

การดัดแปลงและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีลิกนิตโครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์ปริมาณเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้ง

Modification and Validation of HPLC Method for the Determination of Tetracycline and Its Derivatives in Shrimp

นภาพรรณ ต้มสังข์ทอง¹ ตติย สีห์รัมย์² และวริพัทธ์ อารีกุล¹

บทคัดย่อ

การพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ด้วยวิธี HPLC ในการหาปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลิน (TC) และอนุพันธ์ 2 ชนิด ได้แก่ ออกซีเตตราซัยคลิน (OTC) และคลอริเตตราซัยคลิน (CTC) ในตัวอย่างกุ้ง ทำโดยการทดสอบสภาวะแบบไอโซครติกอีลูชัน การดัดแปลงไอโซครติกอีลูชัน และเกรเดียนท์อีลูชัน พบว่าค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT), ค่าความสามารถในการแยกที่ออกจากกัน (Rs) และค่าความสามารถในการยึดสารที่ตรวจสอบได้ในคอลัมน์ (k') มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) สภาวะแบบเกรเดียนท์อีลูชันให้ผลดีในการแยกและใช้ระยะเวลาทั้งหมดสั้นที่สุด สารมาตรฐานของ TC, OTC และ CTC มีสมการเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.997 ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.04-0.32, 0.05-0.32 และ 0.14-0.32 mg/kg ตามลำดับ ส่วนเฉลี่ยร้อยละค่าการกลับคืนในการสกัดตัวอย่างอยู่ในเกณฑ์การยอมรับระดับสากล โดยอยู่ในช่วงร้อยละ 81-107 ส่วนค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบที่แสดงในค่า HORRAT มีค่าน้อยกว่า 0.51 รวมทั้งมีค่าปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพของ OTC, TC และ CTC เท่ากับ 0.012, 0.015 และ 0.05 mg/kg ตามลำดับ ในขณะที่ค่าปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจวัดเชิงปริมาณ มีค่าเท่ากับ 0.05, 0.06 และ 0.15 mg/kg ตามลำดับ

คำสำคัญ: กุ้ง เตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน คลอริเตตราซัยคลิน การตรวจสอบความใช้ได้ ลิกนิตโครมาโทกราฟี

Abstract

The modification and validation for HPLC method the quantification of tetracycline (TC) and its derivatives (oxytetracycline (OTC) and chlortetracycline (CTC)) in shrimp samples was carried out. The retention time (RT), resolution (Rs) and capacity factor (k') were considered between isocratic elution, modified isocratic elution and gradient elution. The RT, Rs and k' were statistically different among elution conditions ($p \leq 0.05$). The gradient elution provided good performance in separation with the shortest total time consuming. The linearity of OTC, TC and CTC showed good correlations, the correlation coefficient was more than 0.997 at different concentrations levels ranging from 0.04-0.32, 0.05-0.32, 0.14-0.32 mg/kg, respectively. The average % recovery of sample extraction met the international acceptable level which in

¹คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

²ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

the range of 81-107% while precision shown in the HORRAT target was less than 0.51. The limit of detections (LOD) of OTC, TC and CTC were 0.012, 0.015, 0.05 mg/kg, respectively while the limit of quantification (LOQ) were 0.05, 0.06, 0.15 mg/kg, respectively.

Keywords: Shrimp, Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Validation, HPLC

คำนำ

ยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน เช่น ออกซีเตตราซัยคลิน (OTC), เตตราซัยคลิน (TC) และคลอร์เตตราซัยคลิน (CTC) เป็นที่นิยมใช้กันมากในการควบคุมป้องกัน และรักษาโรคจากเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง ทำให้พบการใช้ยาในปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง และไม่มีการหยุดยักก่อนการจับกุ้งจึงส่งผลกระทบต่อความต้านทานของยา (ชโล, 2543) ทำให้ปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อส่งออกสินค้าประเภทกุ้งแช่เย็นและกุ้งแช่แข็งอย่างมาก ประเทศผู้นำเข้าได้กำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้โดยผลิตภัณฑ์ (Maximum Residue Limits, MRLs) ไว้แตกต่างกันในแต่ละประเทศ เช่น ในประเทศญี่ปุ่น กำหนดค่า MRLs ของสารเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ 0.2 mg/kg ในผลิตภัณฑ์กุ้งเพาะเลี้ยง (Fish Inspection and Quality Control Division Department of Fisheries, 2006)

วิธีโครมาโทกราฟีเป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการตรวจสอบยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน พารามิเตอร์ต่างๆ ของวิธีโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการพิจารณากำหนดวิธีการในการแยกสารตัวอย่างอย่างสมบูรณ์แต่ใช้เวลาไม่น้อย ได้แก่ เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (retention time, t_R) แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, K') ค่าความสามารถในการแยกออกจากกัน (resolution, R_s) ปริมาตรทั้งหมดของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการชะ (retention volume, V_R) ค่า partition coefficient (K) และ selectivity factor (α) เป็นต้น ซึ่งค่าพารามิเตอร์เหล่านี้ จะเปลี่ยนแปลงตามการปรับเปลี่ยนอัตราเร็วของการชะ อุณหภูมิ อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ สภาวะ และประสิทธิภาพของคอลัมน์ เป็นต้น (แมนและอมร, 2534) อย่างไรก็ตาม ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่จะให้ผลถูกต้องและเป็นที่น่าเชื่อถือนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ โดยเฉพาะการนำวิธีมาตรฐานมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร หรือ matrix ที่ไม่ได้กำหนดไว้ในขอบข่ายของวิธีนั้น การปรับเปลี่ยนวิธีมาตรฐานหรือวิธีที่มีอยู่เดิม หรือการใช้วิธีใหม่ ซึ่งการตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบเป็นกระบวนการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีการทดสอบ (method performance characteristics) และประเมินด้วยวิธีการทางสถิติว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความถูกต้อง และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ซึ่งคุณลักษณะเฉพาะที่ใช้จำเป็นต้องใช้ในการประเมินความใช้ได้ของวิธีการ ได้แก่ ช่วงของการทดสอบ (range) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำของการทดสอบ (accuracy) ความเที่ยงของการทดสอบ (precision) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity) และความทนของวิธี (ruggedness/robustness) เป็นต้น ซึ่งการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะเหล่านี้อาจไม่จำเป็นต้องดำเนินการทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีทดสอบ และวัตถุประสงค์ของการใช้งาน (ทิพวรรณ, 2549)

Cinquina *et al.* (2003) ได้พัฒนาเทคนิคการสกัดตัวอย่างและเทคนิค HPLC มาใช้ในการตรวจสอบ OTC, TC, CTC และ doxycycline ในนมและเนื้อวัว รวมถึงการตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบ พบว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นตรงตาม ข้อกำหนดของ SANCO/1805/2000 European Decision requirement อย่างไรก็ตามเมื่อนำวิธีการดังกล่าวมาดัดแปลงใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณสารตกค้างของสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในตัวอย่างกุ้ง พบว่า ไม่สามารถใช้ทดสอบในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ เนื่องจากมีการรบกวนทับฟีกของสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ จึงจำเป็นต้องดัดแปลงวิธีการดังกล่าว และวิเคราะห์ความถูกต้องของผลการทดสอบเพื่อใช้ในการพัฒนา

ศักยภาพของห้องปฏิบัติการให้เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบเชิงคุณภาพสารประกอบ OTC, TC และ CTC ในตัวอย่างกึ่งด้วยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography-diode array detector, HPLC-DAD) และศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง รวมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้นด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี และสารละลายที่ใช้ ได้แก่ เมทานอล (MeOH) และอะซีโตไนโตรล์ (ACN) (HPLC grade), ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (AR grade) ของบริษัท Merck (เยอรมัน), กรดไดโซเดียมเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติก กรดซิตริก กรดไตรคลอโรอะซีติก และกรดออกซาลิก จากบริษัท Fisher Scientific (อังกฤษ), SPE HLB Oasis Cartridge 200 mg, 6 cc. (Water, เยอรมัน), และสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน (TC) ออกซีเตตราซัยคลิน (OTC) และคลอร์เตตราซัยคลิน (CTC) จากบริษัท Sigma (เยอรมัน)

การเตรียมสารมาตรฐาน โดยชั่งสารมาตรฐาน OTC 0.010 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้เท่ากับ 100 ml ในขวดวัดปริมาตร ทำเช่นเดียวกันในการเตรียม TC และ CTC จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 mg/L จากนั้นเปิดสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด อย่างละ 0.02 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml แล้วเจือจางด้วยเฟสเคลื่อนที่จนครบปริมาตร 10 ml จะได้สารละลายมาตรฐานผสมมีความเข้มข้น 0.2 mg/L

การเตรียมตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างกึ่งสดแช่แข็ง 5 g แล้วสกัดตัวอย่างตามวิธีของ Cinquina *et al.* (2003) และทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ SPE HLB Oasis cartridge จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง HPLC-DAD ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 series คอลัมน์ ZORBAX Eclipse XDB C-8 (250 x 4.6 mm, 5 μ m, 40°C) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 ml/min ใช้เครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบ DAD 365 นาโนเมตร และปริมาตรตัวอย่าง 20 μ l

ขั้นตอนในการทดสอบ

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพ

ทำโดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานผสมของ TC, OTC และ CTC ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/L โดยใช้สภาวะการชะ ดังนี้

- แบบไอโซครีติกอีลูชัน อัตราส่วนของ กรดออกซาลิก : MeOH : ACN เท่ากับ 60:15:25 (v/v/v) ตามวิธีของ Cinquina *et al.* (2003)

- แบบไอโซครีติกอีลูชันที่ดัดแปลง อัตราส่วนของ กรดออกซาลิก : MeOH : ACN เท่ากับ 83:5:12 (v/v/v)

- แบบเกรเดียนต์อีลูชัน อัตราส่วน กรดออกซาลิก : MeOH : ACN เปลี่ยนแปลงดังนี้คือ เวลาที่ 0 นาที อัตราส่วนเท่ากับ 83:5:12, เวลาที่ 7.0 นาที เท่ากับ 70:5:25, เวลาที่ 7.5 นาที เท่ากับ 70:5:25, เวลาที่ 9.0 นาที เท่ากับ 83:5:12 และ 15.0 นาที เท่ากับ 83:5:12 ในแต่ละสภาวะทดสอบซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ เพื่อหาค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT), ค่าความสามารถในการแยกฟีกออกจากกัน (Rs) และความสามารถในการยืดสารที่ตรวจสอบในคอลัมน์ (k')

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจสอบตัวอย่าง

โดยเติมสารละลายมาตรฐาน TC, OTC และ CTC ที่ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดเท่ากับ 0.2 mg/L ในตัวอย่างกึ่ง และสกัดตัวอย่าง ตามวิธีของ Cinquina *et al.* (2003) จากนั้นทดสอบตามสภาวะในข้อ 1 จำนวน 10 ซ้ำ พิจารณาลักษณะของโครมาโทแกรม

3. การทดสอบตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง

ทำโดยการสกัดตัวอย่างกึ่งตามวิธีของ Cinquina *et al.* (2003) และในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง

กึ่ง จะใช้ตัวทำละลาย 2 แบบ คือ เมธานอล และ ตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วยกรดออกซาลิก : MeOH : ACN ในอัตราส่วน 83:5:12 จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะการชะที่ได้จากข้อ 1 แล้วหาค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

ทำโดยศึกษาช่วงการทดสอบ (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) การประเมินปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (LOD) การประเมินปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) การประเมินความแม่นยำของการทดสอบ (accuracy) การประเมินความเที่ยงของการทดสอบ (precision) โดยประเมินความใช้ได้ของวิธีการทดสอบตามข้อแนะนำของ EURACHEM GUIDE (1998)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Random Design : CRD) และทดสอบความแปรปรวน (ANOVA) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test : Paired Two Sample for Mean ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมการทดสอบทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

สภาวะการชะที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชิงคุณภาพของสารละลายมาตรฐาน

ผลการตรวจสอบสารประกอบ TC, OTC และ CTC ด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน 3 แบบสามารถแสดงดัง Figure 1 พบว่าการใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไอโซครติกอิลูชัน ตามวิธีการของ Cinquina *et al.* (2003) จะใช้เวลาในการตรวจสอบทั้งสิ้นประมาณ 4 นาที แต่โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานพบว่า ฐานพีกของ OTC และ TC ซ้อนทับกัน และมีค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT) ใกล้เคียงกัน รวมทั้งมีค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) เท่ากับ 1.04 ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบออกมาในรูปของคุณภาพและปริมาณได้ (Figure 1a) และค่า Rs ที่เหมาะสมควรมีค่ามากกว่า 1.5 จึงจะเป็นที่ยอมรับ (Hsu and Chien, 1994) การดัดแปลงสภาวะในการทดสอบ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไอโซครติกอิลูชัน พบว่า สามารถแยกสารประกอบ OTC และ TC ได้อย่างชัดเจนและมีค่า Rs ของ TC เท่ากับ 5.99 แต่ค่า RT สำหรับ CTC เท่ากับ 17.3 นาที จึงใช้เวลานานในการตรวจสอบ (Figure 1b) อีกทั้งพีกมีลักษณะเตี้ยและฐานพีกกว้าง หรือ broad peak และอาจส่งผลให้การตรวจสอบมีความผิดพลาดค่อนข้างสูง ส่วนสภาวะแบบเกรเดียนต์อิลูชัน ให้ผลการแยกที่ชัดเจน และสารประกอบ OTC, TC และ CTC มีฐานพีกแคบและสูง

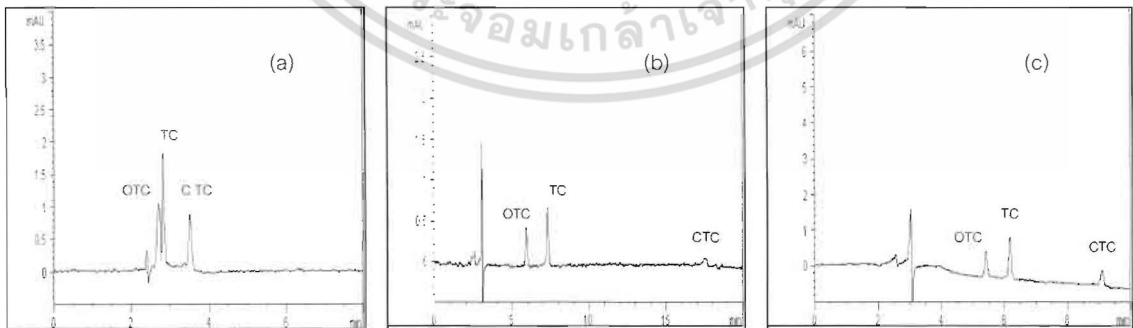


Figure 1 Chromatogram of 0.6 mg/kg standard mixture of oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) and chlortetracycline (CTC) (0.2 mg/kg of each standard) ; isocratic elution condition (a), modified isocratic elution condition (b) and gradient elution condition (c)

รวมทั้งหมดมีค่า Rs เท่ากับ 5.02 ซึ่งมีค่ามีค่ามากกว่า 1.5 และใช้เวลาทั้งสิ้น 10 นาที (Figure 1c) ดังนั้นสภาวะแบบเกรเดียนท์ที่อีลูชัน จึงเหมาะสมในการทดสอบสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ทั้ง 2

การเปรียบเทียบสภาวะการชะแบบไอโซครติกอีลูชันกับแบบไอโซครติกอีลูชันที่ดัดแปลงและแบบเกรเดียนท์อีลูชัน พบว่าในแต่ละสภาวะจะส่งผลให้ RT, Rs และ k' มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Table 1)

Table 1 Retention time, capacity factor and resolution of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline

Compounds	Parameters	Eluting conditions		
		Isocratic elution	Modified isocratic elution	Gradient elution
Oxytetracycline (OTC)	RT	2.697±0.013 ^c	5.842±0.243 ^a	5.505±0.990 ^b
	k'	0.058±0.005 ^c	1.291±0.095 ^a	1.159±0.036 ^b
	Rs	3.132±0.204 ^c	18.295±1.173 ^b	22.087±3.885 ^a
Tetracycline (TC)	RT	2.807±0.026 ^c	7.182±0.332 ^a	6.271±0.096 ^b
	k'	0.103±0.005 ^c	1.817±0.130 ^a	1.459±0.037 ^b
	Rs	1.044±0.077 ^c	5.986±0.219 ^a	5.027±0.061 ^b
Chlortetracycline (CTC)	RT	3.534±0.049 ^c	17.302±1.067 ^a	9.202±0.117 ^b
	k'	0.386±0.019 ^c	5.746±0.460 ^a	2.609±0.046 ^b
	Rs	6.328±0.187 ^c	25.012±4.096 ^a	18.675±0.653 ^b

^{a, b, c} Mean with different letters within a row are statistically significant difference ($\alpha = 0.05$)

RT = retention time, Rs = resolution and k' = capacity factor,

การปรับสภาวะแบบไอโซครติกอีลูชันที่ดัดแปลง จะทำให้ค่า RT ของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่า k' และ Rs เพิ่มขึ้น (Table 1) ดังนั้นจึงสามารถแยก OTC และ TC ออกจากกันได้ดีขึ้น แต่ CTC ยังคงใช้เวลาค่อนข้างนาน แต่เมื่อใช้แบบเกรเดียนท์อีลูชัน พบว่า RT ของสารมาตรฐานทั้ง 3 ลดลง ส่งผลให้ค่า k' และ Rs ลดลง ยกเว้นค่า Rs ของ OTC ที่เพิ่มขึ้น

การตรวจสอบประสิทธิภาพในการทดสอบตัวอย่าง

การทดสอบตัวอย่างกึ่งที่เติมสารละลายมาตรฐาน OTC, TC และ CTC ที่ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด 0.2 mg/kg โดยการใช้สภาวะแบบเกรเดียนท์อีลูชัน จะทำให้พีคของสารมาตรฐาน ทั้ง 3 ชนิด แยกจากสัญญาณของตัวอย่างกึ่งได้อย่างชัดเจน และใช้เวลาในการตรวจสอบน้อย ดังนั้น การทดสอบตัวอย่างกึ่งแบบเกรเดียนท์อีลูชัน (Figure 2) จึงให้ผลการตรวจสอบเชิงคุณภาพที่ดีกว่าแบบไอโซครติกอีลูชัน และแบบไอโซครติกอีลูชันที่ดัดแปลง

ตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง

โครมาโทแกรมการตรวจสอบสารมาตรฐานเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ทั้ง 2 ด้วยการละลายตัวอย่างกึ่งในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง และละลายสารละลายมาตรฐานด้วยเฟสเคลื่อนที่ แสดงดัง Figure 2a ส่งผลให้พีคที่ไม่มีลักษณะสูง (peak high) และสมมาตร เนื่องจากตัวอย่างที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วยกรดออกซาลิก(85) : MeOH (5) : ACN (12) และสัดส่วนของตัวทำละลายทั้ง 3 ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการพาสารเข้าระบบ HPLC เป็นสัดส่วนเดียวกัน ส่วนตัวอย่างกึ่งที่ละลายในเมธานอล แต่นำสารเข้าระบบ HPLC ด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยกรดออกซาลิก, MeOH และ ACN ได้โครมาโทแกรมแสดงดัง Figure 2b พบว่า พีคมีลักษณะเตี้ย

เนื่องจาก การใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างจากเฟสเคลื่อนที่ ส่งผลให้ พิกมีลักษณะเตี้ย และมีฐานพิกที่กว้างกว่า ทำให้ไม่สามารถมองเห็นพิกที่ชัดเจน ดังนั้นจึงควรใช้ตัวทำละลายที่เป็นชนิดเดียวกับเฟสเคลื่อนที่ สำหรับในการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง จากผลการทดลอง ตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วยกรดออกซาลิก(85) : MeOH (5) : ACN (12) หรือไนอิตราส่วนที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะให้พิกที่สูงและมีฐานแคบ จึงส่งผลที่ดีต่อการตรวจสอบในเชิงปริมาณและคุณภาพ (ศรีธัญญา และศิริพร, 2550)

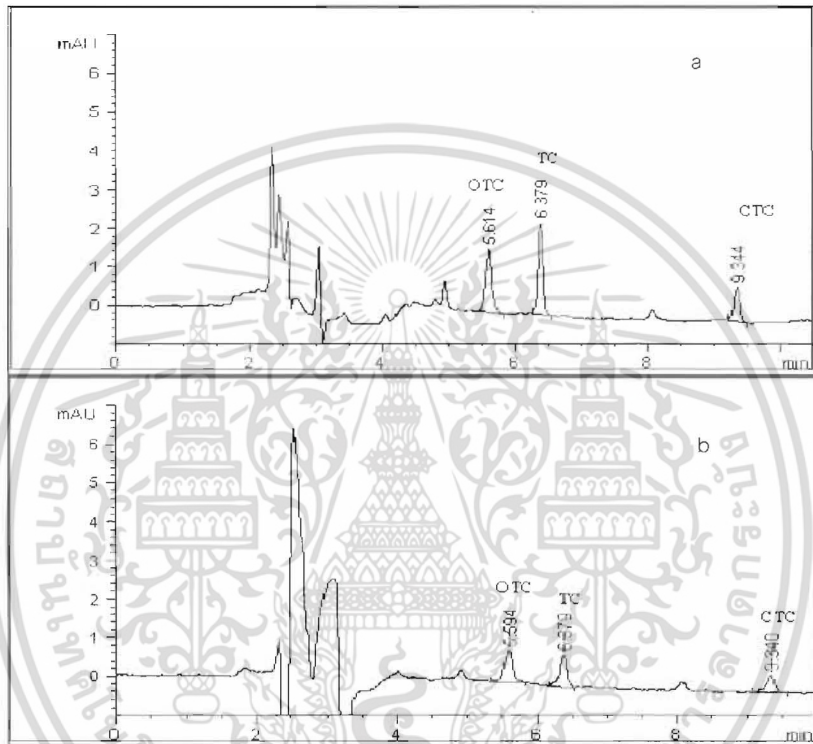


Figure 2 Chromatogram of tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) and chlortetracycline (CTC) in spiked sample which dissolved in (a) mixture of oxalic acid : methanol and acetonitrile (83:5:12), and (b) methanol

ผลการทดสอบค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสาร ของตัวอย่างที่ใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า การใช้ตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วยกรดออกซาลิก(85) : MeOH (5) : ACN (12) ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างกึ่ง มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของ OTC, TC และ CTC เท่ากับ 107, 90 และ 89 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารเป็นไปตามข้อแนะนำของ Codex Alimentarius Commission (2002) ที่ว่าด้วยความต้องการในการทดสอบหาปริมาณที่มีค่าร้อยละการกลับคืนของสารระหว่าง 70-110 ดังนั้น ผลการทดสอบดังกล่าว จึงมีความเหมาะสมในการทดสอบสารในเชิงคุณภาพและปริมาณ และตรงตามข้อแนะนำของ Codex ส่วนการใช้ตัวทำละลายเมธานอล ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างกึ่ง มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนอยู่ระหว่าง 110-248 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าข้อแนะนำ เนื่องจาก พิกที่มี

ลักษณะเตี้ยและมีฐานพีกกว้าง เมื่อทดสอบผลในเชิงปริมาณจะมีค่ามากกว่าความเป็นจริง อย่างไรก็ตาม การทดสอบที่ใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างกึ่ง หรือ ใช้เมธานอลเพียงอย่างเดียวจะให้ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนที่ต่ำกว่า หรือสูงกว่าข้อเสนอแนะ เนื่องจากความแตกต่างของ ชั่วโมงการนำสารเข้าระบบ HPLC ดังนั้นการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างกึ่งด้วยตัวทำละลายผสมที่ ประกอบด้วยกรดออกซาลิก(85) : MeOH (5) : ACN (12) ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะให้ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารออกซีเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ทั้ง 2 อยู่ในช่วงตามข้อเสนอแนะของ Codex

การตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบ

การตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบตามคุณลักษณะเฉพาะของวิธีการทดสอบ (method performance characteristics) ทั้ง 5 คุณลักษณะได้แก่ ช่วงของการทดสอบ (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ความแม่นยำของการทดสอบ (accuracy) และความเที่ยงของการทดสอบ (precision) สามารถสรุปดัง Table 2

Table 2 Performance characteristics for method validation in shrimp

Parameters	Oxytetracycline (OTC)	Tetracycline (TC)	Chlortetracycline (CTC)
Range (mg/kg)	0.04- 0.32	0.05- 0.32	0.14- 0.32
Linearity (r)	0.9982	0.9991	0.9977
Limit of detection (mg/kg)	0.012	0.015	0.05
Limit of quantification (mg/kg)	0.05	0.06	0.15
Accuracy (%)	82 (0.04)	81 (0.05)	81 (0.14)
	103 (0.2)	81 (0.20)	88 (0.20)
	107 (0.28)	88 (0.28)	91 (0.28)
Precision	0.34 (0.04)	0.27 (0.05)	0.46 (0.14)
	0.12 (0.2)	0.25 (0.20)	0.48 (0.20)
	0.22 (0.28)	0.36 (0.28)	0.51 (0.28)

The number in () means concentration of fortified sample (mg/kg)

ผลการตรวจสอบช่วงความเข้มข้นของการทดสอบ (range) ของ TC, OTC และ CTC มีความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 0.32, 0.04 - 0.32 และ 0.14 - 0.32 mg/kg ตามลำดับ โดยความเป็นเส้นตรงที่คำนวณจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีก มีค่า r^2 มากกว่า 0.995 ซึ่งการดัดแปลงวิธีการทดสอบนี้ให้ช่วงความเข้มข้นของสาร TC, OTC และ CTC เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานทั้ง 3 สูงมาก

ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD) ในการตรวจสอบ OTC, TC และ CTC ในตัวอย่างกึ่งมีค่าเท่ากับ 0.012, 0.015 และ 0.05 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบพบว่าเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับวิธีการเดิมที่ใช้ในการตรวจสอบสารทั้ง 3 ในเนื้อสัตว์ ที่มีค่า LOD ของ OTC, TC และ CTC เท่ากับ 0.107, 0.121 และ 0.129 mg/kg (Cinquina *et al.*, 2003) ทั้งนี้ อาจขึ้นอยู่กับความไว (sensitivity) ในการตรวจวัดของเครื่อง HPLC นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดเชิง

ปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ของสาร OTC, TC และ CTC ในตัวอย่างกุ้ง มีค่า LOQ เท่ากับ 0.05, 0.06 และ 0.15 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นค่าที่ต่ำกว่าของ Cinquina *et al.* (2003) ที่ตรวจสอบไว้ในเนื้อสัตว์ที่มีค่า LOQ ของสารทั้ง 3 อยู่ระหว่าง 0.11- 0.13 mg/kg ด้วยเช่นกัน แสดงว่าวิธีการที่ดัดแปลงขึ้นนี้ มีความไวในการทดสอบเชิงปริมาณได้ดีกว่า

เมื่อนำวิธีดังกล่าวมาทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของ OTC, TC และ CTC ที่ระดับต่าง ๆ พบว่าความแม่นยำ มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนอยู่ในข้อแนะนำของ Codex โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 81-107 และเมื่อพิจารณาความเที่ยงของการทำซ้ำ ด้วยการหาค่า HORRAT พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.12-0.51 ซึ่งต่ำกว่า 2 ที่เป็นข้อแนะนำของ Codex เช่นกัน แสดงว่าวิธีการที่ดัดแปลงขึ้นนี้เป็นวิธีที่ให้ความถูกต้อง และแม่นยำของวิธีการ

ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสถานะการทดสอบปริมาณเตตราไซคลิน และอนุพันธ์ในกุ้ง พบว่า เป็นวิธีการทดสอบที่มีความถูกต้องโดยผ่านเกณฑ์การประเมินตามข้อแนะนำของ Codex จึงสามารถนำวิธีทดสอบไปใช้ในการจัดทำระบบ ISO/IEC 17025 ได้

สรุปผลการทดลอง

อัตราส่วนของกรดออกซาลิก เมธานอล และอะซีโตไนโตรลมีผลต่อการแยกสารประกอบ OTC, TC และ CTC แตกต่างกันในการทดสอบด้วยเทคนิค HPLC และสภาวะการชะแบบเกรเดียนท์ที่อุณหภูมิเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบดังกล่าว โดยมี Rs มากกว่า 1.5 และใช้ระยะเวลาสั้นกว่าแบบไอโซครีติกอลูชันที่ดัดแปลงจึงช่วยลดปริมาณสารเคมี และเวลาในการปฏิบัติงานได้ ส่วนการทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารตัวอย่างได้แก่ ตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วยกรดออกซาลิก (85) : MeOH (5) : ACN (12) โดยมีค่าร้อยละการกลับคืนของสาร อยู่ระหว่าง 89 – 107 เมื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น พบว่าวิธีทดสอบนี้มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบ ($r > 0.9977$) ค่าความแม่นยำของวิธีมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน ในช่วง 81 – 107 และความเที่ยงของวิธีโดย HORRAT มีค่าต่ำกว่า 2 ในสารประกอบ OTC, TC และ CTC ดังนั้นวิธีการที่ดัดแปลงขึ้นนี้ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการจัดทำระบบ ISO/IEC 17025 สำหรับห้องปฏิบัติการได้

เอกสารอ้างอิง

- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ฐานเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ.
 ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ. 123 หน้า.
 แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2534. Principles and techniques of instrumental analysis. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ขวนพิมพ์. กรุงเทพฯ.
 ศรันญา สามเสาร์ และ ศิริพร ตั้งจิตราพิทักษ์. 2550. ผลของตัวทำละลายที่มีต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ. เข้าถึงได้จาก : <http://www.sithiphorn.com/newweb/> (29 มีนาคม 2550)
 Cinquina A.L., F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti and R. Cozzani. 2003. Validation of a high – performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. J. Chromatography A. 987: 227-233.
 Codex Alimentarius Commission, 2002. Codex committee on residues of veterinary drugs in foods. pp. 1-12.
 EURACHEM GUIDE, 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide Method Validation and Related Topics.
 Fish Inspection and Quality Control Division Department of Fisheries. April 2006. Chemical Reference Criteria for Fishery Product. Revision III. Thailand .
 Hsu, H. C. and C. S, Chen. 1994. Validation of analytical methods: a simple method for HPLC assay method. J. Food Drug Anal. 2(3): 161-176.