บทที่ 3

การทดลองที่ 2

การตรวจวิเคราะห์เฮกเอสตรอลตกค้างในซากไก่ตอน

บทนำ

เฮกเอสตรอลจัดเป็นฮอร์โมนสังเคราะห์ที่เกษตรกรนำมาใช้ผสมอาหารให้สัตว์กินหรือฝังใต้ผิวหนังเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์หลายชนิด เช่น แพะ แกะ โค และ สัตวปีก (Cooper, *et al.*, 1967; Umberger, 1975; Lagana and Marino,1991; Lee, 1994; Sawaya, *et al.*, 1998) สารประกอบดังกล่าวออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจนแต่โครงสร้างของโมเลกุลไม่มีสเตียรอยด์เป็นส่วนประกอบ สัตว์ที่ได้รับเฮกเอสตรอลจะอ้วนและมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นยังมีเนื้อนิ่มตรงตามความต้องการของตลาด อย่างไรก็ตามเนื่องจากเฮกเอสตรอลอาจเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) (สุมนา, 2541; Turner and Bagnara, 1976; Wiseman and Halliwell, 1993; Jan, *et al.*, 1998; Arthur, 2000) การบริโภคเนื้อสัตว์ที่เร่งการเจริญเติบโตด้วยวิธีการดังกล่าวจึงมีความเสี่ยงจากสารตกค้างได้ และหลายประเทศไม่อนุญาตให้มีสารชนิดนี้ตกค้างในเนื้อสัตว์ และออกกฎหมายห้ามการใช้ในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภค (เทอดพงษ์, 2529; จารุณี และจิตผกา, 2539; Weirt, 1982; Verbeke and Vanhee, 1983; Heitzman, 1993 อ้างโดย Wajih *et al.*, 1998.) นอกจากนี้ยังมีมาตรการกีดกันการนำเข้าเนื้อสัตว์จากประเทศที่ไม่มีมาตรการควบคุมการใช้สารชนิดนี้ ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบหาปริมาณเฮกเอสตรอลที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ จึงเป็นมาตรการหนึ่งที่นำไปสู่กระบวนการควบคุมและคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค

วิธีตรวจวิเคราะห์เฮกเอสตรอลสามารถดำเนินการด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีแบบต่างๆ ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความไว (sensitivity) และความแม่นยำ (precision) ต่างกัน

ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวค่อนข้างต่ำเช่น จารุณี และจิตผกา (2539) ทำการตรวจวิเคราะห์ไดเอทธิลสติลเบสตรอลในเนื้อไก่ด้วย thin layer chromatography (TLC) และรายงานว่าปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อกรัมตัวอย่างเปียก อย่างไรก็ตามถือว่าเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ Daeseleire และคณะ (1998) ใช้ gas-liquid chromatography เชื่อมต่อกับ mass spectroscopy (GC-MS) วิเคราะห์ฮอร์โมน

เหล่านี้ในปัสสาวะและเนื้อโค พบว่าตรวจสอบเฮกเอสตรอลในปัสสาวะและเนื้อเยื่อที่ระดับ 0.4 และ 1.4 นาโนกรัมต่อกรัมตัวอย่างเปียก ตามลำดับ โดยปริมาณการวิเคราะห์คืนกลับในปัสสาวะเท่ากับ 18 $\pm$ 3 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ที่มีความไวในระดับนาโนกรัมต่อกรัมของตัวอย่างเปียกปรากฏในรายงาน เช่น Laitem และคณะ (1978) วิเคราะห์ไดเอทธิลสติลเบสตรอล ไดเอนเอสตรอล (dienestrol) และเฮกเอสตรอลในเนื้อและอวัยวะของโค ด้วย gas-liquid chromatography (GC) พบว่าสามารถตรวจหา ไดเอทธิลสติลเบสตรอล ไดเอนเอสตรอล และเฮกเอสตรอล ได้ในระดับ 0.5, 0.1 และ 0.1 นาโนกรัมต่อกรัมตัวอย่างเปียก ตามลำดับ Hoffmann B. (1983) วิเคราะห์ฮอร์โมนเพศในเนื้อโคด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA) พบว่าสามารถตรวจปริมาณสารในระดับนาโนกรัมต่อกรัมถึงพิโคกรัมต่อกรัมตัวอย่างเปียกได้อย่างน่าเชื่อถือ Verbeke และ Vanhee (1983) ตรวจวิเคราะห์ไดเอทธิลสติลเบสตรอลในปัสสาวะและเนื้อโค โดยใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) วิธีการที่ใช้สามารถวัดตัวอย่างได้ในระดับ 1 นาโนกรัมต่อกรัมตัวอย่างเปียก โดยใช้เนื้อตัวอย่างในการวิเคราะห์ 50 กรัม

อย่างก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าวิธีการดังกล่าวข้างต้นส่วนใหญ่ใช้เทคนิคการคำนวณเชิงปริมาณ (quantitative analysis) ด้วยวิธี external standard ซึ่งมักมีปัญหาเกี่ยวกับความแม่นยำของวิธีการ (McNair and Bonelli, 1969) วิทยานิพนธ์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์เฮกเอสตรอลด้วยวิธี HPLC ที่มีระดับความมีความไวและความน่าเชื่อถือสูง วิธีการที่ได้จะนำมาใช้ตรวจวัดระดับเฮกเอสตรอลตกค้างในซากไก่ภายหลังการตอนที่ระยะเวลาต่าง ๆ

วัตถุประสงค์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนเฮกเอสตรอลซึ่งตกค้างในเนื้อเยื่อไก่ที่มีความไว (sensitivity) และระดับความน่าเชื่อถือ (reliability) สูงในการตรวจหาปริมาณ โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) และนำวิธีการที่ได้มาใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในซากไก่หลังการตอนโดยฝังฮอร์โมนดังกล่าวภายในระยะเวลา 4, 6 และ 8 สัปดาห์

สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สารเคมี

สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองคือ

1. Acetone (HPLC grade, J. T. Baker Inc., USA)
2. Acetonitrile (HPLC grade, J. T. Baker Inc., USA)
3. Chloroform (HPLC grade, J. T. Baker Inc., USA)
4. Ethanol (Analytical grade, Merck Damstadt, Germany)
5. Methanol (HPLC grade, J. T. Baker Inc., USA)
6. Water (HPLC grade, Milli-Q)
7. Hydrochloric acid fuming 37% (Merck Damstadt, Germany)
8. Hexestrol (meso-3,4-bis[4-Hydroxyphenyl]hexane, Sigma-Aldrich Chemic Gmbh, Germany)
9. Diethylstilbestrol (Sigma-Aldrich Chemic Gmbh, Germany)
10. Hexestrol pellet (ปกปิด)
11. Nitrogen gas (Oxygen free nitrogen; OFN)

วัสดุ และอุปกรณ์

1. ไก่ทดลองกลุ่มควบคุม และไก่กลุ่มที่ตอนแบบฝังฮอร์โมนจากการทดลองที่ 1 ภายหลังการฆ่าและชำแหละ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
2. เครื่อง HPLC (Waters, U.S.A.)
3. UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan)
4. Water bath (Neslab,U.S.A.)
5. Rotary vacuum evaporator (Buchi, Switzerland)
6. เครื่องชั่งความละเอียด 0.0001 กรัม (Mettler Toledo, Switzerland)
7. Microlite syringe
8. Vortex (Genie 2, U.S.A.)
9. Ultrasonic bath (Branson, U.S.A.)
10. กระดาษกรอง (Millipore, U.S.A. โดย HATP 047 00 ใช้สำหรับการกรองน้ำ FMUP 047 00 ใช้สำหรับการกรองตัวทำละลายอินทรีย์ และ FHLP 013 00 ใช้สำหรับกรองสารตัวอย่างก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC)

11. เครื่อง Freeze drier (FTS system รุ่น Fexidry, U.S.A.)

12. โถกันความชื้น (desiccator)

13. อุปกรณ์ในการผ่าตัด

วิธีการทดลอง

1. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เฮกเอสตรอล ด้วยเทคนิค HPLC**

เทคนิคการวิเคราะห์เฮกเอสตรอลด้วย HPLC ในการทดลองนี้ เริ่มต้นจากวิธีที่แนะนำโดย Lagana และ Marino (1991) และ Lee (1994) แต่เพื่อให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) มีระดับความน่าเชื่อถือสูงขึ้น จึงเลือกใช้ไดเอทธิลสติลเบสตรอลเป็น internal standard (IS) นอกจากนั้นยังดัดแปลงบางขั้นตอนของกระบวนการเพื่อให้งานวิเคราะห์สามารถทำได้รวดเร็วยิ่งขึ้นดังต่อไปนี้

1.1 **การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของเฮกเอสตรอล**

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีวิเคราะห์เฮกเอสตรอลเชิงปริมาณด้วย HPLC ที่มี UV-visible spectrophotometer เป็น detector จึงทำการศึกษาคุณลักษณะการดูดกลืนแสงโดยนำเฮกเอสตรอลมาตรฐาน ซึ่งละลายในเมธานอลความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบ absorption spectrum โดยวัดปริมาณการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 200-600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเฮกเอสตรอลมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร ดังนั้นตลอดการศึกษานี้ จึงกำหนดความยาวคลื่นนี้เพื่อวัดปริมาณการดูดกลืนแสง

1.2 **ระบบ HPLC ที่ใช้ในการทดลอง**

เครื่อง HPLC ที่ใช้ประกอบด้วย solvent delivery system (Waters, Model 560), UV-visible Detector (Waters, Model 486), Column Nova PaK C_{18} ขนาด 3.9 x 150 มิลลิเมตร (Waters), ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเข้า injector (Reodye; Waters) เพื่อการวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ใช้อะซีโตไนไทรล์และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ระบบการทำงานของเครื่องถูกควบคุมโดย interface module system (Waters) เก็บและแปรผลข้อมูลด้วยโปรแกรม Baseline

1.3 การศึกษาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

เพื่อหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกเฮกเอสตรอลออกจากไดเอทธิลสติลเบสตรอลและสารผสมอื่น ๆ (resolution) ได้อย่างสมบูรณ์ด้วยระยะเวลาน้อยที่สุด การทดสอบดำเนินการโดยแยกสารผสมดังกล่าว ด้วยอะซีโตไนไทรล์ในน้ำที่มีอัตราส่วนหลายระดับคือ 60, 50, 43, 40, 37 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ 37 เปอร์เซ็นต์อะซีโตไนไทรล์ในน้ำ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 45 นาที จึงเลือกสภาวะดังกล่าวมาใช้ตลอดการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

1.4 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) การทดสอบความไว (sensitivity) และระดับความน่าเชื่อถือ (reliability) ของวิธีวิเคราะห์

เตรียมสารละลายมาตรฐานเฮกเอสตรอลในเมธานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 10.00, 7.50, 5.00, 2.50, 1.25 และ 0.63 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (จาก stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลายไดเอทธิลสติลเบสตรอลในตัวทำละลายเดียวกันเพื่อนำมาใช้เป็น internal standard (IS) ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สารละลายมาตรฐานเหล่านี้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ใน vial ที่ปิดฝาสนิทด้วย septum เพื่อป้องกันการระเหยของเมธานอลขณะที่ไม่ใช้งาน

ในการหาอัตราส่วนของเฮกเอสตรอลปริมาณต่าง ๆ เทียบกับ IS (weight ratios) และอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่ได้จากเฮกเอสตรอลปริมาณต่างกันเทียบกับ IS (peak area ratios) ดำเนินการโดยนำ 100 ไมโครลิตร ของสารละลายมาตรฐานเฮกเอสตรอลที่ระดับความเข้มข้น 10.00, 7.50, 5.00, 2.50, 1.25 และ 0.625 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใส่ใน vial (ปริมาณสาร 1000, 750, 500, 250, 125 และ 63 นาโนกรัม) หลังจากนั้นจึงดูดสารละลาย IS เติมลงไปผสมในแต่ละ vial ด้วยปริมาณเท่ากันคือ 500 นาโนกรัม ระเหยตัวทำละลายจนแห้งด้วยไนโตรเจน ละลายเฮกเอสตรอล และ IS กลับด้วยเมธานอล 0.5 มิลลิลิตร ฉีดสารผสมเหล่านี้ 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC แล้วดำเนินการวิเคราะห์ตามสภาวะที่กำหนดในข้อ 1.1-1.3 คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve) ของเฮกเอสตรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ IS แต่ละความเข้มข้นของเฮกเอสตรอลทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

สร้างกราฟมาตรฐานจากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนน้ำหนักและอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเฮกเอสตรอลและไดเอทธิลสติลเบสตรอล

1.5 ศึกษากระบวนการสกัดเฮกเอสตรอลในรูปอิสระ และเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์คืนกลับ (percent recovery)

กระบวนการสกัดเฮกเอสตรอลในการทดลองนี้ เริ่มต้นจากวิธีที่แนะนำโดย Lagana และ Marino (1991) และ Lee (1994) แต่เพื่อให้สอดคล้องกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี internal standard และเพิ่มระดับความน่าเชื่อถือ จึงทำการดัดแปลงกระบวนการบางขั้นตอน ประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด ประเมินจากผลการวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลในรูปอิสระที่ได้คืนกลับมาหลังผ่านกระบวนการสกัดโดยไม่ผสมกับเนื้อเยื่อ ซึ่งดำเนินการโดยนำ 10 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐานเฮกเอสตรอลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เนื้อสาร 10 ไมโครกรัม) ลงไปผสมกับ IS 10 ไมโครกรัม (จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายตามขั้นตอนต่าง ๆ ที่แสดงในภาพที่ 14 คือ เติมเอธานอล 20 มิลลิลิตร น้ำ 10 มิลลิลิตร และ 2 M HCl 5 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมคลอโรฟอร์มลงไป 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง ดูดเอาชั้นของคลอโรฟอร์มใส่ในขวดรูปลูกแพร์ สกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มอีก 2 ครั้ง ๆ ละ 10 มิลลิลิตร เก็บชั้นคลอโรฟอร์มทั้งหมดรวมกัน ระเหยคลอโรฟอร์มด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติมอะซีโตนระหว่างการระเหย 3 ครั้ง ๆ ละ 10 มิลลิลิตร เพื่อเร่งให้น้ำที่ปนอยู่กับคลอโรฟอร์มระเหยเร็วขึ้น ล้างสารที่สกัดออกมาด้วยอีเธอร์ 2-3 ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าสารต่าง ๆ ถูกถ่ายเทออกมาอย่างสมบูรณ์ (quantitatively transfer) รวมสารละลายอีเธอร์ทั้งหมด (ปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร) ลงใน vial ที่ทราบน้ำหนักแน่นนอน ระเหยอีเธอร์ให้แห้งด้วยไนโตรเจนใน water bath อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วละลายกลับด้วยเมธานอล 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายตัวอย่างด้วยชุด sample clarification kit ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณเปอร์เซ็นต์เฮกเอสตรอลที่ได้คืนกลับมา เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (สารปริมาณเดียวกันที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัด) ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

เฮกเอสตรอลมาตรฐาน + เอธานอล 20 มล. + น้ำกรอง 10 มล. + 2 M HCl 5 มล.

↓

เขย่าให้เข้ากัน

↓

บ่มใน water bath 60 องศาเซลเซียส 30 นาที

↓

เติมคลอโรฟอร์ม 10 มล. ตั้งไว้ค้างคืน ที่อุณหภูมิห้อง

↓

สกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม 2 X 10 มล.

รวมชั้นคลอโรฟอร์ม → เก็บชั้นคลอโรฟอร์มในขวดรูปลูกแพร์

↓

ระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporate อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

↓

เติมอะซีโตน 3 x 10 มล. เพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

↓

ระเหยจนแห้งสนิท

↓

ล้างตัวอย่างด้วยอีเธอร์ 2 – 3 ครั้ง (ปริมาตรรวม 1 มล.) เก็บใน mini vial

↓

ระเหยอีเธอร์ด้วยแก๊สไนโตรเจน ใน water bath 60 องศาเซลเซียส

↓

ละลายกลับด้วยเมธานอล 1 มล.

↓

กรอง

↓

วิเคราะห์ตัวอย่างด้วย HPLC

ภาพที่ 14 วิธีการสกัดและทำให้บริสุทธิ์

2. การทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลในเนื้อเยื่อไก่

2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อไก่

เนื้อเยื่อไก่ที่นำมาศึกษาเฮกเอสตรอลตกค้างในการทดลองนี้คือกล้ามเนื้อและตับ ซึ่งเก็บตัวอย่างหลังจากสัตว์ทดลองได้รับเฮกเอสตรอลโดยวิธีฝังใต้หนังศีรษะเป็นเวลา 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ผลการวิเคราะห์นำไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ฝังฮอร์โมน (control group) ตัวอย่างกล้ามเนื้อได้จากการผสมเนื้อหน้าอกและเนื้อสะโพกอย่างละ 5 กรัม โดยตัดแบ่งเนื้อแต่ละส่วนออกเป็นชิ้นย่อย 5 ชิ้น แล้วจึงตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ หลังจากนั้นสุ่มแต่ละส่วนให้ได้น้ำหนักแน่นอนใส่ใน vial ที่ทราบน้ำหนัก ปิดด้วย aluminium foil นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส ระเหิดเนื้อเยื่อด้วย freeze drier ให้แห้งสนิท (น้ำหนักคงที่) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน บันทึกน้ำหนักแห้งแล้วปิดฝาให้แน่น พันทับด้วยพาราฟิน (paraffin) เก็บที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น (desiccator) ระหว่างรอการวิเคราะห์ไม่เกิน 10 วัน ในกรณีของเนื้อเยื่อตับ ดำเนินการเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ แต่ใช้น้ำหนักตัวอย่างสด 10 กรัม

2.2 ทดสอบวิธีสกัดเฮกเอสตรอลและประเมินสารสอดแทรก (interferences) ในสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

สารสอดแทรกในสารละลายที่สกัดจากเนื้อเยื่อ ที่สามารถส่งผลต่อระดับความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ ทำการทดสอบโดยนำตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ชุดควบคุม (ไม่ฝังฮอร์โมน) ที่แห้งสนิทซึ่งเตรียมตามข้อ 2.1 ใส่ในกระบอกตวง บดด้วยแท่งแก้วให้ละเอียด ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายตามขั้นตอนต่าง ๆ ที่แสดงในภาพที่ 14 นำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามสภาวะที่กำหนดในข้อ 1.1 – 1.3 ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

3. การวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลในเม็ดฮอร์โมนที่ฝัง และส่วนที่ไม่ถูกดูดซึมในศีรษะไก่

ปริมาณเฮกเอสตรอลในเม็ดฮอร์โมนทางการค้าที่ใช้ฝังศีรษะไก่ในการทดลองนี้ วิเคราะห์โดยนำฮอร์โมนแต่ละเม็ดซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอน ไปบดให้ละเอียดและผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งออกเป็น 2 ส่วน เพื่อแยกการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ซ้ำ เติม IS ลงไป 5 มิลลิกรัม นำของผสมที่ได้ไปสกัดด้วยตัวทำละลายตามขั้นตอนต่าง ๆ (ภาพที่ 14) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลด้วย HPLC คำนวณปริมาณในแต่ละเม็ดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อสามารถบอกปริมาณเฮกเอสตรอลในแต่ละเม็ดให้ใกล้เคียงความจริงมากที่สุด

ปริมาณเฮกเอสตรอลส่วนที่ไม่ถูกดูดซึม หลังการฝังที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทดลองวิเคราะห์โดยกรีดหนังบริเวณที่ฝังฮอร์โมน เก็บส่วนที่เหลือด้วย forceps ใส่ใน vial ล้างบริเวณดังกล่าวด้วยเอธานอล 5 ครั้ง ๆ ละ 1 มิลลิลิตร รวมสารละลายเอธานอลทั้งหมดลงใน vial เดียวกัน นำไป sonicate เพื่อให้เม็ดฮอร์โมนละลายอย่างสมบูรณ์ เป็นเวลา 5 นาที ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยเอธานอล กรองด้วยชุด sample clarification kit เก็บสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ใน vial ซึ่งปิดฝาสนิท แล้วพันทับด้วยพาราฟิน เพื่อป้องกันการระเหยระหว่างรอนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลด้วย HPLC คำนวณปริมาณฮอร์โมนที่ถูกดูดซึมจากผลต่างระหว่างปริมาณฮอร์โมนแต่ละเม็ดกับปริมาณส่วนที่ไม่ถูกดูดซึม

4. **การวิเคราะห์ปริมาณเฮกเอสตรอลตกค้างในเนื้อเยื่อไก่**

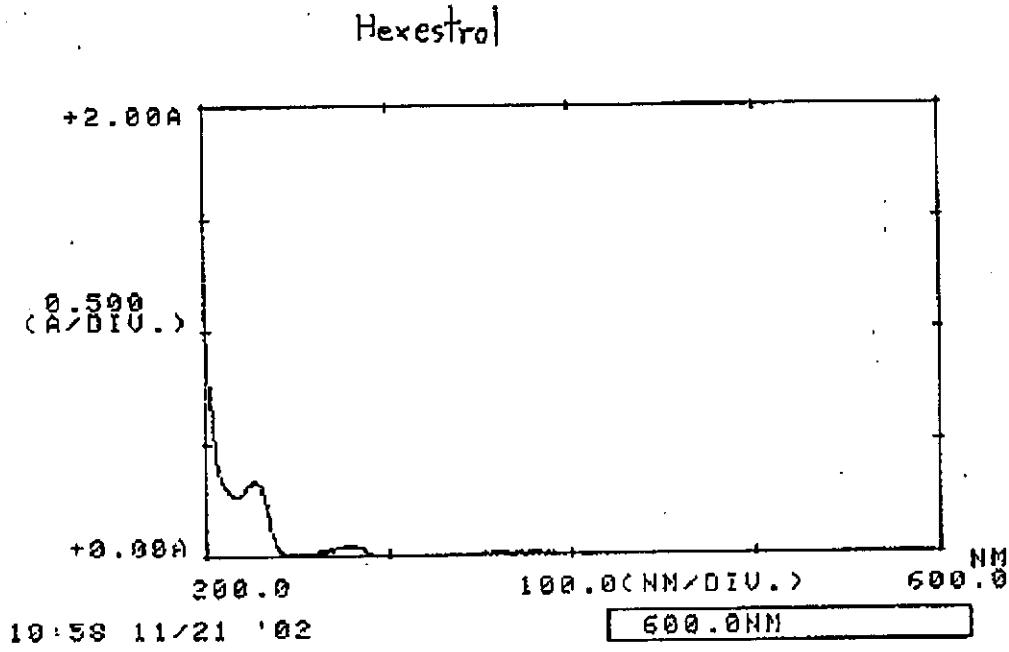
การวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลตกค้างในเนื้อเยื่อไก่ ดำเนินการโดยนำตัวอย่างซึ่งเตรียมไว้ตามวิธีในข้อ 2.1 มาบดให้ละเอียด แล้วเติม IS 10 ไมโครกรัม (จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังกล่าวในข้อ 1.5 กรองสารละลายด้วยชุด sample clarification kit เก็บสารละลายตัวอย่างใน vial ปิดฝาให้แน่น พันทับด้วยพาราฟินเพื่อป้องกันการระเหย เก็บสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ระหว่างรอนำไปวิเคราะห์ ด้วย HPLC

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. **สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เฮกเอสตรอล ด้วยเทคนิค** HPLC

1.1 **ความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง**

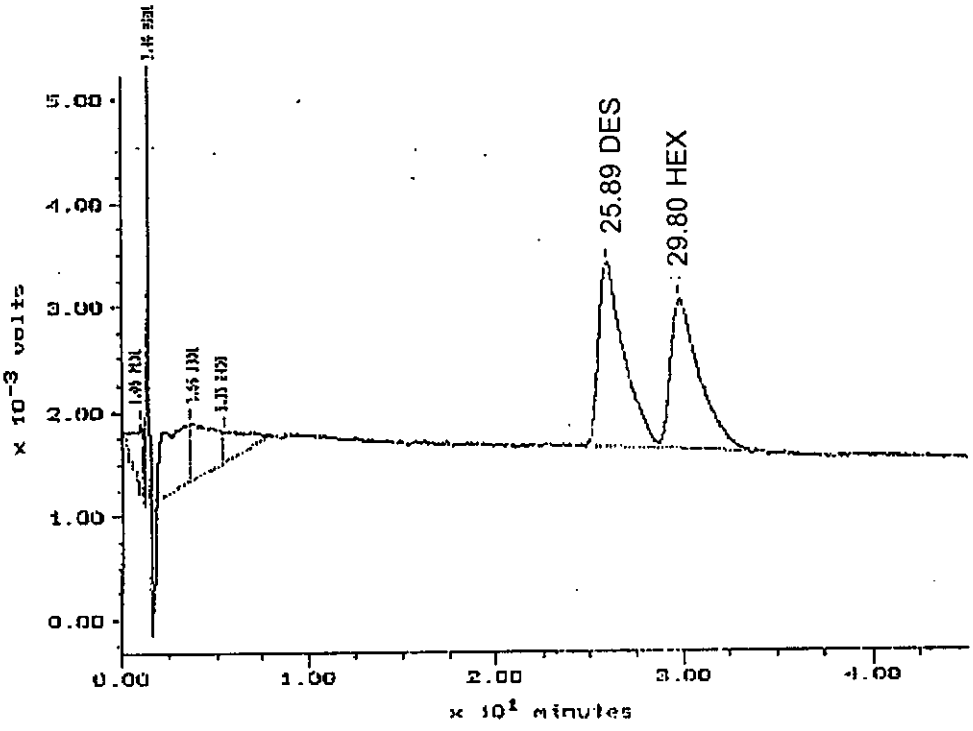
ภาพที่ 15 แสดงผลการศึกษา absorption spectrum ของเฮกเอสตรอลที่ละลายในเมธานอล พบว่าสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jansen และ คณะ (1992) ดังนั้นในการวิเคราะห์เฮกเอสตรอลเชิงปริมาณตลอดการศึกษานี้จึงใช้ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง



ภาพที่ 15 absorption spectrum ของเฮกเอสตรอลในเมธานอล

1.2 **การศึกษาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม**

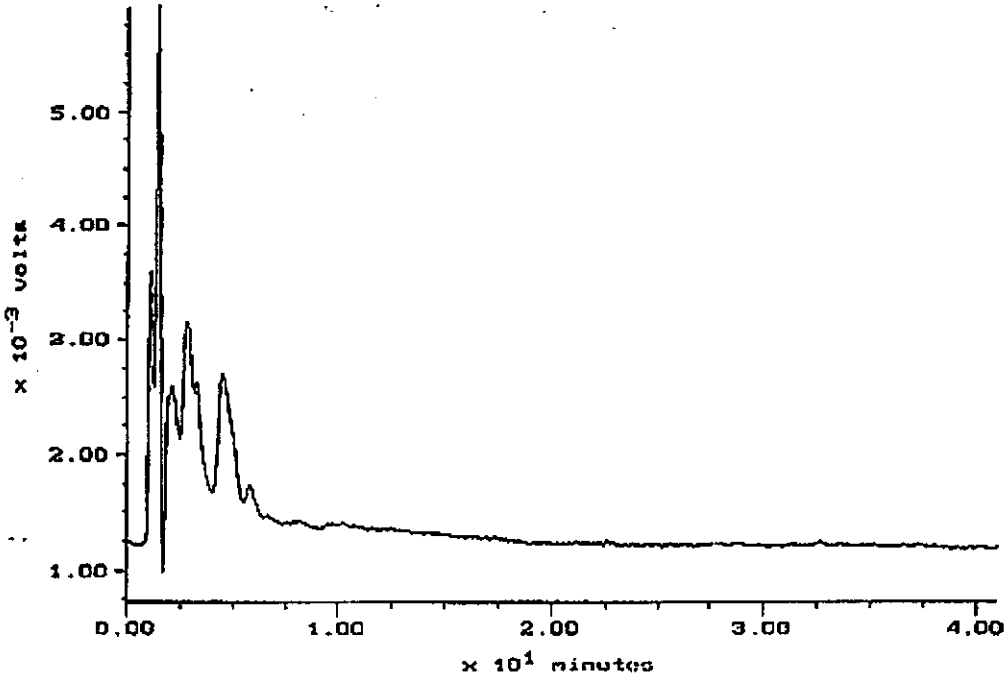
ผลการทดสอบอัตราส่วนของอะซีโตไนไทรล์ : น้ำ ซึ่งใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการแยกเฮกเอสตรอลออกจากไดเอทธิลสติลเบสตรอลด้วย HPLC ตามสภาวะที่กำหนดในข้อ 1.2 แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สามารถแยกสารประกอบทั้งสองออกจากกันได้อย่างชัดเจนคือ 37:63 (ภาพที่ 16) ทั้งนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 45 นาที แม้ว่าเฮกเอสตรอลจะถูกชะออกมาเร็วขึ้นเมื่อใช้อะซีโตไนไทรล์สูงกว่า 37 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถแยกจาก IS ได้อย่างชัดเจน และแม้ว่าสารประกอบทั้งสองจะแยกออกจากกันได้ดีขึ้น เมื่อใช้อะซีโตไนไทรล์ด้วยอัตราส่วนต่ำกว่านี้ แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นานขึ้น



ภาพที่ 16 โครมาโตแกรมการแยกเฮกเอสตรอลออกจากไดเอทธิลสติลเบสตรอลด้วย HPLC เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ อะซีโตไนไทรล์ : น้ำ ที่อัตราส่วน 37 : 63

1.3 ทดสอบสารสอดแทรกในสารละลายที่สกัดจากเนื้อเยื่อไก่

ภาพที่ 17 แสดงผลทดสอบสารสอดแทรก ในสารละลายที่ได้หลังผ่านกระบวนการสกัดจากเนื้อเยื่อไก่กลุ่มควบคุม จะเห็นว่าไม่พบสารสอดแทรกปรากฏในโครมาโตแกรม ที่ระยะเวลาซึ่งเฮกเอสตรอลและไดเอทธิลสติลเบสตรอลถูกชะออกมา (retention time) จึงสรุปได้ว่าตัวทำละลายที่ใช้รวมทั้งขั้นตอนต่าง ๆ ของวิธีสกัดไม่ทำให้เกิดปัญหาสารสอดแทรกในสารละลายตัวอย่างที่ส่งผลต่อระดับความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

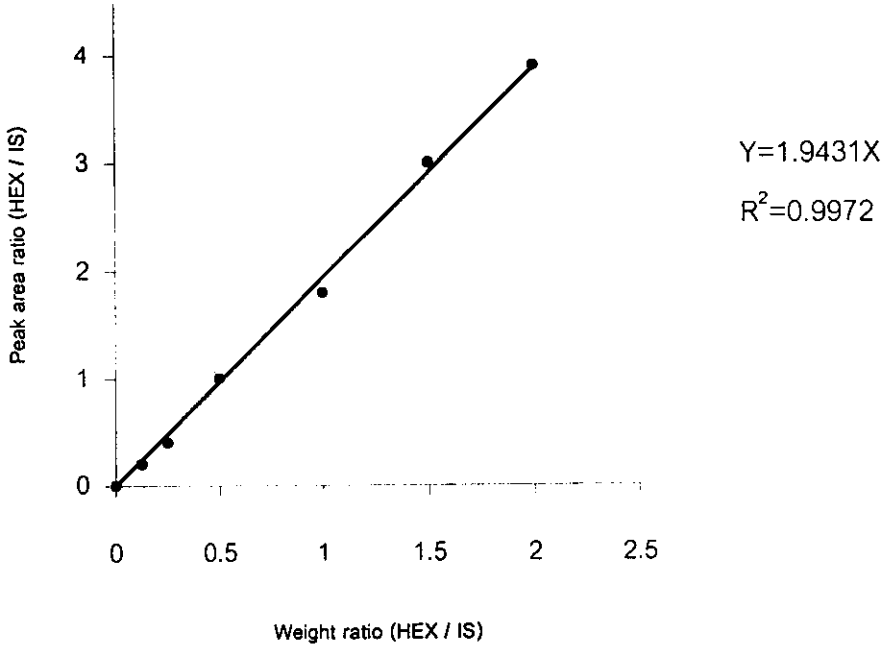


ภาพที่ 17 ผลทดสอบสารสอดแทรกในสารละลายหลังผ่านกระบวนการสกัดจากเนื้อเยื่อไก่

1.4 **กราฟมาตรฐาน**

ภาพที่ 18 แสดงกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนน้ำหนัก กับพื้นที่ใต้กราฟของเฮกเอสตรอลและไดเอทธิลสติลเบสตรอลซึ่งใช้เป็น internal standard (IS) จะเห็นว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นเส้นตรงและผ่านจุด origin เมื่อฉีด10 ไมโครลิตร ของสารละลายเฮก-เอสตรอลความเข้มข้น 0.63-10.00 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/μl) เข้าคอลัมน์ (column) โดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ peak area ratio = 1.9431weight ratio

ผลการวิเคราะห์ด้วยสมการ simple regression แสดงให้เห็นว่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) มีค่าเป็น 0.9972 จึงกล่าวได้ว่าวิธีการดังกล่าวนี้สามารถตรวจวิเคราะห์เฮกเอสตรอลในสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.63-10.00 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีระดับความแม่นยำ 99.72 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนน้ำหนัก (weight ratios) กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (peak area ratios) ของเฮกเอสตรอลและไดเอทธิลสติลเบสตรอลซึ่งใช้เป็น internal standard (IS)

1.5 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีสกัดเฮกเอสตรอลมาตรฐานและจากเนื้อเยื่อ

ตารางที่ 4 แสดงผลจากการนำสารละลายเฮกเอสตรอลมาตรฐาน ที่ผ่านกระบวนการสกัดตามกระบวนการในข้อ 1.5 มาวิเคราะห์ด้วย HPLC ด้วยสภาวะที่กำหนด (ในข้อ 1.1 – 1.3) เปรียบเทียบกับสารละลายเฮกเอสตรอลมาตรฐานปริมาณเท่ากันแต่ไม่ผ่านกระบวนการสกัด จะเห็นว่ากระบวนการดังกล่าว สามารถสกัดเอาเฮกเอสตรอลคืนกลับออกมาได้ 100.93±4.0 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) โดยมีค่า coefficience of variance (CV) เท่ากับ 3.96 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์เฮกเอสตรอลด้วย HPLC ในสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบกับสารปริมาณเดียวกัน (10 ไมโครกรัม) ที่สกัดคืนกลับมาได้

No.	Peak area (mV)		% Recovery
	Standard HEX*	Extracted HEX*	
1	209,196	217,596	104.02
2	238,415	233,786	102.37
3	209,252	201,736	96.41
Mean ± SD			100.93 ± 4.0

CV = 3.96 เปอร์เซ็นต์

* เป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ครั้ง ด้วย HPLC

ตารางที่ 5 แสดงผลการสกัดและวิเคราะห์เฮกเอสตรอล ในสารละลายที่ได้คืนกลับมาเมื่อเติมลงในกล้ามเนื้อไก่ชุดควบคุมหลังผ่านกระบวนการสกัด เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานเฮกเอสตรอลปริมาณเดียวกันที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัด จะเห็นว่าปริมาณที่สกัดคืนกลับและวิเคราะห์ได้หลังการเติมลงในเนื้อเยื่อคือ 93.3±3.70 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ค่า CV เท่ากับ 3.96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดโดยไม่ผสมลงในเนื้อเยื่อเล็กน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ Codex (1995) ที่กำหนดว่ายาสัตว์ที่ตกค้างในอาหารที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขึ้นไป วิธีวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ต้องมีค่าเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วง 80-100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า CV ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่ากระบวนการสกัดและวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลที่ตกค้างในเนื้อเยื่อด้วย HPLC ดังกล่าวนี้ สามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์เฮกเอสตรอลได้

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์คืนกลับของสารละลายมาตรฐานเฮกเอสตรอลในเนื้อไก่

No.	Peak area (mV)		% recovery
	Standard HEX*	Extracted HEX*	
1	200,258	188,386	94.07
2	203,532	181,720	89.28
3	224,512	216,768	96.55
Mean ± SD			93.3 ± 3.70

CV = 3.96 เปอร์เซ็นต์

* เป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ครั้ง ด้วย HPLC

2. **การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณในเม็ดเฮกเอสตรอล**

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณเฮกเอสตรอลในเม็ดฮอร์โมน ที่นำมาใช้ตอนไก่ในการทดลองนี้ พบว่าฮอร์โมนแต่ละเม็ดมีน้ำหนัก 19.86±0.24 มิลลิกรัม (n = 7) และมีเฮกเอสตรอลผสมอยู่ 19.64±0.65 มิลลิกรัม (n = 7) ค่านี้จึงนำมาใช้เป็นมาตรฐานสำหรับคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนที่ถูกดูดซึมโดยสัตว์ทดลอง

ตารางที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณในเม็ดเฮกเอสตรอล

No.	Weight / pellet (mg)	Peak area ratio* (HEX / IS)	Weight ratio** (HEX / IS)	Weight HEX / pellet (mg.)
1	19.50	3.70	1.90	19.04
2	20.00	3.85	1.98	19.81
3	20.00	3.95	2.03	20.33
4	20.00	3.91	2.01	20.12
5	20.00	3.80	1.96	19.56
6	19.50	3.60	1.85	18.53
7	20.00	3.90	2.01	20.07
mean ± SD	19.86 ± 0.24			19.64 ± 0.65
CV (%)	1.23			3.30

* เป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ครั้ง ด้วย HPLC

** weight ratio = (peak area ratio) / 1.9431

3. **การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลที่ไม่ถูกดูดซึมซึ่งเหลืออยู่ในศีรษะไก่**

เนื่องจากศีรษะไก่ที่อายุการตอน 4 สัปดาห์เกิดความเสียหายในระหว่างทดลอง การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเฮกเอสตรอลที่ไม่ถูกดูดซึมในตัวอย่างนี้จึงไม่สามารถดำเนินการได้ จึงรายงานเฉพาะอายุการตอนที่ 6 และ 8 สัปดาห์ ตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าหลังการฝังฮอร์โมนเฮกเอสตรอลประมาณ 19.64 มิลลิกรัม เป็นเวลา 6 และ 8 สัปดาห์ ปริมาณเฮกเอสตรอลที่ยังคงเหลืออยู่ในศีรษะไก่บริเวณที่ทำการฝังฮอร์โมน เท่ากับ 10.88±1.64 และ 1.11±0.27 มิลลิกรัม (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) (n = 4) ตามลำดับ หรือปริมาณที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายประมาณ 8.76 และ 18.76 มิลลิกรัม (44.60 และ 94.35 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ Herriman และคณะ (1982) รายงานว่าเมื่อฝังเฮกเอสตรอล 12 มิลลิกรัม (ปริมาณที่ระบุทางการค้า) ใต้ผิวหนังของศีรษะไก่เป็นเวลา 44 วัน ฮอร์โมนดังกล่าวถูกดูดซึมประมาณ 11.89 มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าผลการทดลองนี้ เป็นไปได้ว่าความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากขนาดของสัตว์ทดลอง ได้แก่ สัตว์ที่มีตัวขนาดเล็กจะมีอัตราเมแทบอลิซึม สูงกว่าสัตว์ที่มีตัวขนาดใหญ่ทำให้สามารถดูดซึมฮอร์โมนได้ดีกว่า

ตารางที่ 7 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเฮกเอสตรอลในศีรษะไก่

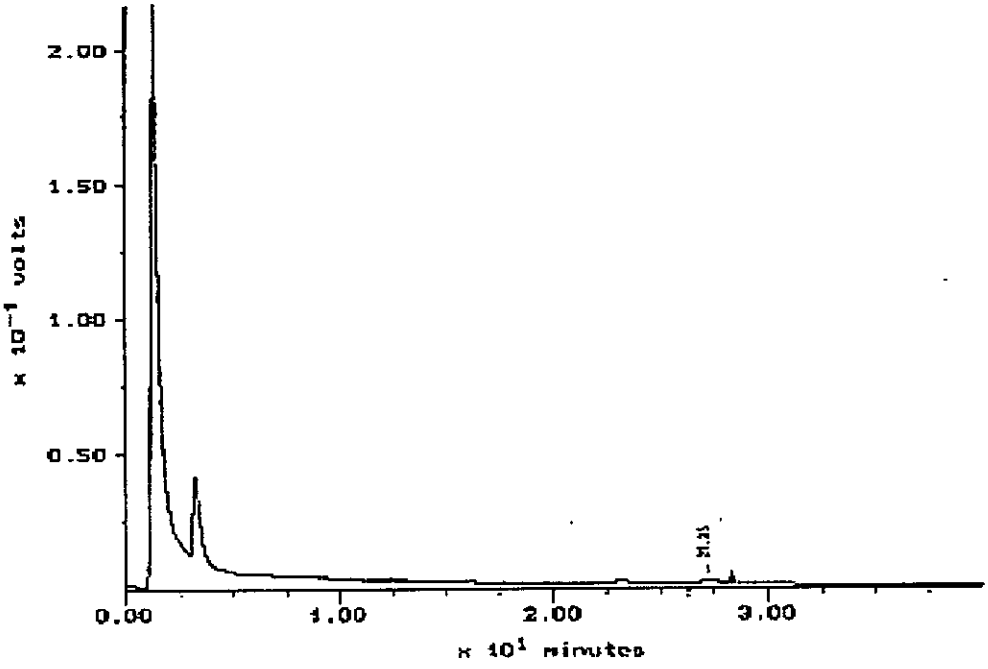
Implant stage (weeks)	No.	Peak area ratio* (HEX / IS)	Weight ratio** (HEX / IS)	Weight HEX (mg)
6	1	4.52	2.32	9.30
	2	6.32	3.25	13.02
	3	4.84	2.49	9.97
	4	5.46	2.81	11.23
Mean ± SD				10.88 ± 1.64
CV (%)				15.07
8	1	0.84	0.43	0.87
	2	0.90	0.46	0.92
	3	1.16	0.60	1.19
	4	1.42	0.73	1.46
Mean ± SD				1.11 ± 0.27
CV (%)				24.32

* เป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ครั้ง ด้วย HPLC

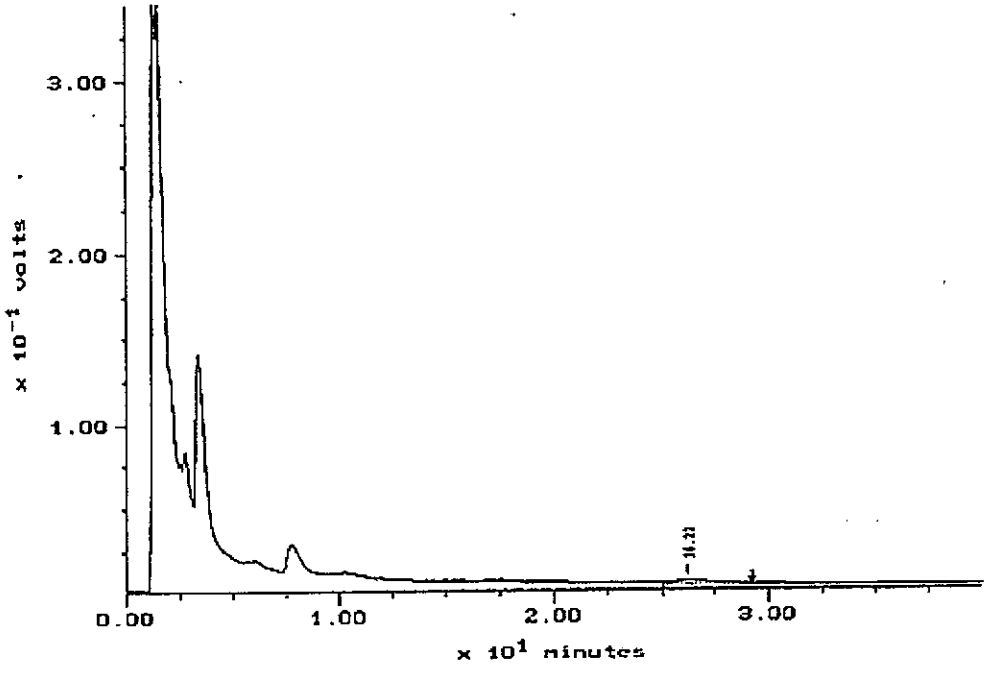
** weight ratio = (peak area ratio) / 1.9431

4. **การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลในกล้ามเนื้อและตับไก่**

ภาพที่ 19 และ 20 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเอสตรอลในกล้ามเนื้อและตับไก่ ตามลำดับ พบว่ากระบวนการสกัดและวิเคราะห์ดังกล่าวข้างต้น ไม่สามารถตรวจวัดเฮกเอส-ตรอลในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดหลังการฝังฮอร์โมนใต้ผิวหนังของศีรษะไก่เป็นเวลา4, 6 และ 8 สัปดาห์ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเฮกเอสตรอลที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายสัตว์ทดลองถูกเมแทบอไลท์ ไปเป็นสารประกอบชนิดอื่นซึ่งมีโอกาสที่จะตกค้างในกล้ามเนื้อและตับไก่ ด้วยปริมาณน้อยกว่า 62.5 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียกของตัวอย่าง ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในการทดลองครั้งนี้



ภาพที่ 19 โครมาโตแกรมของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเฮกเอสตรอลในเนื้อไก่ที่ 4 สัปดาห์หลังการฝังฮอร์โมน



ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเฮกเอสตรอลในตับไก่ที่ 4 สัปดาห์หลังการฝังฮอร์โมน