-E	14/07/52	ห้างสรรพสินค้า
72	M203	คาร์ฟูร์บางบอน	15/07/52	ห้างสรรพสินค้า
73	M211	โลตัส วัดไชยนิมพลี	16/07/52	ห้างสรรพสินค้า
74	M212	โลตัสเอกซ์เพรสวัดรางบัว	16/07/52	ห้างสรรพสินค้า
75	M216	โลตัสบางปะกอก	17/07/52	ห้างสรรพสินค้า
76	M217	Tops นครหลวง	17/07//52	ห้างสรรพสินค้า
77	M224	คาร์ฟูร์รามอินทรา	19/07/52	ห้างสรรพสินค้า
78	M225	คาร์ฟูร์ มีนบุรี	19/07/52	ห้างสรรพสินค้า
79	M226	Tops รังสิต	19/07/52	ห้างสรรพสินค้า

80	M104	ตลาดนัดวัดแค	24/06/52	ตลาดนัด
81	M174	ตลาดนัดหมู่บ้านหรรษา -1	11/7/52	ตลาดนัด
82	M176	ตลาดนัดแหลมฟ้าผ่า -1	12/7/52	ตลาดนัด
83	M181	ตลาดนัดวัดแค2	12/7/52	ตลาดนัด
84	M183	ตลาดนัดสุขสวัสดิ์	12/7/52	ตลาดนัด
85	M185	ตลาดนัดการเคหะดินแดง2	13/07/52	ตลาดนัด
86	M189	ตลาดนัดรามคำแหงซอย5	13/07/52	ตลาดนัด
87	M193	สี่แยกทศกัณฐ์2	14/07/52	ตลาดนัด
88	M194	ตลาดนัด Safe center	14/07/52	ตลาดนัด
89	M198	ตลาดนัดศาลาฯ 1	15/07/52	ตลาดนัด
90	M199	ตลาดนัดศาลาฯ 2	15/07/52	ตลาดนัด
91	M200	ตลาดนัดกระทุ่มล้ม	15/07/52	ตลาดนัด
92	M201	ตลาดนัดวัดอุดมรังสี 1	15/07/52	ตลาดนัด
93	M202	ตลาดนัดวัดอุดมรังสี 2	15/07/52	ตลาดนัด
94	M204	ตลาดนัดหมู่บ้านเศรษฐกิจ	15/07/52	ตลาดนัด
95	M205	ตลาดนัดเจ้าใหญ่ 1	15/07/52	ตลาดนัด
96	M206	ตลาดนัดเจ้าใหญ่ 2	15/07/52	ตลาดนัด
97	M207	ตลาดนัดหมู่บ้านพระปิ่น 2 -2	16/07/52	ตลาดนัด
98	M208	ตลาดนัดหมู่บ้านพระปิ่น 2 -3	16/07/52	ตลาดนัด
99	M209	ตลาดนัดวัดไชยนิมพลี 1	16/07/52	ตลาดนัด
100	M210	ตลาดนัดวัดไชยนิมพลี 2	16/07/52	ตลาดนัด
101	M219	ตลาดนัดหงส์1	17/07/52	ตลาดนัด
102	M235	ตลาดนัดสวนผัก	21/07/52	ตลาดนัด
103	M236	ตลาดนัดสวนผัก 2	21/07/52	ตลาดนัด
104	M237	ตลาดนัดอารีย์ ซอย7 -1	21/07/52	ตลาดนัด
105	M238	ตลาดนัดอารีย์ ซอย7 -2	21/07/52	ตลาดนัด
106	M240	ตลาดนัดวัดแก้ว 1	21/07/52	ตลาดนัด
107	M242	ตลาดนัดวัดมะลิ	21/07/52	ตลาดนัด

108	M243	ตลาดนัดวัดท่าพระ	21/07/52	ตลาดนัด
109	M247	ตลาดนัดวัดส้มเกลี้ยง 1	22/07/52	ตลาดนัด
110	M248	ตลาดนัดวัดส้มเกลี้ยง 2	22/07/52	ตลาดนัด
111	M249	ตลาดนัดข้างโพธิสาร	22/07/52	ตลาดนัด
112	M116	ตลาดนัดวัดน้อยใน 2	22/07/52	ตลาดนัด
113	M072	ชัยพฤกษ์1	18/06/52	ตลาดนัด
114	M141	วัดบางแวก	4/7/52	ตลาดนัด
115	M153	ตลาดบางแค	7/7/52	ตลาดนัด
116	M180	ซอยวัดใหญ่	12/7/52	ตลาดนัด
117	M239	ซอยศาสนา	21/07/52	ตลาดนัด

รายชื่อสถานที่สุ่มตัวอย่างไข่ไก่

ลำดับที่	รหัส	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	หมายเหตุ
1	E001	โลตัส เคาปูน	2/6/2552	ห้างสรรพสินค้า
2	E002	บางแค	7/6/2552	ตลาดสด
3	E003	บางขุนศรี	9/6/2552	ตลาดสด
4	E004	พระโขนง	14/6/2552	ตลาดสด
5	E005	พระโขนง	14/6/2552	ตลาดสด
6	E006	วงเวียนใหญ่	19/6/2552	ตลาดสด
7	E007	สะพานขาว	27/6/2552	ตลาดสด
8	E008	พุทธมณฑลสาย 2	29/6/2552	ตลาดนัด
9	E009	ตลาดพระปิ่น 3	8/7/2552	ตลาดสด
10	E010	เพชรเกษม ซ. 71	11/7/2552	ตลาดนัด
11	E011	รามคำแหง ซ. 5	13/7/2552	ตลาดนัด
12	E012	ตลาดนัดเซฟเซ็นเตอร์	14/7/2552	ตลาดนัด
13	E013	คาร์ฟู บางบอน	15/7/2552	ห้างสรรพสินค้า
14	E014	ซีพี เฟรชมาร์ค สาขาวัดฉิม	16/7/2552	ห้างสรรพสินค้า
15	E015	ตลาดสดสะพานขาว	19/7/2552	ตลาดสด
16	E016	โลตัส สามพราน	20/7/2552	ห้างสรรพสินค้า
17	E017	ตลาดสดไฟฟ้า นครชัยศรี	20/7/2552	ตลาดสด
18	E018	ตลาดสดกระทู้มแบน	20/7/2552	ตลาดสด
19	E019	Tops สาขามานูญครอง	6/8/2552	ห้างสรรพสินค้า
20	E020	ตลาดนัด ธนินทร 1	20/8/2552	ตลาดนัด
21	E021	ตลาดนัด ธนินทร 2	20/8/2552	ตลาดนัด
22	E022	ตลาดนัด ม.ไวก์เฮาส์ 1	20/8/2552	ตลาดนัด
23	E023	ตลาดนัด ม.ไวก์เฮาส์ 2	20/8/2552	ตลาดนัด
24	E024	ตลาดนัดเชียรรังสิต	20/8/2552	ตลาดนัด
25	E025	ตลาดนัดบ่อนไก่ 1	20/8/2552	ตลาดนัด

26	E026	ตลาดนัดบ่อนไก่ 2	20/8/2552	ตลาดนัด
27	E027	ตลาดนัดเมืองเอก 1	20/8/2552	ตลาดนัด
28	E028	ตลาดนัดเมืองเอก 2	20/8/2552	ตลาดนัด
29	E029	ตลาดสดประจักษ์พร 1	20/8/2552	ตลาดสด
30	E030	ตลาดสดประจักษ์พร 2	20/8/2552	ตลาดสด
31	E031	ตลาดสดรามอินทรา กม.4	20/8/2552	ตลาดสด
32	E032	ตลาดนัด (ช. รามอินทรา 34) 2	20/8/2552	ตลาดนัด
33	E033	ตลาดนัด (ช. รามอินทรา 34) 1	20/8/2552	ตลาดนัด
34	E034	ตลาดสดลำลูกกา	20/8/2552	ตลาดสด
35	E035	ตลาดสดปากคลองตลาด 1	20/8/2552	ตลาดสด
36	E036	ตลาดสดปากคลองตลาด 2	20/8/2552	ตลาดสด
37	E037	ตลาดสดสี่มุมเมือง	20/8/2552	ตลาดสด
38	E038	ตลาดสดยิ่งเจริญ	20/8/2552	ตลาดสด
39	E039	ตลาดนัดท่าพรานนก	20/8/2552	ตลาดนัด
40	E040	ตลาดสดรามอินทรา กม.2	20/8/2552	ตลาดสด
41	E041	ตลาดสดสำเหร่	21/8/2552	ตลาดสด
42	E042	ตลาดสดเงินวิจิตร	21/8/2552	ตลาดสด
43	E043	ตลาดสด สน. พลับพลาไชย	21/8/2552	ตลาดสด
44	E044	ตลาดสดบางแค	21/8/2552	ตลาดสด
45	E045	ตลาดสดวงเวียนใหญ่	21/8/2552	ตลาดสด
46	E046	ตลาดสดคลองเตย	21/8/2552	ตลาดสด
47	E047	ตลาดสดบางขุนศรี	22/8/2552	ตลาดสด
48	E048	ตลาดสดสีลม	25/8/2552	ตลาดสด
49	E049	ตลาดพงษ์เพชร	25/8/2552	ตลาดสด
50	E050	ตลาดอมรพันธ์	25/8/2552	ตลาดสด
51	E051	ตลาดมิ่งขวัญ	25/8/2552	ตลาดสด
52	E052	ตลาดสมโชค	25/8/2552	ตลาดสด
53	E053	ตลาดท่าหน้าเมืองนนท์	25/8/2552	ตลาดสด

54	E054	ตลาดประชาชนเวสน์ 3	25/8/2552	ตลาดสด
55	E055	ตลาดลาดพร้าว (อุดมลาภ)	25/8/2552	ตลาดสด
56	E056	ตลาดไท	25/8/2552	ตลาดสด
57	E057	ตลาดห้วยขวาง	25/8/2552	ตลาดสด
58	E058	ตลาดสารธร	25/8/2552	ตลาดสด
59	E059	ตลาดลาดพร้าว กม.8	27/8/2552	ตลาดสด
60	E060	ตลาดอุดมสุข	27/8/2552	ตลาดสด
61	E061	ตลาดโชคชัย 4	27/8/2552	ตลาดสด
62	E062	ตลาดบางจาก	27/8/2552	ตลาดสด
63	E063	ตลาดบางกะปิ	27/8/2552	ตลาดสด
