

การศึกษาวิธีการสกัดคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างเนื้อไก่ โดยวิธีการสกัดด้วย สถานะของแข็งและตัวทำละลาย

Study of The Extraction Method for Chloramphenicol Residues in Chicken Samples by Solid-phase Extraction and Solvent Extraction

สุภาวดี ดาวดี (Supawadee Daodee)*

จินดา หวังบุญสกุล (Jinda Wangboonskul)*

ทวี พรหมดี (Tave Promdee)*

วิมลศรี เกรว่อง (Wimonsri Telvong)*

มงคล กันตพานิชการ (Mongkol Kantapanichakan)*

*คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

คลอแรมเฟนิคอลเป็นยาปฏิชีวนะ ประเทศไทยมีมาตรการเข้มงวดในการนำเข้ารวมทั้งห้ามนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภค เพื่อป้องกันปัญหาการตกค้างของตัวยา ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดความเป็นพิษต่อมนุษย์ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการสกัดคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างเนื้อไก่เพื่อตรวจหาปริมาณที่ตกค้าง วิธีการสกัดด้วยสถานะของแข็งและการสกัดด้วยตัวทำละลายถูกนำมาใช้ในการสกัด ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลจะใช้วิธี رنگเลขของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัดคอลัมน์ ไรโอเลต-ฟลูออโรเมตริก จากผลการทดลองพบว่าการนำตัวอย่างเนื้อไก่มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการใช้สถานะของแข็ง จะให้ผลการสกัดเป็นที่น่าพอใจ ลดการรบกวนจากสิ่งต่างๆ ในเนื้อไกลงไปได้ จากตัวอย่างเนื้อไก่ที่เก็บจากร้านค้าที่จำหน่ายในตลาดเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่นทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ไม่มีตัวอย่างใดเลยที่ตรวจพบคลอแรมเฟนิคอล
คำสำคัญ : คลอแรมเฟนิคอล การสกัดด้วยสถานะของแข็ง การสกัดด้วยตัวทำละลาย เนื้อไก่

Abstract

Chloramphenicol is a broad-spectrum antibiotic which have a strictly regulation for importation and is not allowed to feed the animals for consumption in Thailand because of the toxicity in humans.

* ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ : โทรศัพท์ 043-362095, โทรสาร 043-202379

Corresponding author : Tel 043-362095, Fax 043-202379, Email address: csupawad@kku.ac.th

The purpose of this study was to determine the appropriate extraction method to detect the chloramphenicol residue in chicken samples. Solid-phase and liquid extraction were used in this study. To detect chloramphenicol, high performance liquid chromatographic method combined with ultraviolet-visible detector was used. From the result of this study, it could be concluded that the combination of solid-phase extraction and liquid extraction was appropriate and gave a good result for detecting the chloramphenicol residue in chicken. The method showed significantly reduce the interference from endogeneous substances. All 24 chicken samples collected from the markets in Muang district, Khon Kaen province, were not found chloramphenicol residue.

Keywords : Chloramphenicol, Solid-phase extraction, Liquid extraction, Chicken

บทนำ

ปัจจุบันการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงสัตว์นั้นแพร่หลายมาก ซึ่งเกือบจะไม่ต่างจากการใช้คนเลย ยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้และได้รับความนิยมใช้กันทั้งในการรักษาโรค การป้องกันโรค และการเสริมการเจริญเติบโต ได้แก่ ยาในกลุ่มเพนนิซิลลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน อ็อกซีเตตราไซคลิน คีโอสัยคลิน คลอแรมเฟนิคอล สเตรปโตมัยซิน นิโอมัยซิน เจนด้ามัยซิน กานามัยซิน อิริโทรมัยซิน สไปรามัยซิน โพลีมิกซินบี ฟลูออโรควิโนโลน เป็นต้น หากสัตว์นั้นไม่ป่วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกิดจากการติดเชื้อแล้ว สัตว์เลี้ยงก็จะเจริญเติบโตได้เร็วและให้ผลกำไรตอบแทนที่คุ้มค่า ด้วยเหตุผลนี้เองที่ทำให้มีการนำเอายาปฏิชีวนะผสมลงไปในการอาหารสัตว์ เพื่อช่วยในการป้องกันโรคและเสริมการเจริญเติบโต (Burgat et al. 1981) ในประเทศไทยไม่ได้มีการบันทึกไว้ว่าผู้ใดเป็นผู้เริ่มใช้และได้มีขึ้นเมื่อไหร่ แต่ปัจจุบันก็มีการลักลอบใช้ผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์จากคุณสมบัติที่ทราบกันคืออยู่แล้วว่า ยาปฏิชีวนะสามารถต่อต้านและทำลายเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นยาเหล่านี้จึงไปช่วยเสริมการเจริญเติบโตได้โดยไปมีผลต่อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยที่ไปขัดขวาง

หรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้สัตว์คิดเชื่อที่ไม่แสดงอาการให้เห็น นอกจากนี้ยังอาจทำให้มีการเพิ่มจำนวนหรือการทำงานของจุลินทรีย์ในการสังเคราะห์วิตามินหรือปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ และยังไม่ชัดเจนว่าไม่ทำให้จุลินทรีย์แย่งอาหารจากสัตว์ อย่างไรก็ตามผลเสียที่ตามมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์นั้น จะทำให้เกิดการดื้อยาและความเป็นพิษ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับที่ใช้ผสมอาหารเพื่อเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์นั้น จะเหลือตกค้างในเนื้อสัตว์ไม่มากและอาจอยู่ในระดับที่เราไม่สามารถตรวจพบได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อหยุดใช้ยาตามกำหนดเวลาก่อนส่งสัตว์ไปฆ่า จึงไม่ก่อให้เกิดพิษต่อผู้บริโภค แต่สำหรับการใช้เพื่อรักษาโรคหรือเติมลงไปในการอาหารเลี้ยงสัตว์โดยปราศจากการแนะนำที่ถูกต้องหรือขาดความเข้าใจก็จะส่งผลให้เกิดการดื้อยาและก่อให้เกิดพิษ (บุญพร้อม 2525) นอกจากนี้แล้ว ปัญหาเรื่องการแพ้ยาซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ในคนที่ไม่เคยได้รับยาชนิดนั้นมาก่อน สิ่งที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือการคือยาพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับต่ำๆในการเลี้ยงสัตว์อาจจะส่งผลทำให้เกิดการดื้อยาในมนุษย์ที่บริโภคได้สูง ซึ่งจะมีผลต่อ

การรักษาต่อไป (NOAH 2003; WHO 2001)

คลอแรมเฟนิคอล (Martindale 1999) เป็นยาปฏิชีวนะ ซึ่งสกัดเป็นครั้งแรกจากเชื้อรา *Streptomyces venezuele* เมื่อปี ค.ศ. 1947 สามารถสังเคราะห์ได้ในปี ค.ศ. 1949 มีหลักฐานบ่งชี้ว่ายานี้เป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติทางเม็ดเลือดขาว ซึ่งรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ ปัจจุบันนี้ใช้เฉพาะในผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อรุนแรงเช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ไข้ไทฟัส และไข้ไทฟอยด์ อาการไม่พึงประสงค์ที่พบจากการใช้คลอแรมเฟนิคอลคือ อาการพิษต่อระบบเลือด ซึ่งทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ เกร็ดเลือดต่ำ และไขกระดูกไม่เจริญเติบโต และกดการสร้างเม็ดเลือดแดงในไขกระดูก นอกจากนี้ยังเกิดอาการพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน และ ท้องเดิน อาการพิษในทารกเมื่อได้รับในขนาดสูงๆจะเกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า gray baby syndrome ในผู้ป่วยที่ขาดเอนไซม์ G6PD อาจทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกได้ จากการสอบถามข้อมูลจากผู้ประกอบการเลี้ยงไก่ ก็พบว่าคลอแรมเฟนิคอลเป็นยาที่มีการใช้ในการเลี้ยง โอกาสที่จะเกิดปัญหาการตกค้างเมื่อนำเนื้อไก่ไปบริโภคก็เป็นไปได้สูง ซึ่งพบว่าในประเทศไทยขณะนี้ได้มีการห้ามใช้คลอแรมเฟนิคอลในการเลี้ยงสัตว์ ดังนั้นเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคและเป็นการประกันคุณภาพของเนื้อไก่ที่มีจำหน่ายในประเทศ จึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาคลอแรมเฟนิคอลที่ตกค้างในเนื้อไก่เหล่านี้ เนื่องจากตัวอย่างเนื้อไคนั้นมีองค์ประกอบต่างๆมากมาย อาทิเช่น โปรตีน และไขมันชนิดต่างๆที่ส่งผลกระทบต่อ การตรวจพบตัวยาได้ ซึ่งจากงานวิจัยต่างๆที่ผ่านมา ก็ได้มีการศึกษาถึงวิธีการสกัดและวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างต่างๆ อาทิเช่น น้ำมันสัตว์ (Pfenning et al. 1998; Kolosava et al. 1999; Epstein 2002) เนื้อกึ่ง (Pfenning et al. 2000) และ เนื้อวัว

(Cooper et al. 1998) วิธีที่ใช้ในการสกัดก็มีทั้งการใช้ตัวทำละลายในการสกัดและสถานะของแข็งก็มี การนำมาใช้เช่นเดียวกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมและสกัดตัวอย่างเนื้อไก่โดยใช้สถานะของแข็งและตัวทำละลาย เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาคลอแรมเฟนิคอล และเป็นการลดสิ่งรบกวนต่างๆ ที่มีในเนื้อไก่ ทำให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

วัสดุและอุปกรณ์

อุปกรณ์

เครื่องรอกเลขของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) ของบริษัท Hewlett-Packard รุ่น G1310A ร่วมกับเครื่องตรวจวัดชนิดอูลตราไวโอเล็ต-วิชิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลที่ผ่านการสกัดและเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิด ODS Hypersil® ขนาด 5 ไมครอน, 250x4 มิลลิเมตร ส่วนคาร์ทริดจ์ของสถานะของแข็ง (solid-phase cartridge) ที่ใช้จะเป็น C18 Sep-Pak® ขนาด 100 มก. x 1 มล. ของบริษัท Waters

สารเคมี

สารมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka (Switzerland) สารเคมีและตัวทำละลายอื่นๆ ที่ใช้เป็นชนิดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทั้งหมด (AR grade)

ตัวอย่างเนื้อไก่

ตัวอย่างเนื้อไก่ทั้งหมด 24 ตัวอย่างได้ทำการซื้อจากร้านจำหน่ายเนื้อไก่ในตลาดสด 21 แห่ง และห้างสรรพสินค้าในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 3 แห่ง โดยตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างเนื้อไก่สด

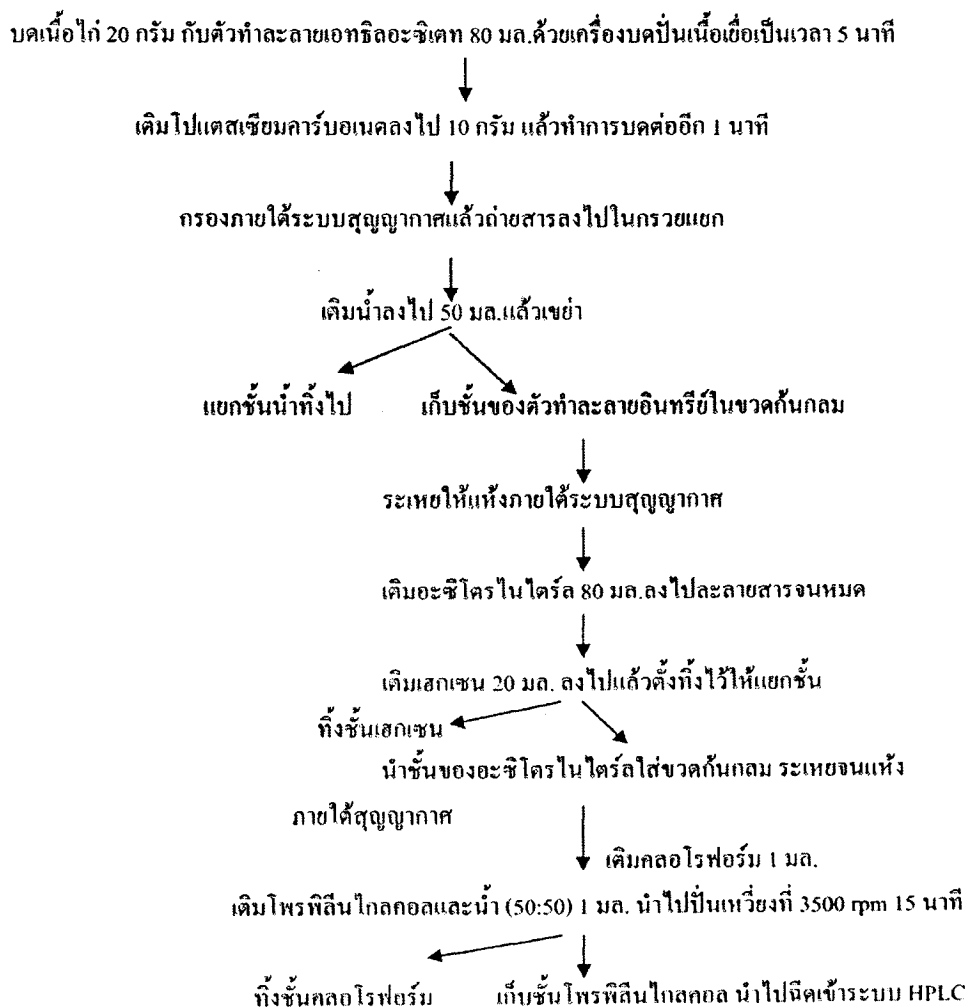
วิธีการวิจัย

1. วิธีการวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอล

ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลด้วยเครื่องรอกเลขของเหลวสมรรถนะสูง จะใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 35:65 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จะอยู่ที่ 1 มล./นาที ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดคือ 280 นาโนเมตร ส่วนสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ในครั้งนี้จะใช้พารา-คลอโรอะเซตามิไนด์ (p-chloroacetanilide)

2. การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

จากการทดลองสกัดด้วยตัวทำละลายหลายๆ ชนิด ก็พบว่าวิธีการสกัดที่ให้ผลดีที่สุดจะใช้ เอทิลอะซิเตท อะซิโตรไนไตรล์ เฮกเซน และ โพรพิลีนไกลคอลในการสกัด ดังแสดงในแผนผังการสกัดในรูปที่ 1 โดยก่อนที่จะนำตัวอย่างเนื้อไก่มาสกัดด้วยวิธีดังกล่าว ก็ได้มีการเติมสารละลายคลอแรมเฟนิคอลลงไปในตัวอย่ก่อนการสกัด แล้วนำมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (percent recovery) พร้อมกับหาขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการหาปริมาณ (limit of detection and limit of quantification)

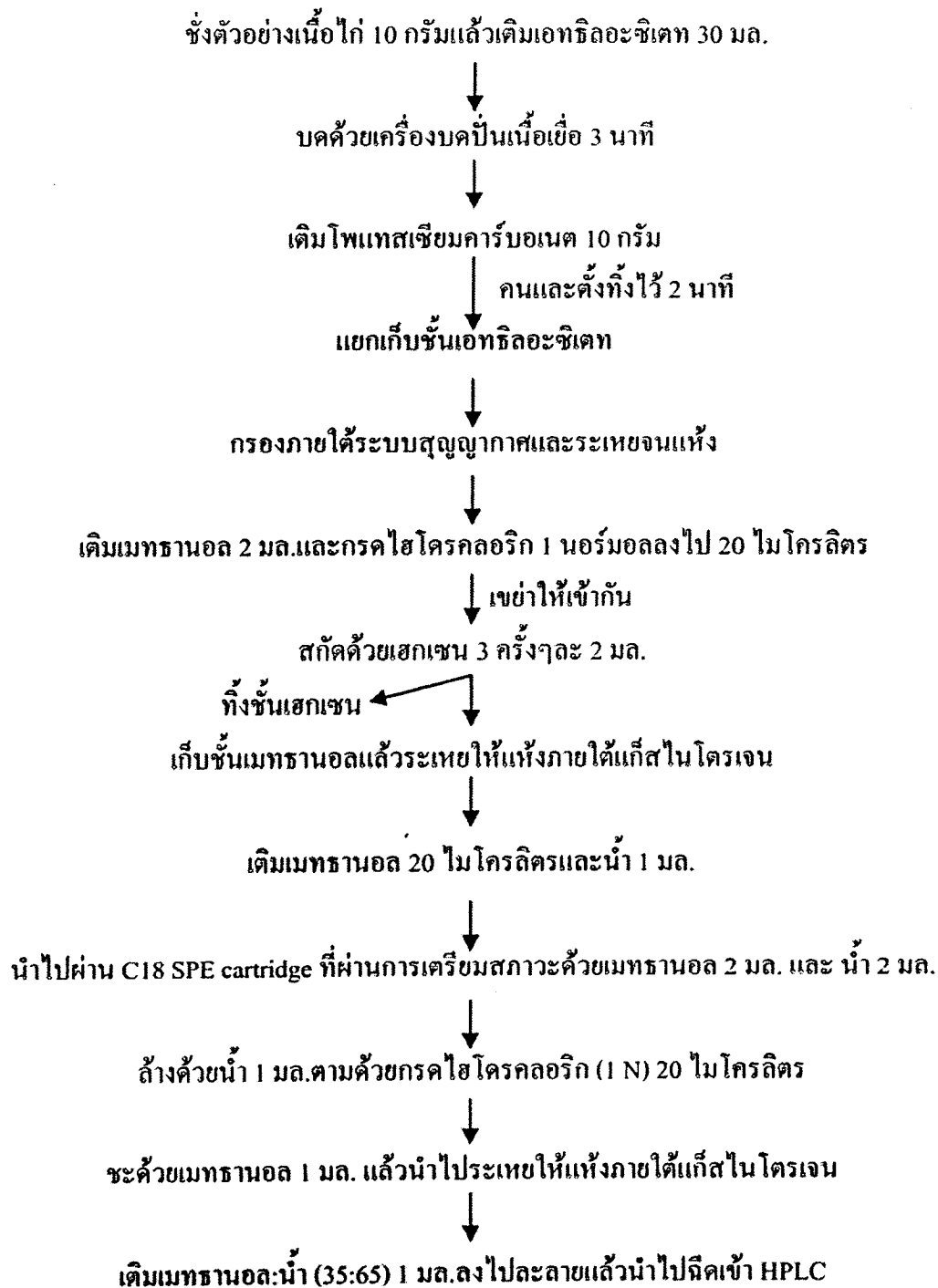


รูปที่ 1 แผนผังการสกัดคลอแรมเฟนิคอลด้วยตัวทำละลาย

3. การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วยสถานะของแข็งร่วมกับการใช้ตัวทำละลาย

ได้ทำการทดลองใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการสกัดด้วยสถานะของแข็ง โดย solid phase

cartridge ที่ใช้จะเป็นชนิด C18 พบว่าเมื่อทำการสกัดตามวิธีดังแสดงในแผนผังที่ 2 จะให้ผลการสกัดที่ดีที่สุด



รูปที่ 2 แผนผังการสกัดคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อไก่ด้วยตัวทำละลายและสถานะของแข็ง

4. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการใช้สถานะของแข็งและวิธีการวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลในเนื้อไก่

จากวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายและสถานะของแข็งต้องนำมาทดสอบความถูกต้องของวิธีการเตรียมและการวิเคราะห์หาคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อไก่ ก่อนที่จะสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ วิธีการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จะพิจารณาจากพารามิเตอร์ต่างๆดังนี้คือ การหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน (within-day and between-day precision) ซึ่งสามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้น 0.0250, 0.1000 และ 0.2000 ppm สำหรับการหาความเที่ยงภายในวันเดียวกันและความเข้มข้น 0.1000 ppm ในการหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ระหว่างวัน ความเที่ยงของวิธีการสกัดสามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลลงไปเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 0.1000 ppm แล้วทำการสกัดตามแผนผังในรูปที่ 2 คำนวณหาค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สำหรับการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สามารถทำได้โดยการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 0.0250, 0.1000 และ 0.2000 ppm แล้วทำการสกัด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสาร (percent recovery) ส่วนความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้น 0.0250, 0.0500, 0.0750, 0.1000 และ 0.2000 ppm จากนั้นนำไปฉีดเข้าสู่ระบบของ HPLC คำนวณอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานกับสารมาตรฐานภายใน นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)

ในส่วนของการหาขีดจำกัดในการหาปริมาณและขีดจำกัดในการตรวจพบของวิธีวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำมาคำนวณอัตราส่วนของสัญญาณพิกัดสารมาตรฐานกับสัญญาณรบกวน ถ้ามีค่าประมาณ 10 จะแสดงถึงขีดจำกัดการหาปริมาณ และถ้าหากมีค่าประมาณ 2-3 จะแสดงถึงขีดจำกัดในการตรวจพบ

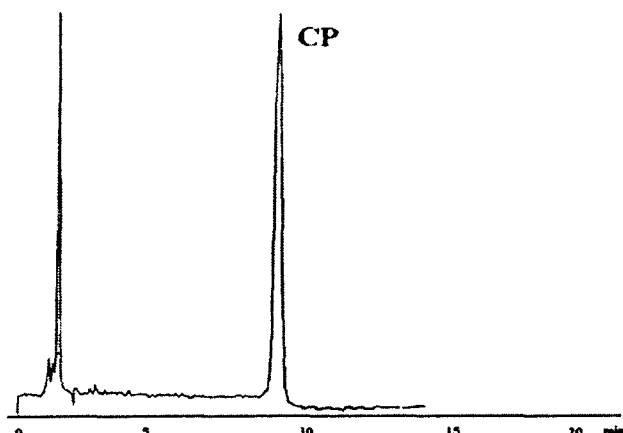
5. การวิเคราะห์หาคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างเนื้อไก่

นำตัวอย่างเนื้อไก่ที่ซื้อมาจากแหล่งต่างๆ ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น บดแล้วนำมาชั่งให้ได้น้ำหนักถูกต้องประมาณ 10 กรัม จากนั้นนำมาเติมสารมาตรฐานภายใน พารา-คลอโรอะเซตนิลิด (ความเข้มข้น 1 ppm) 1 มล. แล้วนำมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายตามด้วยสถานะของแข็ง ตามแผนผังการสกัดในรูปที่ 2 จากนั้นนำไปฉีดเข้าสู่ระบบของ HPLC แล้วคำนวณหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนมาในตัวอย่าง โดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมมาจากสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล

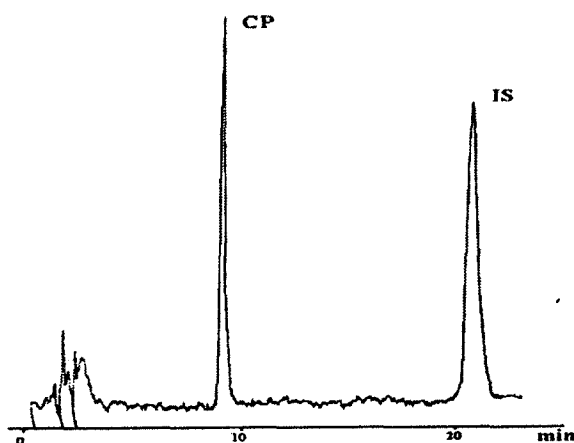
ผลการทดลอง

1. การหาระบบของรงคเลขของเหลวสมรรถนะสูงที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอล

โดยพบว่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่และสถานะต่างๆที่นำมาใช้มีความเหมาะสม จะปรากฏพีคของคลอแรมเฟนิคอลที่เวลา 9.5 นาที ส่วนพีคของพารา-คลอโรอะเซตนิลิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานภายในจะปรากฏที่เวลา 21.8 นาที ซึ่งจะไม่เกิดการรบกวนจากพีคอื่นๆที่พบเมื่อทำการสกัดตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4



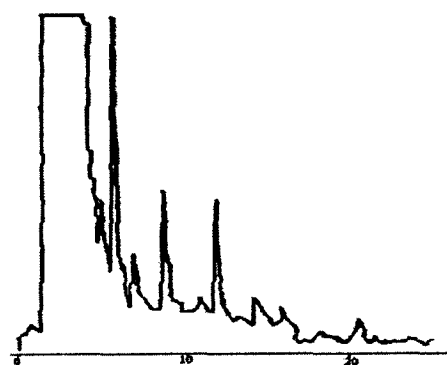
รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล (CP) ที่ความเข้มข้น 1 ppm โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวทำละลายเมทธานอลและน้ำในอัตราส่วน 35:65 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1 มล./นาที



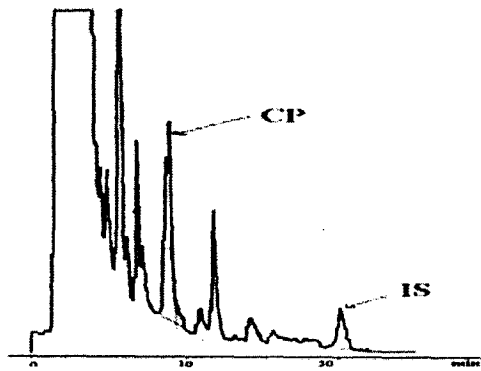
รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้น 1 ppm และ สารละลายพารา-คลอโรอะซิโตนีลิตที่ความเข้มข้น 1 ppm โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวทำละลายเมทธานอลและน้ำในอัตราส่วน 35:65 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1 มล./นาที

2. การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

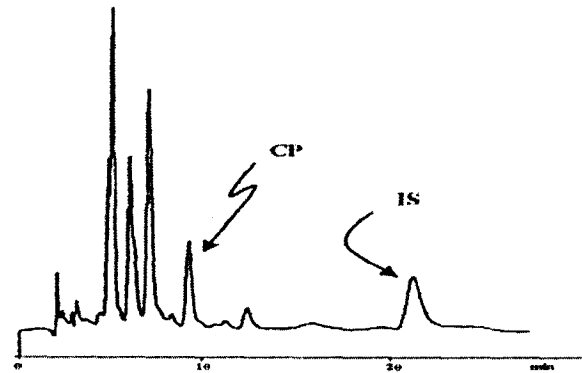
ผลการสกัดของการใช้ตัวทำละลายตามแผนผังที่ใช้ในรูปที่ 1 นั้น จะได้โครมาโทแกรมของการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่ได้เติมคลอแรมเฟนิคอลดังในรูปที่ 5 และเมื่อทำการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลลงไปจะได้โครมาโทแกรมดังในรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าพีคของคลอแรมเฟนิคอลไม่แยกชัดเจนจากพีคของสารรบกวนในเนื้อไก่ผลการสกัดจึงยังไม่ดีเท่าที่ควร จากผลการสกัดโดยวิธีดังกล่าว จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์การก่อกวนกลับของคลอแรมเฟนิคอลที่ได้จากการสกัดในเนื้อไก่เท่ากับ 50.56 เปอร์เซ็นต์ และ พารา-คลอโรอะซิโตนีลิตมีค่าเท่ากับ 15.82 เปอร์เซ็นต์ ชีดจำกัดในการตรวจพบจะมีค่าเท่ากับ 0.0102 ppm ส่วนขีดจำกัดในการหาปริมาณจะมีค่าเท่ากับ 0.0512 ppm ซึ่งวิธีการสกัดดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การก่อกวนกลับต่ำมาก จึงควรต้องพัฒนาขั้นตอนและวิธีการสกัดใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมของการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยตัวทำละลาย โดยที่ไม่ได้เติมคลอแรมเฟนิคอลโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวทำละลายเมทธานอลและน้ำในอัตราส่วน 35:65 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1 มล./นาที



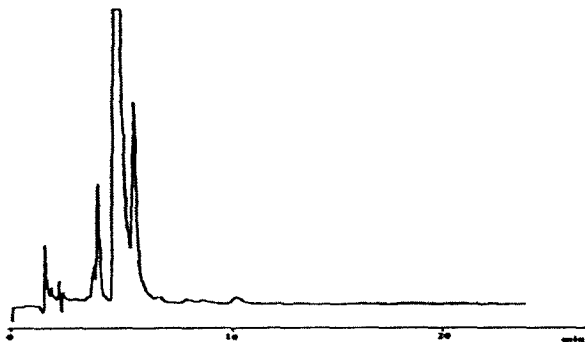
รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยตัวทำละลายโดยที่เติมคลอแรมเฟนิคอล (CP) และสารมาตรฐานภายใน (IS) ลงไป โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวทำละลายเมทธานอลและน้ำในอัตราส่วน 35:65 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1 มล./นาที



รูปที่ 8 โครมาโทแกรมของการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยตัวทำละลายร่วมกับสถานะของแข็ง ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล (CP) และสารมาตรฐานภายใน (IS) ลงไป โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวทำละลายเมทธานอลและน้ำในอัตราส่วน 35:65 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1 มล./นาที

3. การเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการใช้สถานะของแข็ง

จากวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ตามแผนผังในรูปที่ 2 นั้นพบว่าสามารถใช้ในการวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลได้อย่างถูกต้อง โดยสามารถพิจารณาได้จากพีคของคลอแรมเฟนิคอลที่แยกจากสารมาตรฐานภายในและสิ่งรบกวนต่างๆ ในเนื้อไก่ได้อย่างชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8



รูปที่ 7 โครมาโทแกรมของการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยตัวทำละลายร่วมกับสถานะของแข็ง โดยที่ไม่ได้เติมคลอแรมเฟนิคอล โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวทำละลายเมทธานอลและน้ำในอัตราส่วน 35:65 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1 มล./นาที

เมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามพารามิเตอร์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ก็พบว่าวิธีที่ใช้มีความน่าเชื่อถือสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างเนื้อไก่ได้อย่างถูกต้อง แต่จากการสกัดที่มีหลายขั้นตอนทำให้มีข้อจำกัดในการเลือกใช้สารมาตรฐานภายใน โดยพารา-คลอโรอะเซตนิลิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานภายในในงานวิจัยครั้งนี้ ถึงแม้ว่าจะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเพียงแค่ 57.56 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่ก็พบว่ามีความเที่ยงในการวิเคราะห์ โดยพิจารณาได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่า 1.70 เปอร์เซ็นต์

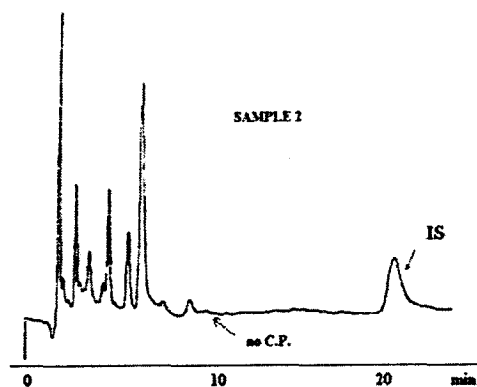
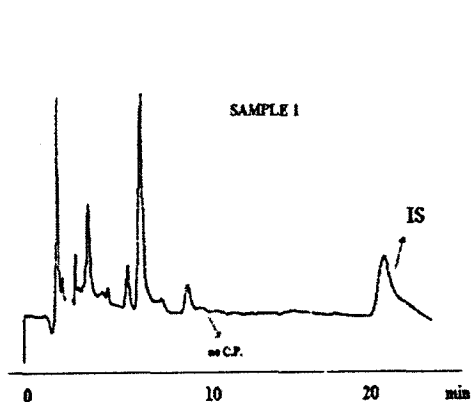
ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ต่างๆที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์

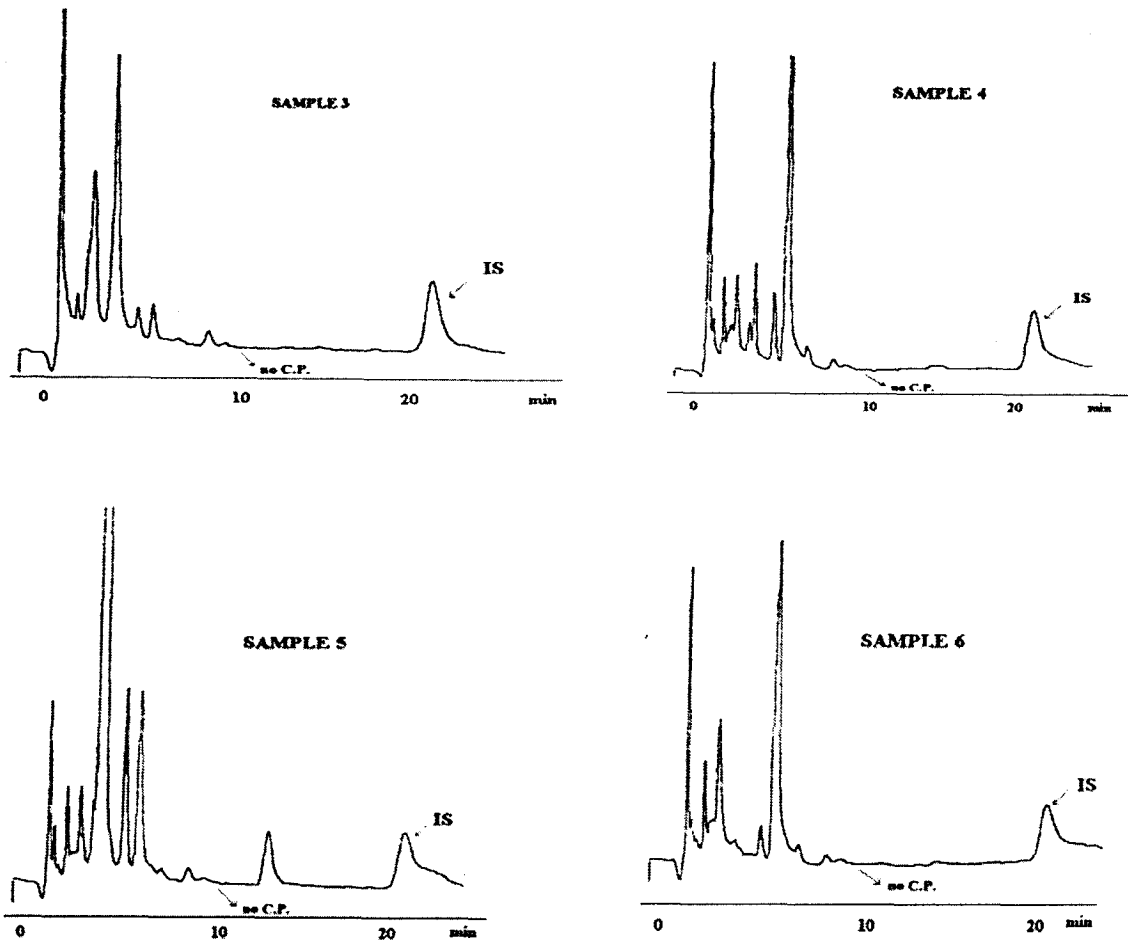
พารามิเตอร์	ผลที่ได้
ความเป็นเส้นตรง (Linearity), n= 3	$Y = 0.0611(\pm 0.0014) + 14.4767(\pm 0.9987)$ $r^2 = 0.9935 (\pm 0.0034)$
ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (within-day precision), n=5	%RSD = 3.57 (ความเข้มข้น 0.0250 ppm) %RSD = 2.91 (ความเข้มข้น 0.1000 ppm) %RSD = 1.31 (ความเข้มข้น 0.2000 ppm)
ความเที่ยงระหว่างวัน (between-day precision), n=10, 5 days	%RSD = 3.06 (ความเข้มข้น 0.1000 ppm)
ความเที่ยงของวิธีการสกัด (precision of extraction method), n= 10	%RSD = 4.29
ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection), n=3	0.0025 ppm
ขีดจำกัดในการหาปริมาณ (limit of quantification), n=3	0.0100 ppm
เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสาร (percent recovery), n=10	83.46 (± 0.33)% (chloramphenicol) 57.56(± 0.98)% (p-chloroacetanilide)

4. การวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างเนื้อไก่

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ที่ซื้อมาทั้งหมด 24 ตัวอย่างด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัด

ด้วยตัวทำละลายและสถานะของแข็งไม่พบตัวอย่างโคโรนาโทแกรมที่ปรากฏพีคของคลอแรมเฟนิคอลจากโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ ดังแสดงตัวอย่างของโครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ที่ 1-6 ในรูปที่ 9





รูปที่ 9 โครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ที่ 1-6 โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 35:65 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1 มล./นาที

วิจารณ์และสรุปผล

จากงานวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงวิธีการเตรียม ตัวอย่างและการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการ วิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลที่ตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่ ซึ่งพบว่าเมื่อเราใช้การสกัดโดยตัวทำละลายจะให้ ผลการสกัดที่ไม่ดีเท่าไรนักและพบว่ามีฟิครบ กวนส่งผลถึงความถูกต้องในการวิเคราะห์จะน้อยลง แต่ถ้าเลือกใช้สถานะของแข็งหรือ SPE cartridge อย่างเดียวในการสกัด จะทำให้เกิดการอุดตันจาก ไขมันและโปรตีนที่อยู่ในตัวอย่างเนื้อไก่ จากการ ศึกษาและทดลองใช้หลายๆวิธีในการสกัดก็พบว่า วิธีที่ได้ผลดีที่สุดก็คือการใช้ตัวทำละลายในการสกัด

ตัวอย่างก่อนแล้วจึงตามด้วยการสกัดโดยสถานะ ของแข็ง ทำให้ฟิครบกวนต่างๆจากตัวอย่างเนื้อไก่ ลดน้อยลงไปได้มาก แต่อย่างไรก็ตามวิธีที่พัฒนา ขึ้นมาก็ยังมียุทธศาสตร์ตรงที่ว่าต้องผ่านขั้นตอนหลาย ขั้นตอน ซึ่งถ้าคลอ-แรมเฟนิคอลมีปริมาณน้อยมาก ก็อาจจะหายไปขั้นตอนต่างๆของการสกัดได้ ดังนั้นจึงมีข้อเสนอแนะว่าควรจะมีการทดลองใช้วิธี สกัดวิธีอื่น อาทิ ใช้สถานะของแข็งชนิดอื่น ซึ่งใน ปัจจุบันได้มีการพัฒนาขึ้นมาเป็นชนิดที่เคลือบด้วย โพลีเมอร์ น่าจะทำให้ลดขั้นตอนในการสกัดด้วย ตัวทำละลายลงไปและทำให้ SPE cartridge เกิด การอุดตันลดลง

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ทั้งหมดไม่พบคลอแรมเฟนิคอลตกค้าง แต่อย่างไรก็ตามไม่อาจจะสรุปไปได้ว่าไม่มีการใช้ตัวยาคลอแรมเฟนิคอลในการเลี้ยง เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเฉพาะการวิเคราะห์หาตัวยาคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเนื้อไก่เท่านั้น แต่ไม่ได้ทำการศึกษาถึงเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้น คลอแรมเฟนิคอลเมื่อเข้าไปสู่ร่างกายก็จะเกิดขบวนการเมตาบอลิซึมและจะเปลี่ยนโครงสร้างไป เมื่อทำการตรวจเฉพาะตัวยาคลอแรมเฟนิคอลก็จะไม่พบ ดังนั้นข้อเสนอแนะอีกวิธีที่จะทำให้รู้แน่ชัดว่ามีการใช้คลอแรมเฟนิคอลในการเลี้ยงก็คือการใช้เทคนิคการวิเคราะห์อย่างอื่น และเครื่องตรวจวัดชนิดอื่นอาทิเช่นเครื่องลิควิด-แมสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จะทำให้สามารถระบุได้ว่ามีเมตาบอไลต์ของคลอแรมเฟนิคอลอยู่หรือไม่

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2544

เอกสารอ้างอิง

บุญพร้อม อิงคเวชากุล. (2525). การใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์และอันตรายที่นำกล้ว. กรุงเทพฯ: ฝ่ายวิชาการ คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Burgat V, Delatour P and Rico AG. (1981). Bound residues of veterinary drugs. *Ann Rev Vet.*, 13(3), pp. 277-289.

Cooper AD, Tarbin JA, Farrington WH and Shearer G. (1998). Aspects of extraction, spiking and distribution in the determination of incurred residues of chloramphenicol in animal tissues. *Food Add.& Cont.*, 15(6), pp. 637-644.

Epstein RL. (1994). International validation study for the determination of chloramphenicol in bovine muscle. *J. AOAC. Int.* 77(3), pp. 570-576.

Kolosova AI, Samsonova ZV, Egorov AM, Sheveleva SA, Orlova NG, Kiseleva TV, Khotimchenko, SA and Tutelian VA. (1999). Optimization of a method of solid-phase immunoenzyme analysis for determination of chloramphenicol in milk. *Vop. Pita.*, 68(1), pp. 23-27.

Martindale: The Complete Drug Reference. (1999). USA: Pharmaceutical Press. pp. 182-184.

National Office of Animal Health. (2003). The advisory committee on the microbiological safety of food report on:- Antibiotic resistance and food safety. United Kingdom.

Pfenning, AP, Madson MR, Roybal JE, Turnepseed SB, Gonzales SA, Hurlbut JA and Salmon GD. (1998). Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC. Int.*, 81(4), pp.714-720.

Pfenning AP, Roybal JE, Rupp HS, Turnepseed SB, Gonzales SA and Hurlbut JA. (2000). Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC. Int.*, 83(1), pp. 26-30.

World Health Organization. (2001). Monitoring antimicrobial usage in food animals for the production of human health, WHO consultation.