บทที่ 3

การทดลองที่ 1 ปรับปรุงวิธีวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อเยื่อ และอาหารกุ้งขาวแวนนาไม

3.1 บทคัดย่อ

วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ;HPLC) ได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินที่ตกค้างในกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้คลอเตตราซัยคลินเป็นสารมาตรฐานภายใน ยาทั้งสองชนิดสามารถแยกออกจากกันได้ดีโดย Nova Pak C_{18} คอลัมน์ ที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็น Linear gradient ระหว่าง 0.01 โมลาร์กรดออกซาลิค ผสมกับอะซิโตไนไตรล์และเมทานอล (อัตราส่วน 22:8 โดยปริมาตร) ยาทั้งสองชนิดถูกตรวจวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร เวลาที่ออกซีเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลินถูกชะออกด้วยเฟสเคลื่อนที่ 11.40 และ 16.62 นาที ตามลำดับ

การสกัดออกซีเตตราซัยคลินจาก hemolymph ของกุ้งที่ความเข้มข้น 0.38-1.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สมการมาตรฐานมี correlation coefficient (r) มากกว่า 0.999 ความถูกต้องของการวิเคราะห์ แสดงในรูปของค่าการกลับคืน (% recovery) มากกว่า 96% ในทุกระดับ ความแม่นยำของการวิเคราะห์มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) ไม่เกิน 5% ความสามารถในการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การสกัดออกซีเตตราซัยคลินในกล้ามเนื้อ digestive gland และอาหาร โดยใช้ 0.01 M EDTA-McIIvaline buffer เป็นสารสกัด และใช้ Sep-Pak C_{18} สำหรับเพิ่มความเข้มข้นและทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้น ทำการสกัดออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 0.5-2.5 1.0-40 และ 100-1600 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ correlation coefficient ของสมการมาตรฐานมากกว่า 0.999 ทุกตัวอย่าง ค่าการกลับคืนในกล้ามเนื้อและ digestive gland มากกว่า 94% ในทุกระดับ ส่วนในอาหารกุ้งนั้นมากกว่า 91% ในทุกระดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานนั้นน้อยกว่า 11% ในทุกระดับความเข้มข้นของทุกตัวอย่าง ความสามารถในการตรวจวัดในกล้ามเนื้อ digestive gland และอาหารกุ้งนั้นมีค่า 0.06, 0.01 และ 0.11 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

การวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลิน ในตัวอย่างพบว่าให้ค่าที่เป็นไปตามมาตรฐาน สามารถนำวิธีการดังกล่าวมาใช้เพื่อทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ และ ชีวประโยชน์ของยาดังกล่าวในกุ้งขาวแวนนาไมต่อไป

3.2 บทนำ

การวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลินในห้องปฏิบัติการอาจใช้วิธีทางจุลชีววิทยา (microbiological method) หรือ immunoassay แต่วิธีนี้มักไม่นิยมนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิง ปริมาณ (quantitative analysis) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเป็นตัวอย่างปริมาณยาที่ระดับความเข้มข้นต่ำ เพราะมีความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีการต่ำ (Onji et al., 1984) มีความคลาดเคลื่อนจากความสามารถในการต้านทานยาของเชื้อแตกต่างกัน เชื้อบางกลุ่มอาจดื้อยา (Papadoyannis et al., 2000) วิธีที่ได้รับการยอมรับมากกว่า คือ เทคนิคทางโครมาโตกราฟี (chromatography) ซึ่งอาจเป็น gas liquid chromatography (GLC) หรือ high performance liquid chromatography (HPLC) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคสองชนิดนี้จะเห็นว่าเทคนิค HPLC ได้รับการยอมรับมากกว่า GLC เพราะออกซีเตตราซัยคลินมีจุดเดือด (boiling point) สูงซึ่งทำให้ยาบางส่วนเสียสภาพไปในระหว่างการวิเคราะห์ (Long et al., 1990a) ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำน้อยกว่า

ขั้นตอนการเตรียมสารละลายจากตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ (sample preparation) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความถูกต้องและแม่นยำของการวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลินเชิงปริมาณด้วย HPLC โดยทั่วไปประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือ นำตัวอย่างซึ่งทราบน้ำหนักหรือปริมาตรแน่นอนมาทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ออกซีเตตราซัยคลินที่อยู่ภายในออกมา ขั้นตอนที่สองคือ การกำจัดสารชนิดอื่นซึ่งผสมอยู่ในสารละลายที่ได้จากขั้นตอนแรกเช่นไขมันและโปรตีนออกไปให้ได้มากที่สุด

วิธีกำจัดโปรตีนในตัวอย่างมักดำเนินการด้วยวิธีตกตะกอนซึ่งอาจทำได้โดยใช้ความร้อน แต่วิธีการนี้ทำให้ออกซีเตตราซัยคลินบางส่วนสูญเสียไป (Long et al., 1990b) จึงมีการดัดแปลงวิธีโดยการเติมกรดเช่น trichloroacetic acid (TCA) (Long et al., 1990a) หรือ trifluoroacetic acid (TFA) ลงไป อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้กรดสองชนิดนี้พบว่า TFA ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำกว่าเพราะออกซีเตตราซัยคลินเกิดการเปลี่ยนรูปน้อยกว่า (Iversen et at., 1989)

การแยกไขมันออกจากออกซีเตตราซัยคลินในสารละลายตัวอย่างทำได้ยากเนื่องจากเป็นสารที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เหมือนกัน จากการตรวจสอบรายงานที่ผ่านมาพบว่าการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะใน digestive gland ของกุ้งด้วย HPLC ปรากฏในรายงานน้อยมากทั้งนี้เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวนี้ ที่ระยะ C-D_0 ของการลอกคราบมีปริมาณของไขมันสะสมอยู่มากถึง 6 % (w/w) และเพิ่มสูงขึ้นเป็น 8% (wt/wt) ที่ระยะ D_1 (Chandumpai et al., 1991)

สำหรับวิธีกำจัดไขมันส่วนใหญ่ใช้วิธีละลายตัวอย่างในสารละลายอินทรีย์ เช่น 95% acetone ละลายตัวอย่างออกมาจากไขมันแล้วทำการระเหยเอา acetone ออกมาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นตัวอย่าง (Rogstad et al., 1988) หรืออาจใช้วิธี solid phase extraction (SPE) ชนิดไม่มีขั้ว (nonpolar) เช่น C_{18} แล้วค่อยชะ (elute) ออกมาด้วยตัวชะ (eluent) ที่เหมาะสม (Christie, 1992)

นอกจากนั้นเนื่องจากออกซีเตตราซัยคลินสามารถจับกับโลหะในหมู่ transition elements ซึ่งอาจปนอยู่ในตัวอย่างได้ ปัจจัยดังกล่าวนี้มีผลต่อความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เช่นกัน ในทางปฏิบัติจึงลดปัญหานี้โดยเติม ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) พร้อมทั้งปรับ pH ของสารละลายให้ต่ำกว่า 3 ด้วย oxalic acid เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการจับระหว่าง EDTA กับ โลหะเหล่านั้น (Thomas.,1989; Long et al., 1990a; Long et al., 1990b)

ส่วนวิธีวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อเยื่อกุ้งด้วย HPLC ที่ปรากฏในรายงานที่ผ่านมาส่วนใหญ่ใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐานภายนอก (external standard) ด้วยวิธีการนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เพราะออกซีเตตราซัยคลินอาจสูญเสียไปบางส่วนในระหว่างการสกัดออกจากตัวอย่าง รวมทั้งความแม่นยำของปริมาตรสารละลายที่ฉีดเข้าไปเพื่อการวิเคราะห์แต่ละครั้ง (Rouessac and Rouessac, 2000)

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงวิธีวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลินด้วยเทคนิค HPLC ให้มีความน่าเชื่อถือ (reliablity) และความถูกต้อง (precision) มากขึ้น วิธีการที่ได้จะนำไปใช้ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และชีวประโยชน์ของออกซีเตตราซัยคลินในกล้ามเนื้อ, hemolymph และ digestive gland ของกุ้ง รวมทั้งปริมาณออกซีเตตราซัยคลินที่กุ้งได้รับจริงจากอาหาร การทดลองดำเนินการโดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมทั้งขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างและขั้นตอนการวิเคราะห์ นอกจากนั้นเพื่อลดโอกาสการเกิดความคลาดเคลื่อนของวิธีการจึงมุ่งเน้นวิธีคำนวณหาปริมาณสารโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแบบสารมาตรฐานภายใน (internal standard)

3.3 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

3.3.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph, digestive gland, กล้ามเนื้อ และอาหาร ของกุ้งขาวแวนนาไมโดยเทคนิค HPLC

3.3.2 ศึกษาวิธีการสกัดออกซีเตตราซัยคลินจาก hemolymph, digestive gland, กล้ามเนื้อ และอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม

3.3.3 เพื่อ validation วิธีการสกัดออกซีเตตราซัยคลินจาก hemolymph, digestive gland, กล้ามเนื้อ และอาหารกุ้งขาวแวนนาไม

3.4. อุปกรณ์และวิธีการ

3.4.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1 เครื่อง HPLC (Waters, USA)

Solvent A: 0.01 M oxalic acid

Solvent B: acetonitrile และ methanol ผสมกันในอัตราส่วน 22 ต่อ 8

Column: Novapak C_{18}. 3.9 mm X 15 cm ,

Detector: Waters 486 UV-

Pump: Waters 510

Integrater: Baseline 810 (Waters, USA)

2 N-ethylmaleimide สารต้านการแข็งตัวของเลือด (Sigma, USA)

3 Methanol; HPLC grade (J.T.Baker, USA)

4 Acetonitrile; HPLC grade (J.T.Baker, USA)

5 Oxalic acid; Analytical grade (Merck, Germany)

6 Trifluoroacetic acid (TFA); Analytical grade; (Sigma, USA)

7 Oxytetracycline dihydrate (OTC) Purity 98% (Sigma, USA)

8 Chlortetracycline hydrochloride (CTL) Purity 80% (Sigma, USA)

9 หลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร (Nipro, Thailand)

10 เครื่อง centrifuge (Eppendorf, Germany)

11 หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

12 กุ้งขาวแวนนาไมขนาด 14-22 กรัม (ฟาร์มเอกชน จ.สงขลา)

13 เครื่อง Freeze Dry (Hero Drywiner, Denmark)

14 Water bath (NESLAB, USA)

15 ก๊าซไนโตรเจน; Oxygen free nitrogen (OFN) (TIG gas, Thailand)

16 Sep-Pak C_{18} column ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 3 มิลลิลิตร (Waters, USA)

17 Automatic pipette (Pipetman, France)

18 0.01M EDTA-McIlvaline buffer (Fluka, USA)

19 Ultrasonicator (Branson 2200, USA)

20 น้ำ Milli-Q (Millipore, USA

21 ไซริงก์ ขนาด 250 ไมโครลิตร (Harmillton, USA)

3.4.2 วิธีการศึกษา

3.4.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน โดยใช้คลอเตตราซัยคลินเป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard: IS)

เครื่อง HPLC ที่ใช้ตลอดการทดลองนี้ประกอบด้วย pump (Waters 510) 2 ชุด ต่อกับ Novapak C_{18} column guard ขนาด 4 mm ดักจับสิ่งปนเปื้อนก่อนที่ตัวชะและสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ Novapak C_{18} column (particle size 5 µm, 3.9 mm X 15 cm) ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ rheodyne injector ที่มีปริมาตร loop 20 µl วัดปริมาณสารที่แยกออกมาด้วย UV-visible detector (Waters 486) บันทึกและวิเคราะห์สัญญาณด้วยโปรแกรม Baseline ระบบต่างๆจะถูกควบคุมให้ทำงานร่วมกันด้วย interface (Waters 810)

สารละลายมาตรฐาน (stock standard solution) ออกซีเตตราซัยคลินไดไฮเดรต ความเข้มข้น 1,000 µg/ml เตรียมโดยชั่งสารให้ได้น้ำหนักแน่นอนมาละลายใน 0.1 M HCl และ เมทานอล อัตราส่วน 1:1 (v/v) สำหรับสารละลาย ความเข้มข้น1 µg/ml คลอเตตราซัยคลินซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard ; IS) ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

สารละลายออกซีเตตราซัยคลินมาตรฐาน(working standard) ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ (0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 100.00 µg/ml) มี IS 5 µg/ml เท่ากันทุกระดับ เตรียมโดยนำสารละลาย stocking standard มาเจือจางด้วย solvent A : solvent B อัตราส่วน 25 :75 (v/v) สารละลายมาตรฐานเหล่านี้จะเก็บรักษาไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการออกซิเดชัน

สภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC เริ่มต้นจากวิธีที่แนะนำโดย Thomas (1989) ซึ่งใช้ตัวชะ (eluent) 2 ชนิดผ่านเข้าสู่ column แบบ gradient คือ solvent A (0.01 M oxalic acid) และ solvent B (acetonitrile และ methanol 22:8 โดยปริมาตร) การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อแยกออกซีเตตราซัยคลินออกจากคลอเตตราซัยคลินดำเนินการโดยทดสอบหาความเข้มเข้นของ solvent A ทดสอบอัตราส่วนของ acetonitrile และ methanol สำหรับ solvent B รวมทั้งอัตราการไหลของ mobile phase

ผลจากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกออกซีเตตราซัยคลินออกจากคลอเตตราซัยคลินที่อุณหภูมิห้อง (24-28 องศาเซลเซียส) พบว่า ใช้ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร วัดปริมาณการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร solvent A ควรเป็น oxalic acid ความเข้มข้น 0.01 M และ อัตราส่วนของ acetonitrile:methanol สำหรับ solvent B คือ 22:8 นอกจากนั้นอัตราการไหลของ mobile phase กำหนดด้วยโปรแกรมดัง

แสดงในตารางที่ 2 คือ ปล่อยให้ solvent A 100 % ไหลเข้าสู่ column ใน 1 นาทีแรก แล้วค่อยๆปรับอัตราส่วน solvent A:solvent B จาก 0:100%ไปเป็น 70:30% ภายในเวลา 17 นาที (การเพิ่มเป็นแบบ linear gradient) คงอัตราส่วนดังกล่าวไว้ 3 นาที แล้วค่อยๆเปลี่ยน ไปเป็น solvent A 100 % ภายในเวลา 6 นาที คงสภาวะดังกล่าวไว้ 4 นาที ทั้งนี้ใช้อัตราการไหลของ mobile phase เป็น 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที (ดังแสดง ในตารางที่ 2) ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำแต่ละความเข้มข้น นำผลจากโครมาโตแกรมมาคำนวณและสร้างกราฟมาตรฐานจากความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio และ peak area ratio ของออกซีเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลิน (IS) (Levin, 2006)

ตารางที่ 2 ค่าการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในช่วงเวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	*อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)*	*Solvent A (%)*	*Solvent B (%)*	**รูปแบบของ gradient***
0.00	1.20	100	0.000	-------
1.00	1.20	100	0.000	6
18.00	1.20	70.00	30.00	6
21.00	1.20	70.00	30.00	6
26.00	1.20	100.00	0.000	6
30.00	1.20	100.00	0.000	6

***** แสดงรูปแบบของ gradient ซึ่งในที่นี้เป็นเส้นตรง

3.4.2.2 การสกัดออกซีเตตราซัยคลินจาก hemolymph กล้ามเนื้อ digestive gland และอาหาร ของกุ้งขาวแวนนาไม

3.4.2.2.1 การเก็บตัวอย่าง hemolymph กล้ามเนื้อ และ digestive gland

การเก็บตัวอย่าง hemolymph ดำเนินการโดยนำกุ้งซึ่งทราบประวัติ (น้ำหนัก, ความยาว carapace, วันลอกคราบ) มาดูดเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 2-3 ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 15G และหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มี N-ethylmaleimide ในรูปผลึกเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดประมาณ 0.03 มิลลิกรัม นำตัวอย่างเลือดที่ได้ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บซากกุ้งในถุงพลาสติกแยกตามหมายเลขที่กำหนด เก็บตัวอย่างทั้งสองชนิดในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการวิเคราะห์

ตัวอย่างกล้ามเนื้อและ digestive gland ทำการเก็บโดยนำซากกุ้งซึ่งแช่แข็งไว้ดังข้างต้นมาวางที่อุณหภูมิห้องจนเกือบละลาย แยกส่วนเปลือกออกไป ใช้มีดผ่าตัดตัดเอากล้ามเนื้อ (abdominal muscle) ให้ได้น้ำหนัก (wet weight) แน่นอนประมาณ 3 กรัมต่อตัวอย่าง สำหรับ digestive gland พบว่าหลังจากผ่าตัดออกมามักจะมีเลือดห่อหุ้มอยู่จึงซับออกให้มากที่สุดด้วยกระดาษซับก่อนนำไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก

3.4.2.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลิน hemolymph

การทดสอบประสิทธิภาพวิธีสกัดและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลินในเลือดดำเนินการโดยนำตัวอย่างเลือดซึ่งแช่แข็งไว้ออกมาวางให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง หลังจากเขย่าให้เข้ากันดูดตัวอย่างออกมา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 26 หลอด ใน 25 หลอดเติมสารสะลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้นต่างกันลงไป 20 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับๆ ละ 5 ซ้ำ คือ 0.38, 0.76, 1.14, 1.52 และ 1.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเลือด เติม 20 ไมโครลิตร IS ให้มีความเข้มข้นเท่ากันทุกหลอดคือ 3.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเลือด อีก 1 หลอดที่เหลือซึ่งใช้เปรียบเทียบดำเนินการเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมสารสะลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน นำหลอดเหล่านี้ไปเขย่าอย่างแรงให้เข้ากันดีด้วย vortex 1 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นเติมน้ำ Milli-Q ลงไป 100 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแตกประมาณ 30 วินาที เติมสารละลายเข้มข้น TFA 20 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex ประมาณ 30 วินาที จากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความแรง 13,900x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แยกเอาส่วนใสออกมา (ปริมาตรรวมที่แยกได้ วัดโดยไมโครลิตรไซริงก์ ขนาด 250 ไมโครลิตร) ฉีดสารละลายที่ได้นี้ 20 ไมโครลิตร เข้าสู่ HPLC และดำเนินการแยกตามสภาวะที่กำหนดจากการทดลองที่ 3.3.2.1 คำนวณหาค่า peak area ratio ของออกซีเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลินจากโครมาโตแกรม นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์กับแต่ละ concentration ratio ของสารประกอบทั้งสอง เพื่อใช้หาความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในเลือดต่อไป

3.4.2.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพวิธีสกัด และวิธีวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลิน จากกล้ามเนื้อ และ digestive gland

การทดสอบประสิทธิภาพวิธีสกัดและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลินในกล้ามเนื้อดำเนินการ โดยนำตัวอย่างซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอนมา 26 ตัวอย่างเติมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลินลงในตัวอย่าง ให้ได้ปริมาณต่างกัน 5 ระดับๆละ 5 ซ้ำคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อกรัมของกล้ามเนื้อ การกำหนดเช่นนี้เพื่อให้ใกล้เคียงกับปริมาณที่คาดว่าจะตรวจพบในกล้ามเนื้อ จากนั้นจึงเติมคลอเตตราซัยคลินซึ่งเป็น IS ลงไป 5 ไมโครกรัมต่อกรัมของกล้ามเนื้อ ส่วนอีก 1 หลอดที่เหลือเติม IS อย่างเดียววางของผสมไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นจึงนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 1 คืน นำตัวอย่างที่แช่แข็งไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำระเหิด (freeze dry) ชั่งและบดตัวอย่างแห้งให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว ทันทีหลังจากนำออกจากเครื่อง นำตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงในหลอดโพลีเอทิลลีนขนาด 15 มิลลิลิตร สกัดออกซีเตตราซัยคลินโดยเติม 4 มิลลิลิตร 0.01 M EDTA-McIIvaline buffer เขย่าอย่างแรงด้วย vortex ประมาณ 3 นาที เพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยนำไปใส่ใน ultrasonic bath 15 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บส่วนใสในหลอดทดลอง ทำการสกัดส่วนตะกอนซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีการเดียวกัน นำส่วนใสจากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง มารวมกัน (วัดปริมาตรสุดท้ายด้วยกระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตรเพื่อควบคุมปริมาณส่วนใสทั้งหมดให้มีปริมาณเท่ากัน) เพิ่มความเข้มข้นและทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้นโดย Solid phase extraction ขนาด 1 ml

การสกัดออกซีเตตราซัยคลินจาก digestive gland ดำเนินการโดยใช้ตัวอย่าง 0.5 กรัม (น้ำหนักเปียก) มาเติมออกซีเตตราซัยคลินให้ได้ปริมาณต่างกัน 5 ระดับคือ 1.0, 10.0, 20.0, 30.0 และ 40.0 ไมโครกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อ พร้อมทั้งเติมคลอเตตราซัยคลินซึ่งเป็น IS ลงไป 80 ไมโครกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ จากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับกล้ามเนื้อแต่การกำจัดสารปนเปื้อนจาก digestive gland ดำเนินการโดยใช้ Sep-Pak C_{18} คอลัมน์ ขนาด 3 มิลลิลิตร ซึ่งต่อกับ chamber ที่ทำให้เป็นสุญญากาศด้วยปั๊มดูดอากาศ การปรับสภาพคอลัมน์ก่อนเติมสารละลายตัวอย่างดำเนินการโดยผ่าน 3 มิลลิลิตร เมทานอล ตามด้วย 5 มิลลิลิตร ของน้ำ Milli-Q และ 2 มิลลิลิตร 0.01 M EDTA-McIIvaline buffer ตามลำดับ ดูดสารละลายในคอลัมน์ออกจนหมด จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างใส่ลงไปในคอลัมน์ ล้างเอาส่วนที่ไม่เกาะคอลัมน์ออกด้วยน้ำ Milli-Q 5 มิลลิลิตร สำหรับออกซีเตตราซัยคลินซึ่งเกาะอยู่ในคอลัมน์จะถูกชะออกมาด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร เก็บ

สารละลายส่วนนี้ไว้แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกไปให้สมบูรณ์ ด้วยก๊าซไนโตรเจน (OFN) ในอ่างน้ำอุ่น (Water bath) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ละลายออกซีเตตราซัยคลินกลับด้วย 200 ไมโครลิตร ของตัวทำละลายที่ประกอบด้วย solvent A:solvent B อัตราส่วน 25 :75 (วัดปริมาตรรวมที่แยกได้ด้วยกระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร) ฉีดสารละลายที่ได้นี้ 20 ไมโครลิตร เข้าสู่ HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของออกซีเตตราซัยคลินในเลือดตามสภาวะที่กำหนดจากการทดลองที่ 3.3.2.1 คำนวณหาค่า peak area ratio ของออกซีเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลินจากโครมาโตแกรมไปเปรียบเทียบ concentration ratio กับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินใน digestive gland ต่อไป แต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 5 ซ้ำ และอีก 1 หลอดที่เติม IS เพียงอย่างเดียวเป็น blank

3.4.2.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลินจากอาหารกุ้ง

การเตรียมตัวอย่างอาหารเพื่อทดสอบดำเนินการโดยนำอาหารกุ้งขาว (บริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด) มาบดให้ละเอียด (ผ่านตะแกรงขนาดช่องตา 0.5 มิลลิเมตร) สุ่มตัวอย่างอาหารมาผสมน้ำอัตราส่วน 1:1 (w/v) คนให้เข้ากันดีแล้วบรรจุลงในหลอดฉีดยาที่ต่ออยู่กับเข็มขนาด 16G และมีท่อซิลิโคนยาว 1 เซนติเมตร ต่ออยู่ด้วย อัดให้อาหารแน่นสม่ำเสมอและตรวจสอบจนไม่มีฟองอากาศปรากฏ ด้วยวิธีการนี้พบว่าน้ำหนักของอาหารที่ถูกอัดออกมาต่อหน่วยปริมาตรจะมีความสัมพันธ์โดยตรงซึ่งกันและกัน (ดังผลการทดสอบที่แสดงในบทที่ 4)

การทดสอบประสิทธิภาพวิธีสกัดและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลินในอาหารกุ้งดำเนินการโดยอัดอาหารออกจากเข็มฉีดยาดังกล่าว 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดโพลีเอทิลลีนขนาด 15 มิลลิลิตร เติมออกซีเตตราซัยคลินลงในแต่ละหลอดให้มีปริมาณ 5 ระดับ คือ 100, 200, 400, 800 และ 1600 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหาร ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นจึงเติมตัวควบคุมภายใน (IS) ลงในแต่ละหลอดให้มีปริมาณเท่ากันคือ 500ไมโครกรัมต่อกรัม (concentration ratio 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที สกัดออกซีเตตราซัยคลินโดยเติม 4 มิลลิลิตร 0.01 M EDTA-MacIIvaline buffer ลงในแต่ละหลอด นำของผสมไปเขย่าอย่างแรงด้วย vortex 3 นาที เพิ่มประสิทธิภาพการสกัดนำไปใส่ใน ultrasonic bath 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บส่วนใสไว้ในหลอดทดลองสกัดตะกอนซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีเดียวกัน นำส่วนใสจากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน เพิ่มความเข้มข้นและทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้นโดย Solid phase extraction (วัดปริมาตรรวมที่แยกได้ด้วยกระบอก

ตวงขนาด 10 มิลลิลิตร) เช่นเดียวกับวิธีการในการเตรียมสารจากกล้ามเนื้อ แต่ละระดับความเข้มข้นดำเนินการทดสอบ 3 ซ้ำ และอีก 1 หลอดที่เติม IS เพียงอย่างเดียวเป็น blank

หลังจากฉีดสารที่สกัดได้จากอวัยวะที่ต้องการแล้วนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ (พื้นที่ใต้พีค) มาคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟระหว่างออกซีเตตราซัยคลิน และ IS ของแต่ละความเข้มข้น สร้างกราฟมาตรฐานอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของออกซีเตตราซัยคลิน ต่อ IS กับอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินต่อ IS แล้วคำนวณสมการอธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าว (Linear regression)

3.4.2.2.5 การศึกษาประสิทธิภาพการสกัด

สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเพื่อหาประสิทธิภาพการสกัดของยาจาก hemolymph ที่ 5 ระดับ 0.38, 0.76, 1.14, 1.52 และ 1.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทุกระดับเติม IS 3.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขั้นตอนการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดใน hemolymph โดยใช้น้ำ Milli-Q 100 ไมโครลิตร แทน hemolymph นำสารละลายดังกล่าว 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณยา สร้างกราฟมาตรฐานอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ OTC ต่อ IS กับอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของ OTC ต่อ IS แล้วคำนวณสมการอธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าว

สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเพื่อหาประสิทธิภาพการสกัดของยาจากกล้ามนื้อ digestive gland และอาหารกุ้ง โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานให้อัตราส่วนความเข้มข้น (concentration ratio) เท่ากับกลุ่มที่สกัด โดยในกลุ่มที่ใช้กล้ามเนื้อเติมตัวควบคุมภายในเท่ากับ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน digestive gland เติม 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในอาหารเติม 279.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในสารละลายที่ประกอบด้วย solvent A ต่อ solvent B ในอัตราส่วน 25 :75 โดยปริมาตร นำสารละลายดังกล่าว 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณยา สร้างกราฟมาตรฐานอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนระหว่าง peak area ratio ของ OTC ต่อ IS กับอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของ OTC ต่อ IS แล้วคำนวณสมการอธิบายความสัมพันธ์ด้วย Linear regressions

คำนวณประสิทธิภาพการสกัด นำความเข้มข้นของ OTC ที่คำนวณได้ในแต่ละระดับของการสกัดซึ่งคำนวณจากกราฟมาตรฐานของการสกัด หารด้วยค่าเฉลี่ยของปริมาณยาในสารละลายมาตรฐานโดยคำนวณกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกันกับที่สกัดคูณด้วย 100 จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด (% Recovery) คำนวณค่า standard deviation (S.D.)

ของ % Recovery และค่า Relative standard deviation (RSD) พิจารณาความถูกต้องของการสกัด (accuracy) โดยพิจาณาจากค่าเฉลี่ย (mean± S.D.) ของค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน ที่คำนวณจากการสกัด (% Recovery) และความแม่นยำของการสกัด (precision) พิจารณาจากค่า % RSD ของปริมาณ OTC ที่คำนวณได้จากการสกัด (Sharbir, 2003) ตามสมการที่ 1 และคำนวณความเข้มข้นของยาในกล้ามเนื้อและ digestive gland ตามสมการที่ 2 ดังนี้

(1) % Recovery = $\frac{\text{ความเข้มข้นของ OTC จากการสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของ OTC จากสารละลายมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$ X 100

(2) OTC (ไมโครกรัมต่อกรัม) = $\frac{\text{ปริมาณ OTC ทั้งหมด (ไมโครกรัม)}}{\text{น้ำหนักเปียกของตัวอย่าง (กรัม)}}$

$= \frac{\text{ความเข้มข้น OTC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) X ปริมาณสารละลายทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักเปียกของตัวอย่าง (กรัม)}}$

คำนวณค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitative detection (LOQ) ตามวิธีของ Sharbir (2003) (ดังสมการที่ 3 และ 4 ตามลำดับ) โดยหาค่า S.D. และ % RSD ตามวิธีของ Mendham และคณะ (2000)

(3) $$LOD = 3.3\left[\frac{S.D.}{S}\right]$$

(4) $$LOQ = 10\left[\frac{S.D.}{S}\right]$$

โดยที่ $S.D.$ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y ของกราฟมาตรฐานของการสกัด

S = ความชันของกราฟมาตรฐานของการสกัด

3.5 ผลการทดลอง

3.5.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการวัดปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน โดยใช้คลอเตตราซัยคลินเป็นตัวควบคุมภายใน (IS)

พบว่า Nova Pak C_{18} คอลัมน์ มีเฟสเคลื่อนที่เป็น Linear gradient ระหว่าง 0.01 โมล กรดออกซาลิค ผสมกับอะซิโตไนไตรล์และเมทานอล (อัตราส่วน 22:8 โดยปริมาตร) สามารถแยกสารตัวอย่าง (OTC) และตัวควบคุมภายในออกจากกันได้ดี ค่า Capacity factor $(k)'$ เท่ากับ 7.01 Resolution factor (R) ระหว่าง OTC และ IS ที่คำนวณตามวิธีของ Rouessac และ Rouessac (2000) เท่ากับ 3.11 และค่า Selectivity เท่ากับ 1.49

3.5.2 การสกัดออกซีเตตราซัยคลินจาก hemolymph, กล้ามเนื้อ, digestive gland และอาหาร ของกุ้งขาวแวนนาไม

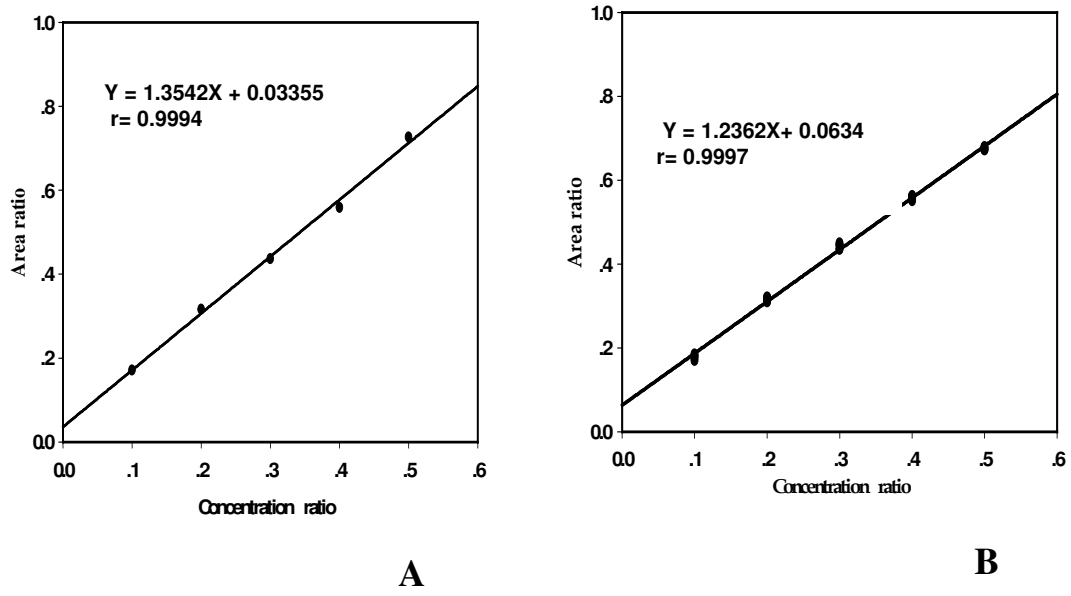
3.5.2.1 กราฟมาตรฐานและระดับต่ำสุดของยาที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้

สมการของกราฟมาตรฐานของการศึกษาใน hemolymph สมการและกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน (รูปที่ 8A) และสมการของกราฟมาตรฐานของการสกัด (รูปที่ 9B) มีค่า r มากกว่า 0. 999 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัด (LOD) ได้เท่ากับ 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในตารางที่ 3) สมการของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานและการสกัดในกล้ามเนื้อ (รูปที่ 9A, 9B) ทั้งสองสมการมีค่า r มากกว่า 0.990 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 0.06 ไมโครกรัมต่อกรัม (ดังแสดงในตารางที่ 3) สมการของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานและการสกัดใน digestive gland (รูปที่ 10A, 10B) ทั้งสองสมการมีค่า r มากกว่า 0.990 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัม (ดังแสดงในตารางที่ 3) สมการของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานและการสกัดในอาหารกุ้ง (รูปที่ 11A, 11B) ทั้งสองสมการมีค่า r มากกว่า 0.999 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 0.11 ไมโครกรัมต่อกรัม และค่า LOQ พบว่าใน digestive gland มีค่าน้อยที่สุด (0.03 μg/g) และในอาหารมีค่ามากที่สุด (0.33 μg/g) ดังแสดงในตารางที่ 3 และโครมาโตแกรมของการสกัดแสดงในรูปที่ 12

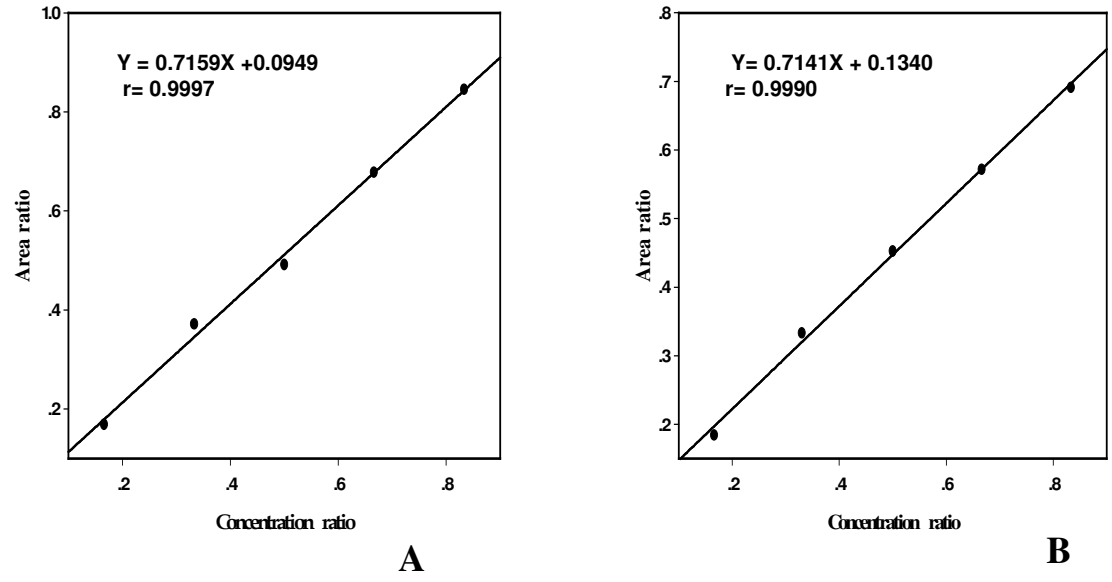
ตารางที่ 3 สมการมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานของการสกัด ค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitative detection (LOQ) ของการสกัด

ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน	*สมการความสัมพันธ์*	*r*	*LOD (□g/ml or □g/g)*	**LOQ (µg/ml or µg/g)**
สารละลายมาตรฐาน concentration ratio เท่ากับ 0.1 – 0.5	Y =1.3542X + 0.0355	0.9994		
สกัด hemolymph ที่มี OTC0.38 –1.90 µg/ml	Y = 1.2362X + 0.0634	0.9997	0.04	0.12
สารละลายมาตรฐาน concentration ratio เท่ากับ 0.16 – 0.83	Y = 0.7159X + 0.0949	0.9997		
สกัดกล้ามเนื้อที่มี OTC 0.5 – 2.5 µg/g	Y = 0.7141X + 0.1340	0.9990	0.06	0.18
สารละลายมาตรฐาน concentration ratio เท่ากับ 0.0125 –0.50	Y = 1.656X - 0.0269	0.9972		
สกัด digestive gland ที่มี OTC 1.0– 40.0 µg/g	Y =1.6782X + 0.0229	0.9995	0.01	0.03
สารละลายมาตรฐาน concentration ratio เท่ากับ 0.20 -3.20	Y = 1.6197X - 0.0792	0.9995		
สกัดอาหารกุ้งที่มี OTC 100-1600 µg/ml	Y = 1.5367X - 0.0693	0.9997	0.11	0.33

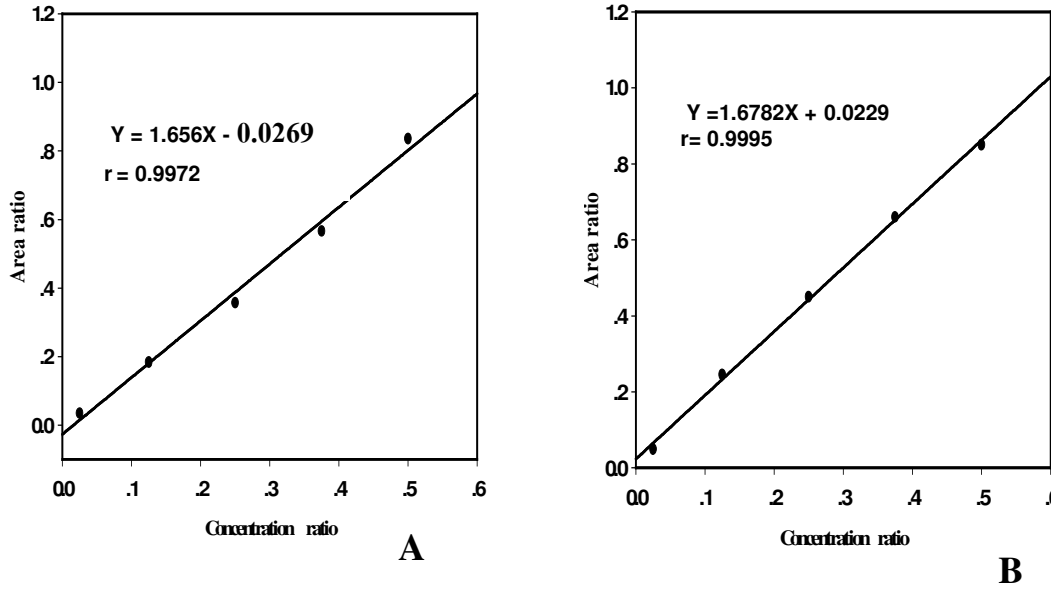
โดยที่ Y= peak area ratio (OTC/IS) และ X= concentration ratio (OTC/IS)



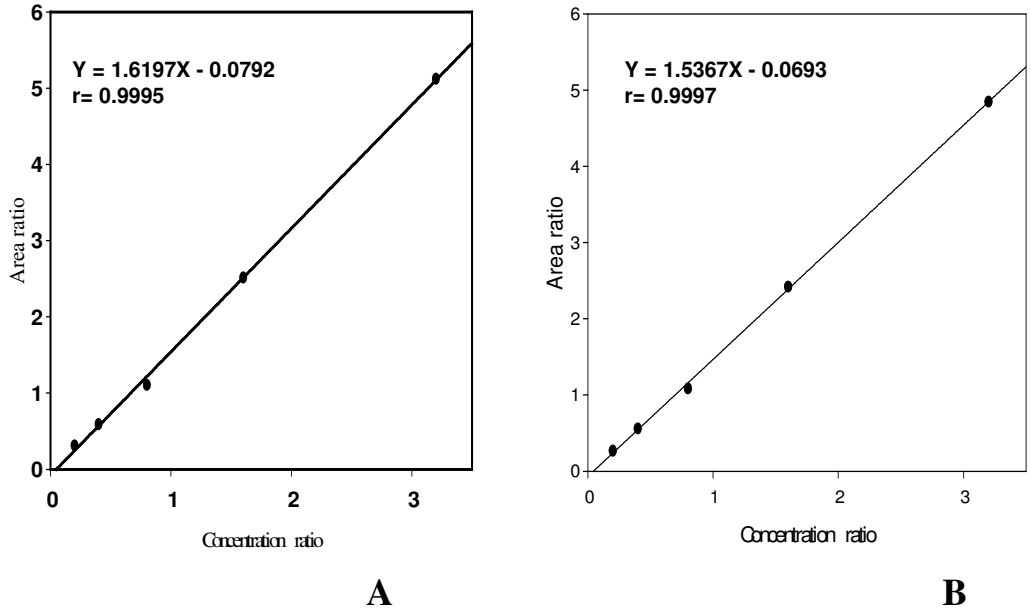
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน OTC:IS (**A**) และการสกัด OTC จาก hemolymph (**B**) ที่ระดับ Concentration ratio เท่ากับ 0.1 – 0.5



รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน OTC:IS (**A**) และการสกัด OTC จากกล้ามเนื้อกุ้ง (**B**) ที่ระดับ Concentration ratio เท่ากับ 0.16 – 0.83



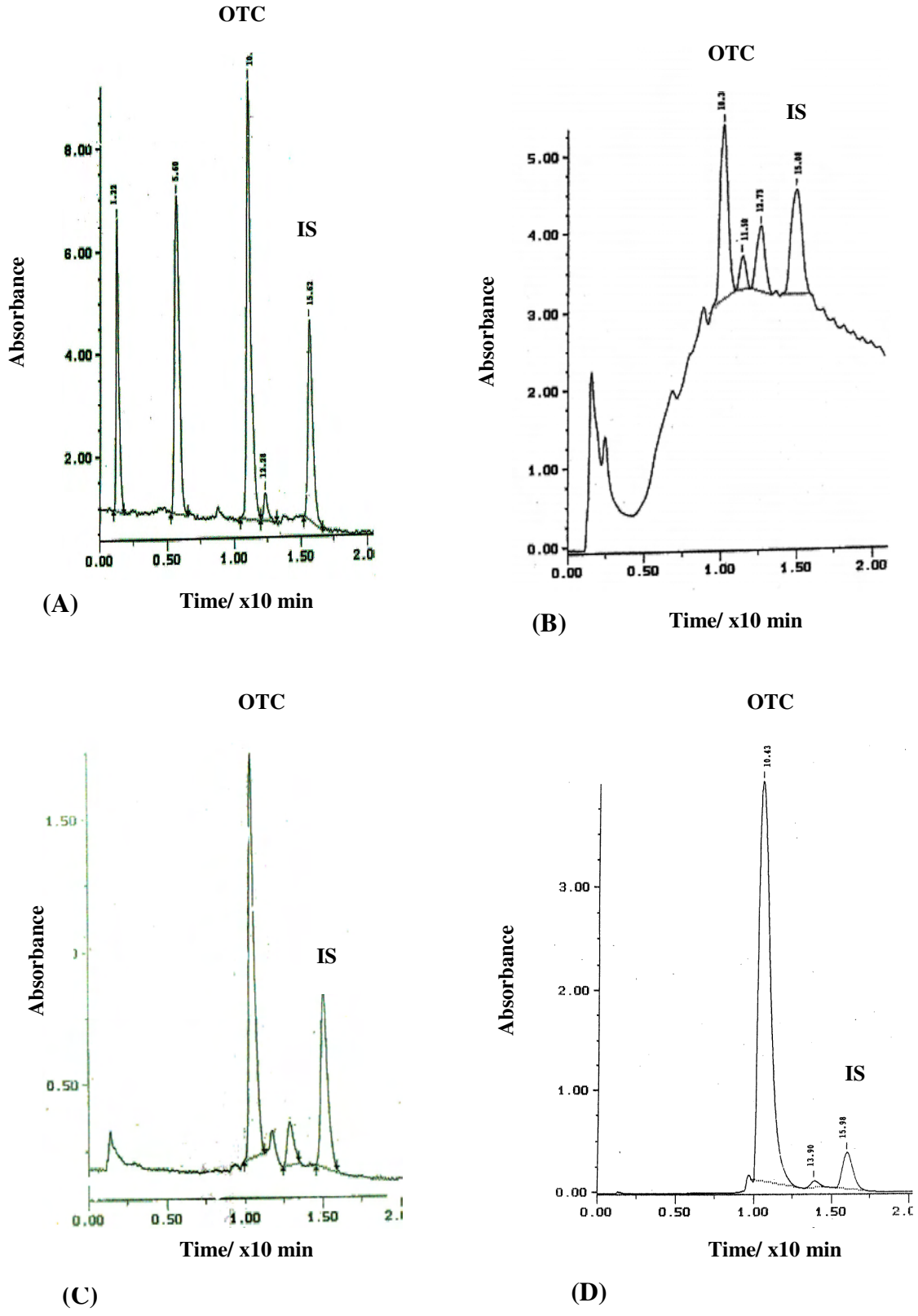
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน OTC:IS (**A**) และการสกัด OTC จาก digestive gland (**B**) ที่ระดับ Concentration ratio เท่ากับ 0.0125 –0.50



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน OTC:IS (**A**) และการสกัด OTC จากอาหารกุ้ง (**B**) ที่ระดับ Concentration ratio เท่ากับ 0.20 -3.20

3.5.2.2 ประสิทธิภาพการสกัดออกซีเตตราซัยคลินจาก hemolymph, กล้ามเนื้อ, digestive gland และอาหาร ของกุ้งขาวแวนนาไม

โครมาโตแกรมของการสกัดออกซีเตตราซัยคลินโดยใช้คลอเตตราซัยคลินเป็นสารมาตรฐานภายในจาก hemolymph กล้ามเนื้อ digestive gland และอาหารกุ้ง แสดงในรูปที่ 12A-D จากรูปพบว่าพีคของออกซีเตตราซัยคลินและตัวควบคุมภายในนั้น specificity ดีโดยไม่มีพีคใดแทรก แต่ในส่วนของกล้ามเนื้อ digestive gland และอาหารกุ้งนั้นพบว่ามีพีคแทรกอยู่ระหว่างกลางแต่ก็แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์จากพีคตัวอย่าง ประสิทธิภาพการสกัดออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph นั้นพิจารณาจากค่า % Recovery ของยาที่เติมลงไป จากการสกัดใน hemolymph ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.38-1.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น พบว่า %Recovery อยู่ระหว่าง 96.4-107.9% และ %RSD ต่ำกว่า 5.00% การสกัดในกล้ามเนื้อที่ความเข้มข้น 0.50 -2.50 ไมโครกรัมต่อกรัม นั้น % Recovery อยู่ระหว่าง 94.90-107.34% และ %RSD ต่ำกว่า 6.24% การสกัดใน digestive gland ที่ระดับ 1.00-40.00 ไมโครกรัมต่อกรัม % Recovery อยู่ระหว่าง 94.60-109.70% และ %RSD ต่ำกว่า 10.63% และ การสกัดจากอาหารกุ้งที่ระดับ 100-1600 ไมโครกรัมต่อกรัม นั้น % Recovery มีค่าอยู่ระหว่าง 91.12-102.60 ไมโครกรัมต่อกรัม ค่า %RSD ต่ำกว่า 8.99% (ดังแสดงในตารางที่ 4)



รูปที่12 HPLCโครมาโตแกรมของการสกัดออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph (A) กล้ามเนื้อ (B) digestive gland (C) และอาหารกุ้ง (D)

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการสกัดออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph, กล้ามเนื้อ, digestive gland และอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (ค่าเฉลี่ย ± S.D.)

ปริมาณ OTC	ปริมาณ OTC จากสารละลายมาตรฐาน	ปริมาณ OTC จากการสกัด (% RSD)	% Recovery (%RSD, n)
Hemolymph (µg/ml)			
0.38	0.35 ± 0.02	0.38 ± 0.04 (11.50)	107.90 ± 5.09 (5.00, n=5)
0.76	0.78 ± 0.01	0.79 ± 0.03 (3.93)	101.10 ± 3.13 (3.00, n=5)
1.14	1.16 ± 0.01	1.12 ± 0.02 (2.18)	96.40 ± 1.72 (2.00, n=5)
1.56	1.52 ± 0.03	1.47 ± 0.04 (2.67)	96.50 ± 1.55 (2.00, n=5)
1.90	1.88 ± 0.02	1.93 ± 0.04 (2.11)	102.70 ± 1.87 (2.00, n=5)
กล้ามเนื้อ (µg/g)			
0.5	7.35 ± 0.03	0.52 ± 0.03 (6.27)	107.34 ± 5.63 (6.24, n=5)
1.0	14.25 ± 0.02	0.96 ± 0.11 (3.89)	101.68 ± 3.89 (4.06, n=5)
1.5	23.40 ± 0.02	1.51± 0.01 (0.72)	94.90 ± 3.14 (3.30, n=5)
2.0	30.60 ± 0.03	2.04 ± 0.03 (1.51)	100.00 ± 1.56 (1.56, n=5)
2.5	36.60 ± 0.02	2.46 ± 0.03 (1.17)	101.60 ± 1.79 (1.76, n=5)
Digestive gland (µg/g)			
1.0	3.00 ± 0.01	1.24 ± 0.12 (9.96)	103.60 ± 10.30 (9.94, n=3)
10.0	25.42 ± 0.01	10.58 ± 1.12 (10.58)	103.90 ± 12.37 (10.63, n=3)
20.0	46.32 ± 0.02	20.35 ± 0.76 (3.73)	109.70 ± 4.21 (3.89, n=3)
30.0	71.57 ± 0.02	30.37 ± 1.10 (3.62)	106.06 ± 3.64 (3.44, n=3)
40.0	104.15 ± 0.03	39.42 ± 0.92 (2.33)	94.60 ± 2.21 (2.34, n=3)
อาหารกุ้ง (µg/g)			
100	67.48 ± 0.10	110.07± 3.87 (3.51)	91.12 ± 8.20 (8.99, n=3)
200	115.43 ± 0.10	204.70 ± 9.05 (4.42)	99.08 ± 4.40 (4.45, n=3)
400	204.27 ± 0.30	375.20 ± 15.10 (4.02)	102.60 ± 4.10 (3.90, n=3)
800	447.65 ± 0.30	809.40 ± 9.30 (1.14)	101.00 ± 1.77 (1.75,n=3)
1600	897.37 ± 0.40	1602.20 ± 12.20 (0.761)	99.73 ± 0.75 (0.75, n=3)

3.6 วิจารณ์ผลการทดลอง

HPLC reversed-phase ได้รับความนิยมในการวัดปริมาณ OTC ในสัตว์น้ำ เฟสคงที่ที่ใช้มีความหลากหลาย แต่ที่ได้รับความนิยมมากคือ C_8 และ C_{18} (Oka et al., 2000) แต่ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ C_{18} เพราะสามารถใช้งานในขอบเขตที่กว้าง และสามารถทนช่วงพีเอชที่กว้างตั้งแต่ 2-8 (Heinisch and Rocca, 2004) ลักษณะการแยกนั้นอาศัยความสามารถในการจับระหว่างเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ โดยที่ OTC สามารถทำปฏิกิริยาคีเลทกับกลุ่มเมททิล ที่มีประจุบวก 2 เกิดเป็นสารที่มีขั้วลดลง แล้วจับกับหมู่ซิลินอลของเฟสคงที่ (Oka et al., 2000)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณออกซีเตตราซัยคลินโดยมีคลอเตตราซัยคลินเป็นตัวควบคุมภายใน จากโครมาโตแกรม พีคทั้ง 2 พีคแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ คำนวณค่า k' เท่ากับ 7.01 ค่า Resolution factor (R) ระหว่าง OTC และ IS ของสารละลายมาตรฐานเท่ากับ 3.11 และค่า selectivity เท่ากับ 1.49 ซึ่ง Shabir (2003) กล่าวว่าโครมาโตแกรมที่ดีและน่าเชื่อถือ ตามมาตรฐานของ United State Food and Drug Administration (FDA) นั้นค่า k' และ Resolution factor จะต้องมากกว่า 2 ส่วนค่า selectivity นั้นจะต้องมากกว่า 1.04 เมื่อเปรียบเทียบค่าต่างๆ เหล่านี้กับค่าที่กำหนดดังกล่าวพบว่าค่าที่คำนวณได้จากการทดลองมีค่ามากกว่าค่าที่กำหนดทุกค่า สภาวะดังกล่าวจึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ OTCโดยมี CTL เป็น IS ได้อย่างน่าเชื่อถือ

การสกัด OTC จาก hemolymph โดยมี TFA เป็นสารสกัดมีรายงานหลายชิ้นที่ใช้ Trichloroacetic acid (TCA) แต่ Iversen และคณะ (1989) รายงานว่า OTC สามารถคงสภาพอยู่ใน TFA ดีกว่า TCA กรดที่ใช้นอกจากจะละลาย OTC แล้วยังเป็นตัวทำให้โปรตีนเสียสภาพและตกตะกอนและปล่อยยาออกมา จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าประสิทธิภาพการสกัดของทุกระดับความเข้มข้นตั้งแต่ต่ำถึงสูง (0.38-1.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีค่าระหว่าง 96.40%- 107.90% แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการสกัดที่สูง ค่า RSD น้อยกว่า 0.5% แสดงว่าเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง อีกทั้งเมื่อพิจารณาถึงขั้นตอนการสกัดแล้วพบว่าเป็นวิธีที่ง่ายและมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก แต่ถ้าปริมาณสารที่ตรวจวัดมีน้อยมากจนเกินค่า LOD ซึ่งเท่ากับ 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาจจะต้องนำ Sep-Pak เข้ามาช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสาร (Rogstad et al., 1988)

การสกัดออกซีเตตราซัยคลินจากกล้ามเนื้อโดยใช้ 0.01 M EDTA-McIIvaline buffer เป็นสารสกัด (Oka et al., 2000) ประสิทธิภาพการสกัดของทุกระดับความเข้มข้นตั้งแต่ต่ำถึงสูง (0.5-2.5 ไมโครกรัมต่อกรัม) มีค่าระหว่าง 94.90%- 107.34 % RSD น้อยกว่า 7 % จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อกรัม นั้นประสิทธิภาพการสกัดเท่ากับ 94.90% ซึ่งต่ำ

กว่าความเข้มข้นอื่น ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม ส่วนความแม่นยำนั้นค่อนข้างต่ำ (% RSD เท่ากับ 6.24) แต่ก็ไม่ต่ำมากนัก เหตุผลสำคัญน่าจะเกิดมาจากขั้นตอนในการสกัดนั้นมีหลายขั้นตอน ซึ่งอาจจะส่งผลต่อความแม่นยำที่คลาดเคลื่อนไป การใช้ Sep-Pak C_{18} คอลัมน์ เป็นตัวกรองตะกอนและสารอื่นๆออกจากตัวอย่าง อีกทั้งยังช่วยในการเพิ่มความเข้มข้นของ OTC หลังการสกัด การใช้ McIIvaline buffer ซึ่งมี EDTA เป็นส่วนประกอบซึ่งสารดังกล่าวช่วยให้การจับของ OTC กับคอลัมน์ เกิดได้ดีขึ้น (Oka et al., 2000) เมื่อพิจารณาโครมาโตแกรม พบว่าเกิดพีคที่ไม่ทราบชนิดขึ้นมา 2 พีคระหว่าง OTC และ IS ซึ่งอาจเกิดจากการที่ตัวอย่างโดนความร้อนในขั้นตอนการระเหยเมทานอล ออกจากตัวอย่างซึ่งทำให้ตัวยาบางส่วนเปลี่ยนรูปไปเป็นไอโซเมอร์อื่น (Oka et al., 2000)

การสกัดออกซีเตตราซัยคลินจาก digestive gland ของกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้วิธีการเดียวกันกับในกล้ามเนื้อจากผลการทดลองพบว่าให้ประสิทธิภาพการสกัดที่สูงเช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมพบว่าลักษณะของ baseline ค่อนข้างสูง อาจเป็นเพราะว่าองค์ประกอบของ digestive gland กุ้งนั้นมี neutral lipid และ phospholipids ในปริมาณมาก (Reed et al., 2004) แม้ว่าในขั้นตอนการสกัดจะใช้ Sep Pak ช่วยในการแยกสารประกอบที่มีขั้วออกบางส่วนแล้วก็ตาม ซึ่งในการพัฒนาวิธีการสกัดต่อไปอาจจะใช้ lipase มาย่อยไขมันเหล่านี้ออกเสียก่อน เพื่อเพิ่มความสามารถในการสกัด (Touraki et al., 1993)

การสกัดออกซีเตตราซัยคลินที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้งนั้นสามารถทำได้ง่ายกว่าในส่วนอื่น ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ใช้คลื่นสั่นสะเทือน (Ultrasonicate) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด โดยให้ประสิทธิภาพการสกัดที่สูง แต่ในทางปฏิบัติจริงเพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายอาจไม่ต้องใช้ Sep-Pak มาช่วยเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์และเพิ่มความเข้มข้นเพราะตัวอย่างที่ผ่านการสกัดมาค่อนข้างบริสุทธิ์อยู่แล้วและความเข้มข้นของยาที่ผสมในอาหารที่ใช้ค่อนข้างสูงจึงไม่จำเป็นต้องใช้ Sep-Pak ก็ได้

ตามกฎของ แลมเบอร์ท และเบียร์ ที่กล่าวว่าค่าการดูดกลืนแสงนั้นแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของตัวอย่าง (Banwell and Mccash, 1994) แต่กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานและของการสกัดพบว่ามีจุดตัดแกน y ไม่เท่ากับ 0 อาจเกิดจากคุณสมบัติทางเคมีของสารที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น พีเอช ของสารละลาย (Morton, 1975) และการทดลองครั้งนี้ใช้ คลอเตตราซัยคลินเป็นตัวควบคุมภายใน การสร้างกราฟมาตรฐานนั้นใช้อัตราส่วนของ peak area ระหว่างตัวอย่างและ IS ดังนั้นจึงมีโอกาสที่สารทั้งสองชนิดจะมีคุณสมบัติทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปบ้าง และส่งผลต่อการดูดกลืนแสงที่อาจจะมากกว่าปกติ จึงส่งผลให้ที่ความเข้มข้นสารเท่ากับ 0 นั้น ค่าการดูดกลืนแสงไม่เท่ากับ 0 นอกจากนั้นการที่ จุดตัดแกน y ไม่เท่ากับ 0 อาจเกิดจากการทำ regression

การพิจารณาเลือกความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานและวัดประสิทธิภาพการสกัด พิจารณาจากความเข้มข้นที่คาดว่าจะตรวจพบในตัวอย่างแต่ละชนิด และค่า peak to noise ratio ของการวิเคราะห์มากกว่า 3.3 โดยใช้ผลการศึกษาของ Reed และคณะ (2004) และ Uno (2004) ประกอบการพิจารณา