

ชัยเทพ พูลเขตต์ : การประยุกต์ใช้ ไฮเปอร์ฟอร์แมนซิลิคิดโครมาโทกราฟี สำหรับตรวจการตกค้างของ ไดเอทิลstilbestrol และเฮกโซเอสโตรล ในเนื้อไก่. (THE APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETECTING DIETHYLSTILBESTROL AND HEXOESTROL RESIDUES IN CHICKEN MEAT) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย; 62 หน้า. ISBN 974-17-5514-7.

ไดเอทิลstilbestrol (Diethylstilbestrol; DES) และเฮกโซเอสโตรล (Hexoestrol) เคยถูกนำมาใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ปีก แต่ปัจจุบันถูกห้ามใช้เนื่องจากฤทธิ์ในการก่อมะเร็งทั้งในมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามก็ยังพบว่ามี การลักลอบนำมาใช้เป็นสารช่วยเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ปีกในบางพื้นที่ของหลายประเทศ จึงได้มีการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์เพื่อเฝ้าระวังการตกค้างในเนื้อเยื่อและสิ่งคัดหลั่งจากสัตว์หลายเทคนิค แต่ยังไม่มียุทธวิธีในการวิเคราะห์ใดที่เป็นมาตรฐาน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค ไฮเปอร์ฟอร์แมนซิลิคิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ในการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของ DES และ Hexoestrol ในเนื้อไก่ โดยการทดลองที่ 1 เป็นการทดลองหาสภาวะของเครื่อง HPLC ด้วยสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol จากการทดลองพบว่าการใช้ HPLC column ชนิด C₁₈ ODS2 Spherisorb[®] (ขนาด 5 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 mm ยาว 250 mm) เฟสเคลื่อนที่เป็น Methanol : Water (65 : 35) ความเร็วเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ Ultraviolet-Visible detector ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร จะให้ Retention time ของ DES และ Hexoestrol ที่ 8.123 – 8.287 และ 9.206 – 9.396 นาที ตามลำดับ การทดลองที่ 2 เป็นการเก็บสารสังเคราะห์ที่มีการลักลอบใช้ในการ เลี้ยงไก่ในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 7 แหล่ง มาวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อระบุชนิดและปริมาณของตัวยา จากการทดลองพบว่าทุกแหล่งมี Hexoestrol เป็นสารออกฤทธิ์ทั้งหมด และมี 6 จาก 7 แหล่งที่มีปริมาณน้อยกว่าที่ระบุไว้ ข้างขวด การทดลองที่ 3 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของการสกัดและวิธีวิเคราะห์การตกค้างของ Hexoestrol ในกล้ามเนื้อด้วย HPLC ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (พีพีเอ็ม) ลงในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่จากกลุ่มควบคุม พบว่ามีอัตราการคืนกลับของสาร เป็น 81.02 - 87.75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการฆ่าและไถอายุ 38 วัน ที่ทำการฝังตัวยา Hexoestrol จากแหล่งที่ระบุความเข้มข้นเป็น 20 มิลลิกรัมต่อเนื้อ หรือกลุ่มควบคุม ครึ่งละ 12 ตัว (แบ่งเป็นไก่ตัวผู้ 6 ตัว และไก่ตัวเมีย 6 ตัว) เพื่อเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อหลังจากฝังยาวันที่ 14, 21, 28 และ 35 แล้วนำตัวอย่างกล้ามเนื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้าง และจากตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ทั้งหมด 144 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้างในกล้ามเนื้อรวมทั้งสิ้น 3 ตัวอย่าง โดยมีระดับการตกค้างที่ตรวจพบเป็น 0.20 – 0.23 ไมโครกรัมต่อเนื้อไก่ประมาณ 5 กรัม โดยมี Limit of Detection ที่ 0.139 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร Limit of Quantitation ที่ 0.422 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC มี ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์การตกค้างที่ระดับความเข้มข้นสูง เช่น การวิเคราะห์จากตัวยาโดยตรง แต่การวิเคราะห์เพื่อหา ระดับการตกค้างในเนื้อไก่จำเป็นต้องพัฒนาต่อไป

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....*กช.กน พ.ก.กน*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*พ.ก.กน พ.ก.กน*

KEY WORD : DIETHYLSTILBESTROL / HEXOESTROL / CHICKEN MEAT / RESIDUES / HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

CHAITHEP POOLKHET : THE APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETECTING DIETHYLSTILBESTROL AND HEXOESTROL RESIDUES IN CHICKEN MEAT. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. BENJAMAS PUTTAMALAI, D.V.M., Ph.D. 62 PP. ISBN 974-17-5514-7.

Diethylstilbestrol (DES) and hexoestrol had been extensively used as potent growth promoters in livestock, but the uses were banned due to their carcinogenic effects in human and animals. However, these compounds are still available illegally in the markets of certain countries and mostly used for promoting growth of poultry. There are several analytical methods developed for detecting the residues of these compounds in animal tissue and fluids. However, there is no standard method available yet. Therefore, the purpose of this present study was to apply the isolation and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) techniques for determining the residues of DES and hexoestrol in chicken meat. In the first experiment, the HPLC condition suitable for detecting DES and hexoestrol was determined. It was found that the condition of which C₁₈ ODS2 Spherisorb[®] HPLC column (5 μ ; 4.6 mm in diameter 250 mm in length), methanol : water (65 : 35) as mobile phase at flow rate of 1.5 ml/min, and Ultraviolet-Visible detector at 230 nm was able to detect the peaks of DES and hexoestrol at the retention time of 8.123 – 8.287 min and 9.206 – 9.396 min, respectively. In the second experiment, the HPLC technique was used to identify the active compound in the hormone pellets collected from 7 black markets in the central part of Thailand. All of samples were found to contain only hexoestrol as an active ingredient, and 6 of 7 samples contained lower contents of hexoestrol than their label claimed. In the third experiment, the HPLC technique was applied together with an isolation technique for detecting the content of hexoestrol residue in chicken meat. The recovery rate of hexoestrol was found to be 81.02 – 87.75 % when 4 μ g/ml (ppm) of standard hexoestrol was added to the meat of a control group. The treatment chicken were subcutaneously implanted with hexoestrol pellets (20 mg/pellet) at 38 days old chicks. Twelve chickens (6 males and 6 females) were sacrificed on day 14, 21, 28 and 35 after the implantation. From the total number of 144 samples, only 3 samples were found to contain hexoestrol residue level ranged from 0.20 to 0.23 μ g per 5 g. The limit of detection was 0.139 μ g/ml and the limit of quantitation was 0.422 μ g/ml. In conclusion, the above HPLC condition can be used for determining the DES and hexoestrol at high concentration, such as in a pellet, but its efficiency for determining the hexoestrol in tissue needs further investigation.

Department of Veterinary Public Health

Field of study Veterinary Public Health

Academic year 2003

Student's signature.....*Chaithep Poolkhet*

Advisor's signature.....*Benjamas Puttamalai*