บทที่ 3
ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

สารเคมีและอุปกรณ์

1. Methanol, HPLC grade (Scharlau, Spain)
2. Acetonitrile, HPLC grade (LEDA, Spain)
3. Formic acid, AR grade (Carlo erba, Germany)
4. tert-Butylmethylether, AR grade (Merck, Germany)
5. Ethanol 95% (องค์การสุรา กรมสรรพสามิตร จังหวัดฉะเชิงเทรา)
6. Ammonium formate (Carlo erba, Germany)
7. สารมาตรฐานอ้างอิง Mestanolone (100.00 % on dried basis)
8. สารมาตรฐานใช้ Finasride (99.50 % on dried basis)
9. เนื้อเยื่อลูกปลานิล
10. น้ำแข็งแห้ง

เครื่องมือ

1. High Performance Liquid Chromatography System (Shimadzu, Kyoto, Japan) และ Triple Quadrupole Mass Spectrometer ซึ่งประกอบไปด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ดังต่อไปนี้
    - LC-20AD vp Shimadzu Liquid Chromatograph (High Pressure Mixed Binary Gradient Pump)
    - DGU-20A_3 Shimadzu Degasser
    - SIL-20AC vp Shimadzu Autoinjector
    - CTO-20A vp Shimadzu Column Oven
    - API 4000 Mass Spectrometer System
    - Analyst Software ver. 4.4.2
    - C18 Column, 4.6 x 150 mm, 5μ (HiQ Sil or AllTech)
2. pH meter (Beckman Φ 450, USA)
3. Liquid Chromatography Mass Spectrometry, LC-MS (Saturn-4D, Varian, USA)
4. Centrifuge (Jouan S.A., France)
5. SpeedVac Concentrator (Thermo Electron Corporation, USA)
6. Ultrasonic cleanser (Elma GmBH & Co. KG. Demmark)
7. Vortex mixer (Jouan S.A., France)
8. Freezer (Jouan S.A., France)

9. Milli-Q gradient (Millipore Corporation, France)
10. Analytical Balance (Mettler Toledo AG, Switzerland)

ในการศึกษานี้จะแบ่งการทำงานออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ ส่วนที่ 1 การเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิลโดยใช้ฮอร์โมนเมสทาโนโลน และส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิล ซึ่งจะกล่าวถึงรายละเอียดต่อไป

ส่วนที่ 1 การเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิลโดยใช้ฮอร์โมนเมสทาโนโลน

ศึกษาวิธีการเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิล โดยทำการศึกษาในปลานิล Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลระดับ GAP (Good Agricultural Practices) จ.ฉะเชิงเทรา ประเทศไทย ด้วยวิธีการให้ฮอร์โมนผสมอาหาร ตลอดจนวิธีการในการ ตรวจคัดแยกเพศในปลานิล ด้วยการศึกษาดูเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ทั้งระดับมหภาค และจุลกายวิภาคเพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ

การให้อาหารผสมฮอร์โมนแก่ลูกปลานิล

1.การเตรียมอาหารผสมฮอร์โมน

ทำการละลายฮอร์โมนเมสทาโนโลนใน 95 % เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) จะได้เป็น stock solution ซึ่งจะนำมาผสมกับอาหารปลานิลตามวิธีการของ National Freshwater Fisheries Technology Center (2000)

1.1 เตรียมพื้นที่บริเวณที่จะผสมอาหารให้สะอาดและแห้ง
1.2 นำฮอร์โมนเมสทาโนโลนปริมาณ 8 กรัม มาละลายลงใน 95 % เอทิลแอลกอฮอล์ที่มีปริมาตร 1 ลิตร ในขั้นตอนนี้จะได้สารสะลายฮอร์โมนเข้มข้นเป็น stock solution เก็บไว้ในขวดทึบแสง
1.3 นำสารละลายในข้อ 1.2 มา 10 ml เติมลงใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ซึ่งมีปริมาตร 500 ml แล้วคนให้เข้ากันอย่างช้าๆ
1.4 สเปรย์สารละลายที่ได้จากข้อ 1.3 ลงบนอาหารปลานิลปริมาณ 1,000 g แล้วทำการคลุกด้วยมือทิ้งไว้ให้แอลกอฮอล์ระเหยที่อุณหภูมิห้อง ในที่ที่ไม่มีแสงส่องถึง จะได้อาหารที่มีปริมาณฮฮร์โมนเมสทาโนโลนเข้มข้นเท่ากับ 80 mg/kg อาหาร
1.5 นำอาหารผสมฮอร์โมนบรรจุลงในถุงหรือภาชนะที่แห้งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ภายใต้สภาวะที่แห้งและทึบแสงเพื่อเก็บรักษาไว้รอการนำไปใช้ต่อไป

2. การให้อาหารผสมฮอร์โมน

ลูกปลานิลในระยะที่ถุงไข่แดงยุบและลูกปลาสามารถว่ายน้ำได้จากโรงเรือนเพาะฟักจะถูกย้ายเข้าสู่โรงเรือนอนุบาลควบคุมสภาวะแวดล้อมการเลี้ยงตลอดการทดลอง โดยมีอุณหภูมิประมาณ 26-28 °C ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ที่ 7.0-8.0 ค่าแอมโมเนีย (NH_3) อยู่ระหว่าง 0.00-0.50 และค่าไนไตร์ท (Nitrite) อยู่ระหว่าง 0.00-0.25 โดยจะให้เริ่มให้อาหารผสม ฮอร์โมนเมสทาโนโลนขนาด 80 mg/kg อาหาร การให้อาหารจะแบ่งอาหารเป็น 3 มื้อ ให้นานเป็นระยะเวลา 23 วัน หลังจากนั้นปลานิลจะถูกเลี้ยงต่อไปด้วยอาหารปกติ

การประเมินผลการแปลงเพศปลานิลด้วยการกินอาหารผสมฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน

นำปลานิลที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนในขนาด 80 mg/kg อาหาร เป็นระยะเวลา 23 วัน มาทำการตรวจดูเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ด้วยวิธีการ (gonadal squash technique) ซึ่งใช้สีย้อมอะซีโตคามีน (aceto-carmine stain) และวิธีการทางจุลพยาธิวิทยา

1. วิธีการตรวจเพศด้วยวิธีการ (gonadal squash technique) ใช้สีย้อมอะซีโตคามีน (aceto-carmine stain) (นวลมณี, 2537)

1.1 นำปลานิลที่ได้รับฮอร์โมน 21-23 วัน มาทำการการุณยฆาต (euthanasia) ก่อน แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเปิดเอาเนื้อบริเวณช่องท้องออกจะเห็นอวัยวะภายใน

1.2 ใช้กรรไกรตัดเอาอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งเป็นเส้นยาวสีขาวสองเส้นยึดติดกับผนังช่องท้องภายในออกมาวางบนแผ่นสไลด์ที่ทำการหยดสีอะซีโตคามีนเตรียมไว้ก่อนแล้ว

1.3 นำสไลด์อีกแผ่นมาปิดทับพร้อมออกแรงกด

1.4 ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า หรือ 100 เท่า

2. วิธีการตรวจเพศด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology)

2.1 ใช้แอลกอฮอล์ 70 % เช็ดบริเวณที่จะเก็บตัวอย่างและตัดขวางกลางลำตัวปลานิลที่ได้รับฮอร์โมน 21-23 วัน ด้วยมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผ่านอวัยวะระบบสืบพันธุ์ให้ได้ขนาดประมาณ 2 x 2 x 1 cm ใส่ใน 10 % formalin ปริมาตร 10 เท่าของตัวอย่างชิ้นเนื้อเป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยา formalin แทรกเข้าเนื้อเยื่อได้ทั่วถึง

2.2 การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา โดยการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) มีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 นำชิ้นเนื้อในข้อ 2.2.1 แช่ในสารละลายเรียงตามลำดับ ดังนี้

- แช่ในเอทานอล 70 % ไว้นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ในเอทานอล 85 % ไว้นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ในเอทานอล 95 % ขวดที่หนึ่ง ไว้นาน 1 ชั่วโมง

- แช่ในเอทานอล 95 % ขวดที่สอง ไว้นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ในเอทานอล 95 % ขวดที่สาม ไว้นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ในเอทานอล 100 % ขวดที่หนึ่ง ไว้นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ในเอทานอล 100 % ขวดที่สอง ไว้นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ในเอทานอล 100 % ขวดที่สาม ไว้นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ในไซลีนหรือสารทดแทนไซลีน ขวดที่หนึ่ง ไว้นาน 1.5 ชั่วโมง
- แช่ในไซลีนหรือสารทดแทนไซลีน ขวดที่สอง ไว้นาน 1.5 ชั่วโมง

2.2.2 นำชิ้นเนื้อในข้อ 2.2.2.1 แช่ในพาราฟินเหลวที่อุ่น ขวดที่หนึ่งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วแช่ต่อในพาราฟินเหลว ขวดที่สองอีก 2 ชั่วโมง

2.2.3 นำชิ้นเนื้อวางลงใน embedding mold ที่มีพาราฟินเหลว วางบล็อคบนชิ้นเนื้อแล้วเท พาราฟินเหลวให้เต็มบล็อค วางบนถาดที่เย็น (cool tray) จนพาราฟินแข็งตัว แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2.4 ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังในแท่งพาราฟินด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 4 μm ถึง 5 μm แล้วจัดวางบนสไลด์

2.3 การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาย้อมสี H&E มีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 ละลายพาราฟินออกจากแผ่นเนื้อเยื่อบนสไลด์ โดยแช่ในไซลีนหรือสารทดแทนไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

2.3.2 แช่สไลด์เนื้อเยื่อในเอทานอลสัมบูรณ์ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

2.3.3 ล้างสไลด์เนื้อเยื่อด้วยน้ำไหลผ่าน นาน 2 นาที ถึง 5 นาที

2.3.4 จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในสีฮีมาทอกซิลีน นาน 3 นาที

2.3.5 ล้างสไลด์เนื้อเยื่อด้วยน้ำไหลผ่าน นาน 5 นาที ถึง 10 นาที

2.3.6 จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในสีอีโอซิน นาน 3 นาที

2.3.7 ล้างสไลด์เนื้อเยื่อด้วยน้ำไหลผ่าน

2.3.8 ขจัดน้ำออกจากสไลด์เนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 70%

2.3.9 ขจัดน้ำออกจากสไลด์เนื้อเยื่อด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที ถึง 2 นาที

2.3.10 แช่ใน alcohol/clearance 50/50 นาน 1 นาที ถึง 2 นาที

2.3.11 แช่ในไซลีนหรือสารทดแทนไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

2.3.11 หยดเพอร์เมาต์ (permount) 1 หยด ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์

2.3.13 นำสไลด์เนื้อเยื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิล

ในการการหาวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิลนั้น ไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

2.1 การศึกษาคุณลักษณะตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลน (mestanolone raw material)

2.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนที่ตกค้างในเนื้อเยื่อลูกปลานิล

2.3 การกำหนดแผนการให้อาหารลูกปลา และ การเก็บตัวอย่างลูกปลา

2.4 กระบวนเตรียมตัวอย่างเนื้อปลานิลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์และการวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของเมสทาโนโลน

2.1 การศึกษาคุณลักษณะตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลน (mestanolone raw material)

ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะและคุณภาพของสารวัตถุดิบฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน ซึ่งในการศึกษานี้ได้ใช้ สารเมสทาโนโลน ซึ่งเป็นสารหนึ่งในกลุ่มฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน ขั้นตอนวิธีการศึกษาคุณลักษณะของวัตถุดิบก่อนนำมาใช้งานดำเนินการตามวิธีการของ The United States Pharmacopiea (2009) ในหัวข้อต่างๆ ดังนี้

2.1.1. การศึกษาลักษณะทางภายภาพภายนอก (appearance)

2.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ด้วยวิธีอินฟาเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR)

2.1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำ (water content) ด้วยวิธี Karl Fischer Titration

2.1.4. การวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (melting point) ด้วยวิธี differential scanning calorimetry (DSC)

2.1.5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (assay) ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

2.1.1 การศึกษาลักษณะทางภายภาพภายนอก (appearance)

ทำการชั่งตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลน ที่ต้องการศึกษามาประมาณ 2.0 กรัม ใน Petri-dish และสังเกตโดยเปรียบเทียบกับพื้นหลังที่เป็นสีดำ

2.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ด้วยวิธีอินฟาเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR)

ทำการชั่งตัวอย่างสารมาตรฐานเมสทาโนโลน และตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลน ประมาณ 2.0 ถึง 5.0 mg วางลงบน universal ATR sampling accessory ของเครื่อง FT-IR spectrophotometer หมุนหัววัดให้กดลงบนผงตัวอย่างและวัด IR Absorption ในช่วง 4,000 cm^{-1} ถึง 400 cm^{-1} บันทึก IR spectrum ของสารมาตรฐานเมสทาโนโลน และตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลน ภายใต้สภาวะในการ

ตรวจสอบที่เหมือนกัน เปรียบเทียบ IR spectrum ของตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลน กับสารมาตรฐานเมสทาโนโลน

2.1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำด้วยวิธี Karl Fischer Titration (Kestens *et al.*, 2008)

การหาค่า Titer ของ Karl Fischer Reagent

เติม dehydrated methyl alcohol ปริมาตร 40 ml ลงใน titration vessel รอจน neutralization สมบูรณ์ เติม purified water ประมาณ 10 mg จากนั้น titrate ด้วย Karl Fisher Reagent จนกระทั่งถึง end-point ทำซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาค่า Titer โดยใช้สูตรคำนวณดังต่อไปนี้

$$\text{Titer} = (\text{Wt} \times 1000) / \text{EP}$$

กำหนดให้

Titer = ปริมาณของ Karl Fischer Reagent ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับน้ำ 1 g (mg/ml)

Wt = น้ำหนักของน้ำ (g)

EP = ปริมาณของ Karl Fischer Reagent ที่ใช้ไปจนถึงจุดยุติ (ml)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การคำนวณปริมาณน้ำในตัวอย่าง

เติม dehydrated methyl alcohol ประมาณ 40 ml ลงใน titration vessel รอจน neutralization สมบูรณ์ ชั่งตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลนอย่างถูกต้องแม่นยำประมาณ 150 mg เติมลงใน titration vessel อย่างรวดเร็ว จากนั้น titrate ด้วย Karl Fisher Reagent จนกระทั่งถึง end-point ทำซ้ำ 2 ครั้ง คำนวณหาปริมาณน้ำในตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลน เป็น%โดยใช้สูตรคำนวณดังต่อไปนี้

$$\%\ \text{water in sample} = (\text{EP} \times \text{Titer} \times 100) / \text{Wt} \times 1000$$

กำหนดให้

Titer = ปริมาณของ Karl Fischer Reagent ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับน้ำ 1 g (mg/ml)

Wt = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

EP = ปริมาณของ Karl Fischer Reagent ที่ใช้ไปจนถึงจุดยุติ (ml)

2.1.4 การวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (melting point) ด้วยวิธี differential scanning calorimetry (DSC)

ทำการชั่งตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลนประมาณ 5 mg ใส่ลงใน aluminium sample pan ขนาด 40 µl จากนั้นปิดฝา นำไปวางใน sample chamber ทำการบันทึก DSC thermogram ของตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลน โดยตั้งช่วงอุณหภูมิ (temperature range) ตั้งแต่ 25°C ถึง 250°C ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (heating rate) ที่ 10°C ต่อนาที

2.1.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (assay) ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานเมสทาโนโลนและตัวอย่างวัตถุดิบเมสทาโนโลนใน acetonitrile ให้มีความเข้มข้น 1 mgต่อml ฉีดสารละลายเข้า HPLC โดยใช้ chromatographic condition คือ คอลัมน์ชนิด Alltech Altima C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm) ที่อุณหภูมิ 35°C มีเฟสเคลื่อนที่เป็น H2O: Acetonitrile: Methanol = 26: 14: 60 ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min และตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 200 nm โดยมีปริมาตรการฉีดเท่ากับ 10 µl บันทึก chromatogram และ peak area ของสารละลายที่ฉีด และคำนวณหาปริมาณของเมสทาโนโลน โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

%Assay = (PAun/PAstd) x (Concstd / Concun) x % purity ของสารมาตรฐานเมสทาโนโลน

กำหนดให้

PAstd = peak area ของสารละลายของสารมาตรฐาน

PAun = peak area ของสารสารละลายของสารตัวอย่าง

Concstd = ความเข้มข้นของสารละลายของสารมาตรฐาน

Concun = ความเข้มข้นของสารสารละลายของสารตัวอย่าง

%purity ของสารมาตรฐานเมสทาโนโลน = 98%

2.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อลูกปลานิล

2.2.1 การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test)

เตรียมสารละลายมาตรฐานอ้างอิงผสมของเมสทาโนโลน (mestanolone) และ ไฟแนสเตอไรด์ (finasteride) ใน acetonitrle ให้มีความเข้มข้นของเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเตอไรด์ เป็น 5 ng/g และ 50 ng/g ตามลำดับ วิเคราะห์สารละลายผสมของสารมาตรฐานจำนวน 5 ครั้ง เข้า LC-MS system โดยใช้ chromatographic condition ดังต่อไปนี้

การเตรียม mobile phase โดย ชั่ง 0.3153 g ของ แอมโมเนียม ฟอร์เมตในภาชนะ 1000 ml และละลายด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (ionized water) จากนั้นปรับพีเอชให้เป็น 3.5 ด้วยกรดฟอร์มิก

Column	: Alltech Alltima C8 (4.6x100 mm, 5µm)
Mobile phase	: 5 mm Ammonium formate pH 3.5: Acetonitrile
Flow rate	: 0.8 ml/min
Detection	: mass spectrometer
Injection volume	: 10 µl
Column temperature	: 30 ºC
Auto sampler temperature	: 4 ºC
Mass detection	: 305.3/269.3 สำหรับเมสทาโนโลน
	: 373.5/355.4 สำหรับไฟแนสเตอไรด์

บันทึก LC-MS chromatogram บันทึก retention time, peak area, resolution และ tailing factor จากนั้นคำนวณ % CV ของพารามิเตอร์

2.2.2 การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) และความเที่ยงตรง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นใน acetonitrile เพื่อเตรียม standard curve ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 100, 150, และ 200 ng/ml ตามลำดับ และ เตรียมสารละลายมาตรฐานไฟแนสเตอไรด์เข้มข้น สำหรับเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 500 ng/ml นำสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น จำนวน 50 µl และ สารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) 500 ng/ml จำนวน 50 µl เติมลงไปในเนื้อเยื่อปลานิลที่บดปั่นกับน้ำแข็งแห้ง (dried ice) จำนวน 1 g สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และ ปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

อุณหภูมิ 10°C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และ นำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial และ วิเคราะห์ด้วย LC-MS โดยใช้ chromatographic condition ในข้อ 2.2.1 บันทึก LC-MS chromatogram และ peak area ของสารละลาย

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นใน acetonitrile ให้มีความเข้มข้นเป็น 20, 100 และ 150 ng/ml สำหรับเป็น quality control sample (QC sample) โดยเตรียมความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง สำหรับการตรวจสอบความถูกต้อง และ ความแม่นยำในช่วงวัน (intra-day accuracy and precision) และ เตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง สำหรับการตรวจสอบความถูกต้อง และ ความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day accuracy and precision) โดยมีไฟแนสเตอไรด์เป็นสารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 25 ng/g นำสารละลายมาตรฐานใช้งานเข้มข้นเมสทาโนโลนความเข้มข้นต่างๆ มาจำนวน 50 µl และ สารละลายมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) จำนวน 50 µl เติมลงไปในเนื้อเยื่อปลานิลที่บดปั่นกับน้ำแข็งแห้ง (dried ice) จำนวน 1 g สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และ ปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และ นำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial และ วิเคราะห์ด้วย LC-MS โดยใช้ chromatographic condition ในข้อ 2.2.1 บันทึก LC-MS chromatogram และ peak area ของสารละลาย

คำนวณหาความเข้มข้นจริงของสารละลายมาตรฐานใช้งานที่เติม (additional actual concentration) และ ความเข้มข้นที่ได้จากการวิเคราะห์ (observed concentration) ซึ่งความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงโดย %recovery ของเมสทาโนโลน เมื่อพิจารณาจาก standard curve และ quality control sample ส่วนความแม่นยำแสดงโดย %CV ของ quality control sample ของการทำซ้ำใน ช่วงวัน และ การทำซ้ำระหว่างวัน โดยสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ recovery} = (\text{observed concentration} / \text{actual concentration}) \times 100$$

$$\% \text{ CV} = (\text{standard deviation} / \text{mean}) \times 100$$

2.2.3 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงความเข้มข้น (range) ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (method linearity) และช่วงความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณเมสทาโนโลน ที่ความเข้มข้นของสารละลายเมสทาโนโลนที่สกัดจากเนื้อลูกปลา ต่างๆ กัน 7 ระดับ ได้แก่ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.5 และ 10.0 ng/g โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง โดยนำอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของเมสทาโนโลน กับ ไฟแนสเตอไรด์ (peak area ratio) กับ ความเข้มข้นทั้งหมด 7 ความเข้มข้นของเมสทาโนโลน (0.5-10 ng/g) มาวิเคราะห์ โดยใช้ linear equation ($y = ax + b$) และ weighing ($1/x^2$) จะได้เส้นตรง จึงหาค่า slope, y-intercept และ r^2

2.2.4 การตรวจสอบ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานใช้งานเข้มข้นใน acetonitrile เพื่อเตรียม standard curve ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 100, 150, และ 200 ng/ml ตามลำดับ และ เตรียมสารละลายมาตรฐานไฟแนสเตอไรด์เข้มข้น สำหรับเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 500 ng/ml นำสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น จำนวน 50 µl และ สารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) จำนวน 50 µl เติมลงไปในเนื้อเยื่อปลานิลที่บดกับน้ำแข็งแห้ง (dried ice) จำนวน 1 g สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และ ปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และนำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial และ วิเคราะห์ด้วย LC-MS โดยใช้ chromatographic condition ในข้อ 2.2.1 บันทึก LC-MS chromatogram และ peak area ของสารละลาย

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นใน acetonitrile ให้มีความเข้มข้น 10 ng/ml ซึ่งเป็น limit of detection (LOD) โดยเตรียมความเข้มข้นละ 5 ชุด และเตรียมสารละลายมาตรฐานไฟแนสเตอไรด์เข้มข้น สำหรับเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 10 ng/ml สารละลายมาตรฐานใช้งานเข้มข้นเมสทาโนโลนที่ความเข้มข้นต่างๆ มาจำนวน 50 µl และ สารละลายมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) จำนวน 50 µl เติมลงไปในเนื้อเยื่อปลานิลที่บดกับน้ำแข็งแห้ง (dried ice) จำนวน 1 g สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และ ปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไป

ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และ นำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial วิเคราะห์ด้วย LC-MS ตัวอย่างละ 1 ครั้ง โดยใช้ chromatographic condition ในข้อ 2.2.1 บันทึก LC-MS chromatogram และ peak area ของสารละลาย บันทึก LC-MS chromatogram และ peak area ของสารละลาย

2.2.5 การตรวจสอบการกลับคืนของการสกัดเมสทาโนโลนและไฟแนสเตอไรด์จากเนื้อเยื่อปลานิล (recovery of extraction)

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานใช้งานเข้มข้นใน acetonitrile เพื่อเตรียม standard curve ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 100, 150, และ 200 ng/ml ตามลำดับ และ เตรียมสารละลายมาตรฐานไฟแนสเตอไรด์เข้มข้น สำหรับเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 500 ng/ml นำสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น จำนวน 50 µl และ สารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) จำนวน 50 µl เติมลงไปในเนื้อเยื่อปลานิลที่บดกับน้ำแข็งแห้ง (dried ice) จำนวน 1 g สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และ ปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และนำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นใน acetonitrile ให้มีความเข้มข้นเป็น 20, 100 และ 150 ng/ml สำหรับเป็น quality control sample (QC sample) และ เตรียมสารละลายไฟแนสเตอไรด์เป็นสารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 500 ng/ml นำสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 50 µl และ สารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) จำนวน 50 µl เติมลงไป ในเนื้อปลานิลตัวอย่างละ 1 g สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และ ปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และ นำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial จากนั้นวิเคราะห์สารละลายสำหรับเตรียม standard curve และ quality control sample ที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น ที่ผ่านการสกัดจากเนื้อเยื่อปลานิล และ ไม่ผ่านการสกัดจากเนื้อเยื่อปลานิล ตัวอย่างละ 1 ครั้ง ด้วย LC-MS โดยใช้ chromatographic condition ในข้อ 2.2.1 บันทึก LC-MS chromatogram และ peak area ของสารละลาย

$$\text{ร้อยละการกลับคืนของการสกัด} = \frac{\text{Peak area ของสารที่ผ่านการสกัดจากเนื้อปลานิล}}{\text{Peak area ของสารที่ไม่ผ่านการสกัดจากเนื้อปลานิล}} \times 100$$

2.2.7 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานอ้างอิงเมสทาโนโลนเข้มข้นใน acetonitrile ให้มีความเข้มข้น 150 ng/ml และเตรียมสารละลายมาตรฐานไฟแนสเตอไรด์เป็นสารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 500 ng/ml จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้น มาจำนวน 50 µl และ สารละลายมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) จำนวน 50 µl เติมลงไปในเนื้อเยื่อปลานิล บดกับน้ำแข็งแห้ง (dried ice) จำนวน 1 กรัม สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และ ปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และนำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และนำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial และ วิเคราะห์สารละลายด้วยด้วย LC-MS โดยใช้ chromatographic condition ในข้อ 2.2.1

เตรียมสารละลาย placebo โดยนำเนื้อเยื่อปลานิล จำนวน 1 g ที่เติม acetonitrile 50 µl และ สารมาตรฐานภายในไฟแนสเตอไรด์เข้มข้น 500 ng/ml จำนวน 50 µl สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาทีและนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge)ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 10°C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลน ถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube

และนำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial วิเคราะห์สารละลายชั้นบนของ placebo ด้วย LC-MS โดยใช้ chromatographic condition ในข้อ 2.2.1 บันทึก LC-MS chromatogram และ peak area ของสารละลาย

2.3 การกำหนดแผนการให้อาหารลูกปลา และ การเก็บตัวอย่างลูกปลา

การเก็บตัวอย่างของลูกปลานิลที่ให้อาหารซึ่งผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลน ตามแผนการเก็บตัวอย่าง คือ จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมเมสทาโนโลนโดยเก็บในระยะหลังจากหยุดการให้อาหารที่ผสมเมสทาโนโลน ไปแล้วเป็นเวลา 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 วัน และในปลาขุนที่น้ำหนัก 100, 350 และ 700 g โดยในแต่ละระยะจะทำการเก็บตัวอย่างปลาให้มีน้ำหนักตั้งแต่ 20 g ขึ้นไปใส่ลงในถุงพลาสติกแห้งและสะอาด แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.4 กระบวนเตรียมตัวอย่างเนื้อปลาและ การวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของสารเมสทาโนโลน

2.4.1 กระบวนเตรียมตัวอย่างเนื้อปลา

การเตรียมตัวอย่างลูกปลาเพื่อให้เป็น placebo ในการวิเคราะห์ ในขั้นตอนการเตรียม standard curve และ quality control sample (QC sample) โดยนำเนื้อปลานิล ทำการถอดเกล็ด และแกะก้างออกไป ทำการหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำผสมกับน้ำแข็งแห้งป่น และ ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นจนได้ผงละเอียดแห้ง ผงเนื้อปลาปั่นจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกระทั่งนำมาใช้

ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของสารเมสทาโนโลนจะถูกเก็บตามแผนการเก็บ และนำ มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกระทั่งถึงเวลาที่วิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลานิลเพื่อวิเคราะห์ โดยนำปลานิลที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมนเมสทาโนโลนมาผสมกับน้ำแข็งแห้งป่น แล้วปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นจนได้ ผงละเอียดแห้ง ผงเนื้อปลานิลปั่นจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เช่นเดียวกัน

2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของสารเมสทาโนโลน

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานใช้งานเข้มข้นใน acetonitrile เพื่อเตรียม standard curve ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 100, 150, และ 200 ng/ml ตามลำดับ และ เตรียมสารละลายมาตรฐาน

ไฟแนสเตอไรด์เข้มข้น สำหรับเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 500 ng/ml นำสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น จำนวน 50 µl และ สารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) จำนวน 50 µl เติมลงไปในเนื้อเยื่อปลานิลที่บดกับน้ำแข็งแห้ง (dried ice) จำนวน 1 g สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl และ ปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และ นำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial

ชั่งปลานิลที่ถูกบดละเอียดกับน้ำแข็งแห้ง ประมาณ 1 g ใส่หลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 5 ml แล้วเติมสารละลายไฟแนสเตอไรด์ 500 ng/ml จำนวน 50 µl ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) จากนั้น เติม tert-butyl methyl ether (TBME) 950 µl นำมาเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที และ ตกตะกอน ด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ซึ่งจะตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลนถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และ นำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetronitrile 500 µl นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และ นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใน vial และ วิเคราะห์สารละลายด้วยด้วย LC-MS โดยใช้ chromatographic condition ในข้อ 2.2.1