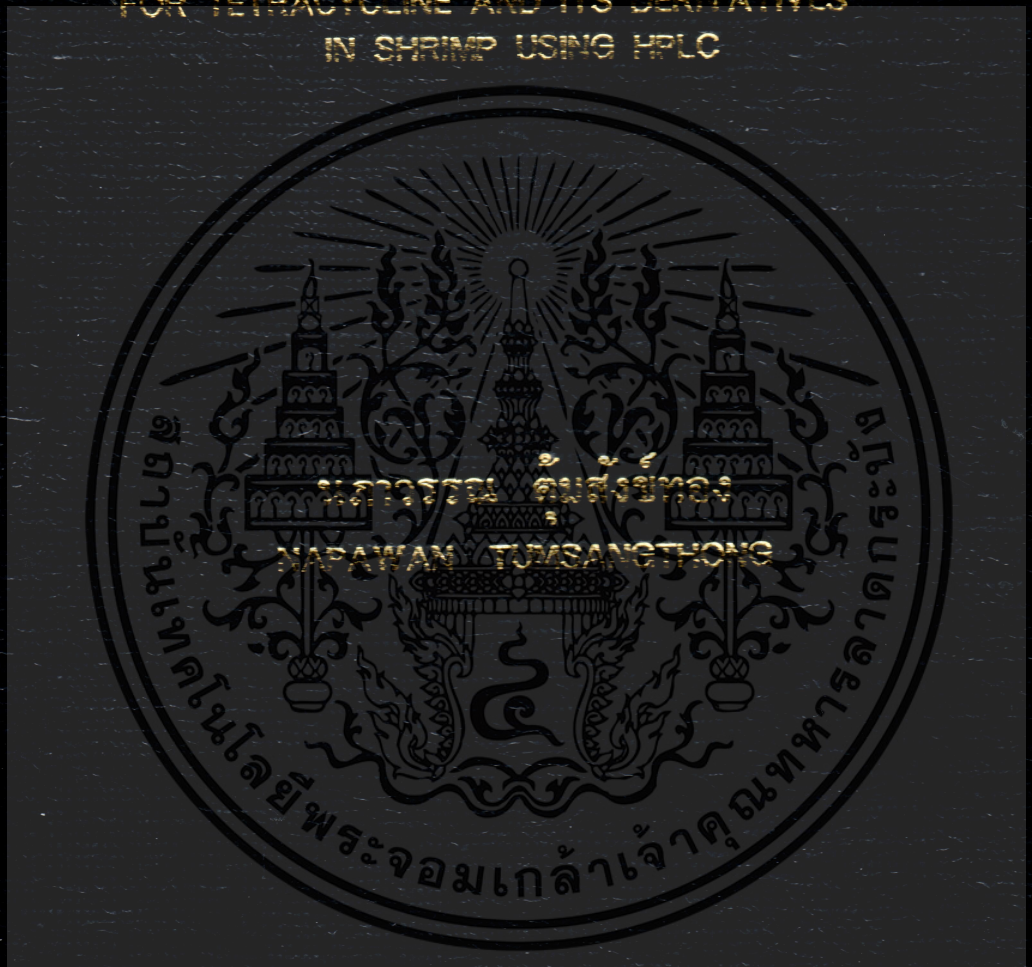
การตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสภาวะการทดสอบปริมาณเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในกุ้งด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

VALIDATION OF MODIFIED QUANTIFICATION METHOD FOR TETRACYCLINE AND ITS DERIVATIVES IN SHRIMP USING HPLC



นภาวรรณ ต้มสังข์ทอง

NAPAWAN TUMSANGTHONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาคุหาสิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AI-M-054-039

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสภาวะสารทดสอบปริมาณเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในกุ้งด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง

VALIDATION OF MODIFIED QUANTIFICATION METHOD FOR TETRACYCLINE AND ITS DERIVATIVES IN SHRIMP USING HPLC

T105048

นภาวรรณ ตุ้มสังข์ทอง

NAPAWAN TUMSANGTHONG

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....105048
วัน.เดือน.ปี.....1 2 พ.ย. 2552

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AI-M-054-039

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

VALIDATION OF MODIFIED QUANTIFICATION METHOD FOR TETRACYCLINE AND ITS DERIVATIVES IN SHRIMP USING HPLC

NAPAWAN TUMSANGTHONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION
FACULTY OF AGRICULTURAL INDUSTRY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2009

KMITL-2009-AI-M-054-039

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2009

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสภาวะการทดสอบปริมาณเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้งด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูง

Validation of Modified Quantification Method for Tetracycline and its Derivatives in Shrimp using HPLC

ชื่อนักศึกษา นางสาวนภาวรรณ ตุ้มสังข์ทอง

รหัสประจำตัว 48068770

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วริพัสย์ อารีกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม นายตติย สีหร่าย

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.วริพัสย์ อารีกุล	
รศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
นายตติย สีหร่าย	
ดร.อัธยา กังสุวรรณ	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 1 พฤษภาคม 2552 เวลา 10.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้องสัมมนา D 213 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 25 **เดือน** ...... **พ.ศ.** 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสภาวะการทดสอบปริมาณเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้งด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูง
นักศึกษา	นางสาวนภาวรรณ ตุ้มสังข์ทอง
รหัสประจำตัว	48068770
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.วริพัสย์ อารีกุล และ นายตติย สีหร่าย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลการตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสภาวะการทดสอบปริมาณสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน โดยเครื่องลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูง ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 Series คอลัมน์ ZORBAX Eclipse XDB-C8, 250 x 4.6 mm, 5 μm ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบ photodiode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และปริมาตรการฉีดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร การทดสอบความสามารถของวิธีการทดสอบในสภาวะการชะแบบไอโซเครติกอีลูชัน การดัดแปลงไอโซเครติกอีลูชัน และเกรเดียนท์อีลูชัน พบว่าการใช้สภาวะเกรเดียนท์อีลูชัน โดยมีเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยกรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์ : เมธานอล : อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 83:5:12 โดยปริมาตร มีค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (retention time, RT) ค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (resolution, Rs) และค่าความสามารถในการยึดสารที่ทดสอบไว้ในคอลัมน์ (capacity factor, k') มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ผลการทดสอบตัวอย่างกุ้งที่เติมสารมาตรฐาน (fortified sample blank) แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสาร (% recovery) ในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งละลายด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ให้ผลดีที่สุดในการทดสอบอยู่ระหว่างร้อยละ 89 – 107 สมการเส้นตรงของสารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.997 ในช่วงความเข้มข้น 0.04-0.32, 0.05-0.32 และ 0.14-0.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยการกลับคืนของสารอยู่ในช่วงร้อยละ 81-107 แสดงถึงความถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของการทดสอบ และความเที่ยงของวิธีทดสอบแสดงโดยค่า HORRAT มีค่าน้อยกว่า 0.51 มีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.012, 0.015 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงปริมาณ และคุณภาพ (limit of quantification, LOQ) เท่ากับ 0.05, 0.06 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังนั้นผลงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในกุ้งด้วยเครื่อง HPLC ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Validation of Modified Quantification Method for Tetracycline and Its Derivatives in Shrimp using HPLC
Student	Miss Napawan Tumsangthong
Student ID.	48068770
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2009
Thesis advisor	Dr. Varipat Areekul and Mr. Tatiya Sriharai

ABSTRACT

The aim of this study was to validate the modified method for the quantity of tetracycline and its derivatives in shrimp samples using HPLC technique. Analyses were performed on a HP Series 1100. The separation was achieved on a ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} column, 250 x 4.6 mm, 5 μm. The chromatographic conditions were as follows: flow-rate, 1 ml/min; volume injected, 20 μl; column temperature, 40 °C; monitor, 365 nm. According to theoretical review, the isocratic elution is the best condition for oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), and chlortetracycline (CTC) was obtained by using 0.01 M oxalic acid: methanol: acetonitrile at the ratio 83:5:12 v/v/v which showed good peak separation based on retention time performances, good resolution and capacity factor. However, gradient elution also showed the best performance with the statistical difference compared to isocratic elution ($p \leq 0.05$). The mean recoveries showed that using the mobile phase was best for dissolving the standard antibiotics and sample in extraction procedure which showed 89-107 percent recovery. The linearity of OTC, TC and CTC showed good correlations which correlation coefficient was more than 0.997 by using solutions at different concentrations levels ranging from 0.04-0.32, 0.05-0.32, 0.14-0.32 mg/kg, respectively. The high accuracy was represented in mean recoveries with 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. The results obtained from this study indicated that HPLC technique for the analysis of tetracycline and its derivatives from shrimp can be satisfactorily applied.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วริพัสย์ อารีกุล และคุณตติย สีหร่าย (ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะ ช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ รศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และ ดร.อัธยา กังสุวรรณ (ที่ปรึกษาอิสระ) กรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะจนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้

ขอขอบคุณโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ในการสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณปุญญฤทธิ์ สุดดี ผู้อำนวยการบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาสมุทรสาคร ที่ให้โอกาสและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้อง ที่มอบความรัก ความเอาใจใส่ เป็นกำลังใจที่ดีที่สุดตลอดมา และทำให้ข้าพเจ้ามีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จเพื่อความสุขของทุกคน

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดาและครอบครัวอันเป็นที่รักยิ่ง ตลอดจนครูบาอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

นภาวรรณ ตุ้มสังข์ทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ..... V

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ..... XI

รายการคำย่อและสัญลักษณ์..... XII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 กลุ่มยาปฏิชีวนะ และการตกค้างในสัตว์.....4

2.1.1 ออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline).....4

2.1.2 เตตราซัยคลิน (tetracycline).....5

2.1.3 คลอร์เตตราซัยคลิน(chlortetracycline).....5

2.2 การทดสอบปริมาณกลุ่มยาเตตร้าซัยคลิน.....6

2.2.1 วิธีการสกัดกลุ่มยาเตตร้าซัยคลิน.....6

2.2.2 การทดสอบปริมาณยาเตตร้าซัยคลิน.....8

2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method of validation).....21

2.3.1 ช่วงการทดสอบ (ranges) และความเป็นเส้นตรง (linearity).....22

2.3.2 ความแม่น (accuracy).....23

2.3.3 ความเที่ยง (precision).....24

2.3.4 ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ.....26
(limit of detection)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.5 ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงปริมาณ (limit of quantification) 27

2.3.6 ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity) 27

2.3.7 ความคงทนของวิธี (robustness/ruggedness) 27

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง 29

3.1 ตัวอย่าง 29

3.2 เครื่องมือ 29

3.3 สารเคมี 29

3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง 30

3.5 วิธีการดำเนินการ 30

3.6 การประเมินผลทางสถิติ 36

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 37

4.1 ผลสภาวะการชะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพของสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 37

4.1.1 ผลของอัตราส่วนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชัน 37

4.1.2 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพ 46

4.1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการทดสอบตัวอย่าง 48

4.2 ผลของตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบเตตราและอนุพันธ์ 50

4.3 ผลของการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบหาปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้งด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทรกราฟฟีสมรรถนะสูง 53

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม.....59

ภาคผนวก ก.....61
ภาคผนวก ข.....65
ภาคผนวก ค.....69
ภาคผนวก ง.....74
ภาคผนวก จ.....81

ประวัติผู้เขียน.....87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 การเปรียบเทียบค่า k′ 11

2.2 ค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีกโดยวิธีการต่าง ๆ 15

2.3 ปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ประมง 19

2.4 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐาน Codex 23

2.5 ตัวอย่างการคำนวณค่า predicted RSD ที่คำนวณจาก Horwitz's equation 26
ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.6 เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ตามมาตรฐาน Codex 26

3.1 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในสภาวะไอโซเครติกอีลูชัน 31

3.2 ตัวทำละลายกลับคืนในสารละลายมาตรฐานผสมและตัวอย่างกุ้ง 33

3.3 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน 35

4.1 โครมาโทแกรมของสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ภายใต้สภาวะ 38
การชะแบบไอโซเครติกอีลูชันในอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ

4.2 ค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT) และค่าความสามารถในการ 46
แยกพีกออกจากกัน (Rs) ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินและ
อนุพันธ์ในเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชัน

4.3 ค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT) ค่าความสามารถในการยึดสารที่ทดสอบไว้ 48
ในคอลัมน์ (k') และค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) ของสารประกอบ
เตตตราซัยคลิน และอนุพันธ์

4.4 ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) ของการใช้ตัวทำละลายในสารมาตรฐาน 50
เตตราซัยคลิน และอนุพันธ์

4.5 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานเตตราซัยคลินและ 52
อนุพันธ์ในตัวอย่างกุ้ง

4.6 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบ 54

4.7 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนของสาร และ ค่า HORRAT 55
ที่ระดับ LOQ (n=10)

ก.1 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติม 62
ด้วยสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน (n =3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ก.2 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติม.....63
ด้วยสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน (n =3)

ก.3 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติม.....64
ด้วยสารละลายมาตรฐานคลอร์เตตราซัยคลิน (n =3)

ข.1 ผลการคำนวณค่า LOD และ ประมาณค่า LOQ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน.....66

ข.2 ผลการคำนวณค่า LOD และ ประมาณค่า LOQ ของสารเตตราซัยคลิน.....67

ข.3 ผลการคำนวณค่า LOD และ ประมาณค่า LOQ ของสารคลอร์เตตราซัยคลิน.....68

ค.1 การคำนวณค่าความแม่น และความเที่ยงของสารออกซีเตตราซัยคลิน.....70
ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ค.2 การคำนวณค่าความความแม่น และความเที่ยงของสารเตตราซัยคลิน.....71
ที่ระดับความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ค.3 การคำนวณค่าความความแม่น และความเที่ยงของสารคลอร์เตตราซัยคลิน.....72
ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ง.1 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐาน Codex.....75

ง.2 การคำนวณค่าความความแม่นของการทดสอบ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน.....76
ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ง.3 การคำนวณค่าความความแม่นของการทดสอบ ของสารเตตราซัยคลิน.....77
ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ง.4 การคำนวณค่าความความแม่นของการทดสอบ ของสารคลอร์เตตราซัยคลิน.....78
ที่ระดับความเข้มข้น 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ง.5 การคำนวณค่าความความแม่นของการทดสอบ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน.....79
เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ง.6 การคำนวณค่าความความแม่นของการทดสอบ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน.....80
เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จ.1 การคำนวณค่าความเที่ยงของการทดสอบสารออกซีเตตราซัยคลิน.....82
ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างของออกซีเตตราซัยคลิน.....4

2.2 สูตรโครงสร้างของเตตราซัยคลิน.....5

2.3 สูตรโครงสร้างของคลอร์เตตราซัยคลิน.....5

2.4 โครมาโทแกรมของการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ.....10

2.5 โครมาโทแกรมของการแยกสารสองชนิด.....13

2.6 โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณจำนวนเพลทของคอลัมน์ (N).....15

2.7 โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่าการแยก (R_s).....16

2.8 โครมาโทแกรมแสดงผลของการปรับค่า k', α และ N ที่มีต่อค่า R_s 18

2.9 Horwitz trumpet (Horwitz's curve) 25

3.1 การเตรียมตัวอย่างของขั้นตอนการสกัดสารประกอบ.....34
ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน

4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน.....47
และคลอร์เตตราซัยคลิน ของเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์อีลูชันในอัตราส่วน (83:5:12)

4.2 โครมาโทแกรมของตัวอย่างกุ้ง (ซ้าย) และตัวอย่างกุ้งที่เติมสารละลาย.....49
มาตรฐานทั้ง 3 ชนิด (ขวา) โดยใช้สภาวะการชะแบบไอโซเครติกอีลูชัน (b),
ไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง(d) และเกรเดียนท์อีลูชัน(f)

4.5 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ด้วยการละลาย.....51
สารมาตรฐานและตัวอย่างกุ้งด้วยเฟสเคลื่อนที่ (a) และการละลายสารมาตรฐาน
ด้วยเฟสเคลื่อนที่และตัวอย่างกุ้งด้วยเมธานอล (b)

ก.1 กราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐาน.....62
ออกซีเตตราซัยคลิน

ก.2 กราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐาน.....63
เตตราซัยคลิน

ก.3 กราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐาน.....64
คลอร์เตตราซัยคลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

MRLs	หมายถึง	ปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้
GLP	หมายถึง	good laboratory practice
LLE	หมายถึง	การสกัดด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction)
SPE	หมายถึง	การสกัดด้วยของแข็ง (solid phase extraction)
EFPT	หมายถึง	european four plate test
HPLC	หมายถึง	high performance liquid chromatography
LC – MS/MS	หมายถึง	liquid chromatography – mass spectrometry and mass spectrometry
K	หมายถึง	สัมประสิทธิ์การพาร์ทิชัน (partition coefficient)
Cs	หมายถึง	ความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่
C_m	หมายถึง	ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่
t_s	หมายถึง	เวลาที่สารอยู่ในเฟสเอยู่กับที่
t_m	หมายถึง	เวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่
t_R	หมายถึง	เวลาในการหน่วงเหนี่ยว (retention time)
t'_R	หมายถึง	เวลาการหน่วงเหนี่ยวที่ปรับค่าแล้ว (corrected retention time)
t_0	หมายถึง	เวลาที่สารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่ (unretained compound)
k'	หมายถึง	แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor)
α	หมายถึง	ค่าความเลือกเฉพาะคอลัมน์ หรือค่าหน่วงเหนี่ยวสัมพัทธ์ (column selectivity หรือ relative retention)
R_s	หมายถึง	ค่าความสามารถในการแยก (resolution)
LOD	หมายถึง	ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection)
LOQ	หมายถึง	ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์(ต่อ)

%RSD	หมายถึง	ค่าเปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percentage relative standard deviation)
OTC	หมายถึง	oxytetracycline
TC	หมายถึง	tetracycline
CTC	หมายถึง	chlortetracycline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปัจจุบันอาหารทะเลเป็นที่นิยมบริโภคทั่วโลก ประเทศไทยเป็นผู้นำในการส่งออกสินค้าอาหารทะเล และผลิตภัณฑ์แปรรูปอันดับต้นๆ สินค้าที่ส่งออกได้แก่ กุ้งแช่แข็ง และผลิตภัณฑ์แปรรูปอื่นๆ ไปประเทศต่างๆ คือ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และสหภาพยุโรป เป็นต้น ในช่วงเดือนมกราคม-กรกฎาคม 2551 มีปริมาณและมูลค่าการส่งออกรวมเท่ากับ 115,533 ตันและ 25,958 ล้านบาท ขยายตัวร้อยละ 32 และ 25 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปีที่ผ่านมา สินค้ากุ้งแช่แข็ง ปริมาณส่งออก 62,010 ตัน มูลค่า 13,049 ล้านบาท เมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปี 2550 มีปริมาณส่งออก 47,941 ตัน มูลค่า 10,.563 ล้านบาท ขยายตัวร้อยละ 29.35 และ 23.53 ตามลำดับ สินค้ากุ้งแปรรูป ปริมาณส่งออก 53,523 ตัน มูลค่า 12,909 ล้านบาท เมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปี 2550 มีปริมาณส่งออก 39,679 ตัน มูลค่า 10,098 ล้านบาท ขยายตัวร้อยละ 34.89 และ 27.84 ตามลำดับ (สถาบันอาหาร, 2551) จากข้อมูลการส่งออกดังกล่าว ประเทศไทยมีปริมาณและมูลการส่งออกขยายตัวอย่างต่อเนื่อง

ประเทศผู้นำเข้าอาจกีดกัน หรือไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งของไทย อันเนื่องมาจากปัญหาสำคัญ 2 ประการ คือ การตกค้างของยาปฏิชีวนะ และการปนเปื้อนของ จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยการตกค้างของยาปฏิชีวนะมีสาเหตุจากการใช้ยาในการควบคุมป้องกัน และรักษาโรคจากเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง ในปริมาณที่มากอย่างต่อเนื่อง และไม่มีการหยุดยาก่อนการจับกุ้ง (ชลอ, 2543) ยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน เช่น ออกซีเตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน เป็นยาที่นิยมใช้กันมาก ซึ่งสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) ได้อนุญาตให้ใช้ได้เมื่อจำเป็นเท่านั้น (http://www.thaiqualityshrimp.com/what/past_detail.asp?nID=4) นอกจากนี้เมื่อปริมาณการส่งออกที่เพิ่มขึ้นทำให้ประเทศคู่ค้าเกิดความวิตกกังวลในเรื่องการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์ ซึ่งในแต่ละประเทศผู้นำเข้าจึงได้กำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ (maximum residue limits, MRLs) ดังนั้นเพื่อป้องกันการส่งคืนสินค้า โรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง ได้ตระหนักถึงผลกระทบที่เกิดจากสารตกค้างในวัตถุดิบ จึงต้องทำการตรวจสอบสารตกค้างกับผลิตภัณฑ์ก่อนส่งไปยังประเทศปลายทาง และต้องเพิ่มมาตรการในการประกันสินค้า หรือผลิตภัณฑ์ที่มีการส่งออกให้มีปริมาณการปนเปื้อนต่ำกว่าค่าที่แต่ละประเทศผู้นำเข้าได้กำหนดไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหนึ่งในการประกันความปลอดภัยของสินค้า ได้แก่ การแสดงคุณสมบัติของสินค้าด้วยข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำ ทั้งนี้ตามมาตรฐานสากลอาทิมาตรฐาน ISO/IEC17025 ซึ่งเป็นข้อกำหนดทั่วไปที่ว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการหรือระบบห้องปฏิบัติการที่ดี (good laboratory practice; GLP) ที่กำหนดว่าข้อมูลที่มีลักษณะดังกล่าวจะเกิดจากการใช้วิธีการทดสอบที่น่าเชื่อถือ และต้องอาศัยกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ก่อนนำมาใช้งาน (method validation) ดังนั้น ห้องปฏิบัติการที่สามารถแสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation of method) ว่ามีความเหมาะสมกับการใช้งาน มีความถูกต้องตามหลักวิชาการ และใช้หลักสถิติที่เหมาะสม จะทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการทดสอบก่อให้เกิดการยอมรับในข้อมูลดังกล่าวรวมถึงความสามารถของห้องปฏิบัติการจากผู้บริโภคภายในประเทศ และต่างประเทศ อีกทั้งยังสามารถช่วยลดปัญหาการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศที่อาจเกิดขึ้นได้ ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสภาวะการทดสอบปริมาณสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูงจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการทดสอบให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ ตามมาตรฐานสากล

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1.2.1 ศึกษาสภาวะการชะที่เหมาะสมในการทดสอบปริมาณสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง

1.2.2 ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในกุ้งด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง

1.2.3 ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบหาปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในกุ้ง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 งานวิจัยนี้เป็นการปรับปรุงสภาวะการทดสอบปริมาณสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูง เพื่อนำไปสู่การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยศึกษาสภาวะการชะที่เหมาะสมในการทดสอบสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ได้แก่ สภาวะไอโซเครติกอีลูชัน (isocratic elution condition) สภาวะไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง (modified isocratic elution condition) และสภาวะเกรเดียนท์อีลูชัน(gradient elution condition)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.2 ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในกุ้งด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง

1.3.3 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยใช้คุณลักษณะเฉพาะของวิธี ได้แก่ ช่วงของการใช้งาน (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางในการปรับปรุงสภาวะการทดสอบ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (method validation) ของยาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในเนื้อกุ้ง เพื่อสร้างความมั่นใจในวิธีการทดสอบ และผลการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ ตามมาตรฐาน ISO/ IEC17025 และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างมาตรฐานการทดสอบของยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน ของห้องปฏิบัติการทั่วประเทศ ทำให้สามารถยกระดับมาตรฐานห้องปฏิบัติการในการทดสอบหาปริมาณการตกค้างของยาปฏิชีวนะดังกล่าว และเกิดความเชื่อมั่นของผู้บริโภคภายในประเทศและประเทศคู่ค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

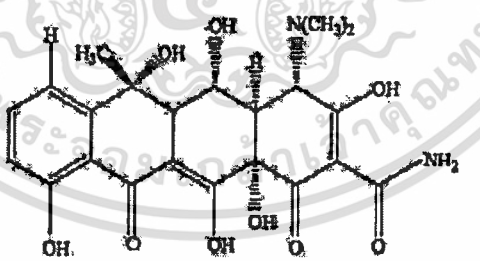
2.1 กลุ่มยาปฏิชีวนะ และการตกค้างในสัตว์

สารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อรา *Streptomyces rimosus* ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ได้ในขอบเขตกว้างทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ เช่น *Brucella, Francisella, Pseudomonas pseudomallei, Neisseria gonorrhoea* และ *Treponema pallidum* เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของริกเกตเซีย และโปรโตรซัวบางชนิด แต่ไม่มีผลต่อยีสต์ ราเมือก และเชื้อราอื่นๆ ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินแบ่งเป็น 7 ชนิด แต่ที่ได้รับความนิยมในทางการเกษตรอย่างกว้างขวาง มีเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ เตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลินและคลอร์เตตราซัยคลิน

(http://foodsafety.nfi.or.th/pdf/webfoodsafety/forconsumar/forconsumar/Manage/anti/เตตร้าซัยคลิน.pdf)

2.1.1 ออกซีเตตราซัยคลิน

ออกซีเตตราซัยคลินมีชื่อทางเคมีหลายชื่อได้แก่(4*S*,4a*R*,5*S*,5a*R*,6*S*,12a*S*)-4-(dimethyl amino)-3,5,6,10,11,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,12-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,12,12a-octahydro tetracene-2-carboxamide มีชื่อทางการค้า เตตร็อกซี่ แอลเอ (Tetroxy LA®) ลิความัยซิน (LIQUAMYCIN®) มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{24}N_2O_9$ น้ำหนักโมเลกุล 460.434 กรัมต่อโมล ค่า pKa 3.5 มีสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.1



Oxytetracycline (OTC)

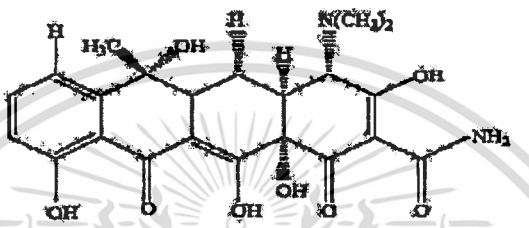
ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของออกซีเตตราซัยคลิน

ที่มา : The united States Phamacopeial Convention (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 เตตราซัยคลิน

เตตราซัยคลินมีชื่อทางเคมีหลายชื่อ ได้แก่ 2-(amino-hydroxy-methylidene)-4-dimethylamino-6,10,11,12a-tetrahydroxy-6-methyl-4,4a,5,5a-tetrahydrotetracene-1,3,12-trione หรือ 4-(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-1,11dioxo-naphthacene-2carboxamide หรือ (4*S*,6*S*,12a*S*)-4-(dimethylamino)-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydrotetracene-2-carboxamide มีชื่อทางการค้าอะโครมัยซิน (Achromycin®) หรือดูโมซัยคลิน (Dumocycline®) มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{24}N_2O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 444.435 กรัมต่อโมล ค่า pKa 3.3 มีสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.2

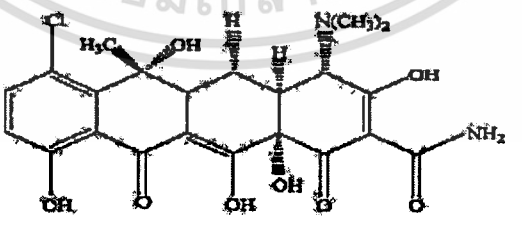


ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของเตตราซัยคลิน

ที่มา : The united States Phamacopeial Convention (2006)

2.1.3 คลอร์เตตราซัยคลิน

คลอร์เตตราซัยคลินมีชื่อทางเคมีหลายชื่อ ได้แก่ (4*S*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*,*Z*)-2-[amino(hydroxy)methylene]-7-chloro-4-(dimethylamino)-6,10,11,12a-tetrahydroxy-6-methyl-4a,5,5a,6-tetrahydrotetracene-1,3,12(2*H*,4*H*,12a*H*)-trione มีชื่อทางการค้า ยูโรมัยซิน (Aureomycin®) มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 478.88 กรัมต่อโมล ค่า pKa 3.3 มีสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของคลอร์เตตราซัยคลิน

ที่มา : The united States Phamacopeial Convention (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ เป็นยาที่เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำใช้เพื่อรักษาโรคที่ติดเชื้อจากแบคทีเรีย โดยการผสมลงในอาหารสำหรับสัตว์ หรือใช้ละลายน้ำเพื่อแช่ตัวอ่อน ส่วนใหญ่สินค้าอาหารที่พบการตกค้างของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ได้แก่ กุ้ง ปลา และ เนื้อสัตว์ปีก เช่น ไก่ เป็นต้น

การตกค้างของยาสัตว์ (drug residues) หมายถึงการสะสมของยาในส่วนหนึ่งส่วนใดของร่างกายสัตว์รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากสัตว์ทุกชนิดที่ใช้บริโภค ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากสัตว์เลี้ยงได้รับยามากเกินไปไม่ว่ายานั้นจะอยู่ในรูปเดิม หรืออยู่ในรูปที่เปลี่ยนแปลง (เมตาบอไลท์) ทั้งนี้รวมถึงสารอื่นๆ ใดก็ตามที่ปะปนอยู่กับยาสัตว์นั้นๆ ด้วย และยาหรือสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในอาหารมีปริมาณที่สูงจนถึงระดับหนึ่งก็อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีการบริโภคอาหารจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อนด้วยยาหรือสารเคมีตกค้างเป็นประจำ อันตรายของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์และสัตว์น้ำเมื่อรับประทานเข้าไปอาจทำให้ระบบทางเดินอาหารผิดปกติ มีอาการท้องร่วง เป็นพิษต่อกระดูกฟัน ตับไต และทำให้ภูมิต้านทานของร่างกายลดลง (http://foodsafety.nfi.or.th/pdf/webfoodsafety/forconsumar/Manage/anti /เตตร้าซัยคลิน.pdf)

เกศินี (2546) ทดลองให้กุ้งกุลาดำกินอาหารผสมยาออกซีเตตราซัยคลินในอัตรา 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ติดต่อกันนาน 5 วัน เมื่อนำเนื้อกุ้งกุลาดำไปทดสอบหาปริมาณยาออกซีเตตราซัยคลินโดยวิธี HPLC หลังจากให้อาหารผสมยานาน 1 วัน พบว่ามีปริมาณยาออกซีเตตราซัยคลินตกค้างเฉลี่ยสูงสุดถึง 0.246 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังหยุดให้อาหารผสมยา 5 วัน และ 10 วัน พบว่ามีปริมาณยาตกค้าง 0.017 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่หลังหยุดให้อาหารผสมยา 15 วันไม่พบปริมาณยาออกซีเตตราซัยคลินตกค้าง

2.2 การทดสอบปริมาณกลุ่มยาเตตราซัยคลิน

2.2.1 วิธีการสกัดกลุ่มยาเตตราซัยคลิน

เนื่องจากการตกค้างของยากลุ่มเตตราซัยคลินในเนื้อสัตว์เป็นปัญหาสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และ ก่อให้เกิดปัญหาทางการค้า ทำให้ต้องมีตรวจเฝ้าระวังการตกค้างของยากลุ่มเตตราซัยคลินในเนื้อสัตว์อย่างสม่ำเสมอ ในการทดสอบสารตัวอย่างโดยระบบ HPLC สารตัวอย่างที่สามารถนำมาฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC ได้นั้นต้องอยู่ในสภาวะเป็นสารละลายใส ไม่มีสิ่งเจือปน และให้ผลการทดสอบจากการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ ทั้งนี้ต้องเริ่มต้นจากการสกัดสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์ขึ้น จึงเป็นวิธีที่ดีและเหมาะสมกับการทดสอบด้วยโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูง ในปัจจุบันนี้มีวิธีมากมายในการเตรียมสารตัวอย่าง อาทิเช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดด้วยของเหลว (liquid - liquid extraction, LLE) เป็นวิธีการสกัดด้วยวัฏภาค 2 ชนิด โดยสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมีมีสารปนเปื้อนอยู่ด้วย และละลายอยู่ในวัฏภาคหนึ่ง การสกัดจะใช้วัฏภาคอีหนึ่งชนิดดึงเอาสารที่ต้องการทดสอบออกจากวัฏภาคแรก แต่สารปนเปื้อนไม่ถูกดึงออกมาด้วย ดังนั้นจึงมีเฉพาะสารที่ต้องการทดสอบเท่านั้นอยู่ในวัฏภาคชนิดที่ 2 มีข้อเสียตรงที่อาจเกิดอิมัลชั่น (emulsion) กรณีใช้กับตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ ต้องใช้เครื่องแก้วมากมายทำให้เป็นการเพิ่มสิ่งสกปรกต่างๆ ที่จะมารบกวนการทดสอบให้มากขึ้น ผลที่ได้ก็อาจไม่ถูกต้องอีก ทั้งตัวทำละลายที่ใช้มีราคาแพง และใช้ในปริมาณมาก (พัฒนา, 2547)

การสกัดด้วยของแข็ง (solid phase extraction, SPE) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการทำสารที่ต้องการทดสอบให้บริสุทธิ์ และเข้มข้นขึ้น โดยมีหลักการคือ สารที่ต้องการทดสอบจะถูกดูดซับโดยวัสดุดูดซับ (sorbent) ที่เหมาะสม สารปนเปื้อนไม่สามารถถูกดูดซับไว้ จะถูกชะออกมา หลังจากนั้นสารที่ต้องการทดสอบจะถูกชะออกมาจากตัวดูดซับด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ก่อนนำไปทดสอบปริมาณด้วยโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูง สามารถนำมาใช้แทน LLE ได้โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก ข้อดีของ SPE สามารถลดปริมาณตัวทำละลายที่จำเป็นต้องใช้ลง ประหยัดเวลา ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้น้อยลง หรือเหลือขั้นตอนเดียว สามารถใช้กับระบบการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้ และเลือกใช้ได้กับตัวทำละลายหลายชนิด (พัฒนา, 2547)

ดังนั้นจะเห็นว่า SPE เป็นเทคนิคที่ปัจจุบันนิยมใช้กันมากที่สุดในการเตรียมตัวอย่าง การใช้ SPE ไม่เพียงแต่ขจัดสิ่งปนเปื้อนในการทดสอบออกเท่านั้น แต่ยังเป็นการช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ด้วย

Kaale และคณะ (2008) พัฒนาและทดสอบสารออกซีเตตราซัยคลินในตัวอย่างนมสด ทดสอบด้วยเครื่อง HPLC-DAD ด้วยคอลัมน์ polymer reversed-phase (PLRP, 8 mm) และใช้สภาวะการชะแบบไอโซเครติกอีลูชัน เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย กรดอะซีติก น้ำ (pH 4.5) และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 4 : 68 : 28 ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบ photodiode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 354 นาโนเมตร พบว่าร้อยละการกลับคืนของสาร (% recovery) ในตัวอย่างน้ำนม ที่ระดับ 0.1, 0.2, 0.5 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสูงกว่าร้อยละ 92 มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 100 – 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งมีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection) ในน้ำนมเท่ากับ 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification) ในน้ำนมเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Cinquina และคณะ (2003) ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาสารในกลุ่มเตตราซัยคลินในนมวัว และในเนื้อวัว โดยนำสารสกัดผ่านคอลัมน์ SPE ชนิด HLB Oasis cartridge จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-DAD ด้วยคอลัมน์ Hypersil C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) และใช้สภาวะการชะแบบไอโซเครติกอีลูชัน เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย กรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 60 :15: 25 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อนาที และตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบ DAD ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่าร้อยละการกลับคืนของสารในตัวอย่างน้ำนม และเนื้อที่ระดับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าร้อยละ 81.1 และ 83.2 ตามลำดับ อีกทั้งมีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจพบได้เชิงคุณภาพ ในน้ำนมและในเนื้อวัวอยู่ในช่วง 113.2 – 127.2 และ 107.7 – 129.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับในขณะที่ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณ ในน้ำนมและในเนื้อวัวอยู่ในช่วง 117.2 – 131.3 และ 114.9 – 133.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

2.2.2 การทดสอบปริมาณยาเตตราซัยคลิน

การทดสอบหาสารตกค้างทำได้หลายระดับและหลายวิธี ซึ่งเดิมการตรวจที่นิยมใช้เพื่อการเฝ้าระวัง การตกค้างของสารไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณของสารที่ตกค้างได้อย่างชัดเจน เช่นวิธี European four plate test ซึ่งอาศัยหลักการของ microbial inhibition assay แต่เนื่องจาก วิธี EFPT มีข้อเสีย คือมีความจำเพาะต่ำทำให้เกิดผลลบเท็จได้ง่าย และใช้เวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง (เพ็ญศรี, 2537) จึงต้องการวิธีการทดสอบใหม่ที่มีความแม่นยำแบบระบุชนิดและปริมาณของสารตกค้าง ได้แก่ วิธีการทดสอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคอีไลซา (enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA) เทคนิคลิคควิดโครมาโทรกราฟฟีสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) และ เทคนิคลิคควิดโครมาโทกราฟฟี – แมสสเปกโทรเมทรี / แมสสเปกโทรเมทรี (Liquid chromatography – mass spectrometry and mass spectrometry, LC – MS/MS) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง

2.2.2.1 ELISA

เป็นเทคนิคที่ประกอบด้วยเอ็นไซม์ (enzyme) และอิมมูน(immune) มีหลายวิธีด้วยกัน ทางห้องปฏิบัติการศูนย์ภาคตะวันออกใช้แบบ " Direct antigen competitive ELISA " ในการตรวจหาแอนติเจน (antigen) ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) ยาตกค้าง เช่น ออกซีเตตราซัยคลิน, เบต้า-อะโกนิส, คลอแรมเฟนิคอล

หลักการของเทคนิค ELISA คือ การเคลือบพื้นผิวของแผ่นเพลท ด้วยแอนติบอดี้ (antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติเจน ที่ต้องการตรวจหาในสารตัวอย่าง ซึ่งจะถูกเติมลงไปพร้อมกับแอนติเจน ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) โดยทั้งคู่จะแย่งกันลงไปจับกับแอนติบอดี้ ที่เคลือบผิวเอาไว้ ซึ่งจะขึ้นกับจำนวนตัวยา เช่น ถ้าตัวอย่างมีตัวยามากกว่าก็จะจับกับแอนติบอดี้ ได้มากกว่า และเมื่อเติมซับสเตรท(substrate) ก็จะได้สีที่เข้มต่างกันตามจำนวนของแอนติเจน และ คอนจูเกต เทคนิค ELISA นี้มีความจำเพาะและความไวสูงสามารถหาปริมาณของสารที่ต้องการได้ต่ำถึงระดับ นาโนแกรม (ppb) หรือหนึ่งในพันล้านส่วน (http://dld.go.th/vrd_ep/method/sub_chemical/ELISA.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2 HPLC

เทคนิคลิคควิดโครมาโทรกราฟฟีสมรรถนะสูง เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบใน stationary phase ของคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัด สัญญาณจะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (analytes or solutes) ได้อย่างต่อเนื่องสามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) ส่วนใหญ่นิยมใช้ทดสอบสารประกอบที่ระเหยยาก (non volatile compounds) หรือน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight compounds)

เทคนิคการแยกสารผสมโดยใช้ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) ปั๊มของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสคงที่ ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารผสมจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกเป็นสารเดี่ยวที่ออกมาจากคอลัมน์ในเวลาที่ต่างกัน ซึ่งจะผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด ทำหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัว สัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) ประกอบด้วยพีก (peaks) ของสารต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม ด้วยหลักการดังกล่าว HPLC จึงเป็นเครื่องมือที่สามารถทดสอบสารผสมที่มีปริมาณน้อยๆ ในระดับ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้เป็นอย่างดี ทำให้เกิดการแยกอย่างสมบูรณ์ และใช้เวลาสั้น จำเป็นต้องหาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกสาร

ปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแยกทางโครมาโทกราฟฟี (แม้นและอมร, 2534) ได้แก่

1) parition ratio หรือ (partition coefficient, K) เป็นค่าคงที่ที่อธิบายถึงสมดุลของการกระจายตัวของสารตัวอย่างไประหว่างเฟสทั้งสอง คือเฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่ โดยค่า K หาได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่กับความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่ภายหลังกระจายตัวไประหว่างเฟสทั้งสอง หรืออัตราส่วนของเวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่ กับเวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ดังสมการต่อไปนี้

$$K = \frac{C_s}{C_m} \qquad \text{หรือ} \qquad K = \frac{t_s}{t_m} \qquad \text{----------} (1)$$

เมื่อ C_s = ความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่

C_m = ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่

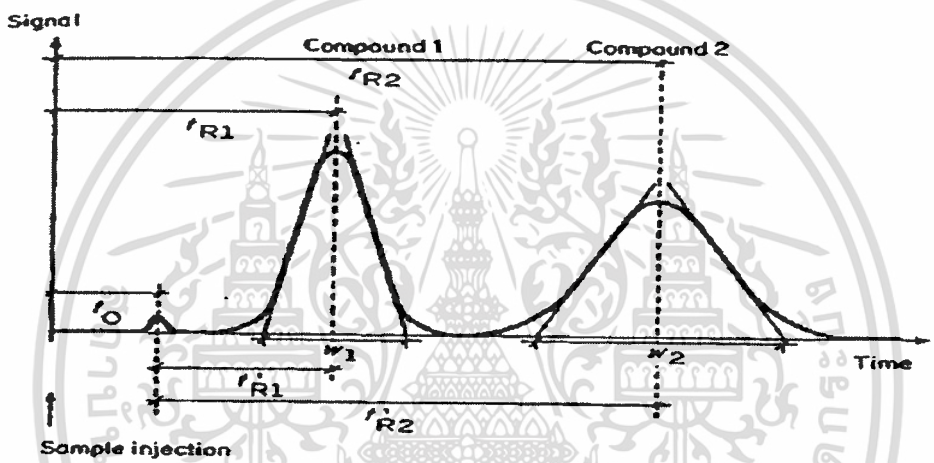
t_s = เวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่

t_m = เวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารแต่ละชนิดจะมีค่า K คงที่เฉพาะในแต่ละสภาวะของการทดสอบเท่านั้น ค่า K แปรผันตามอุณหภูมิของการทดลองและส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ แต่ไม่ขึ้นกับจำนวนสารที่นำมาตรวจวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แต่การวัดค่า K จากโครมาโทรแกรมโดยตรงนี้ทำได้ยาก จึงไม่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร และมักใช้พารามิเตอร์ตัวอื่นที่สามารถวัดค่าได้จากโครมาโทแกรมโดยตรง และใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารได้ เช่น เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ เป็นต้น

2) เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (retention time, t_R) เป็นระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ใช้ในการพาหรือชะล้างสารตัวอย่างให้เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือระยะเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนถึงเวลาที่อยู่ ณ ตำแหน่งจุดยอดของพีกบนโครมาโทแกรม ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 โครมาโทแกรมของการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ
ที่มา : แม้น และอมร (2534)

เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (t_R) เป็นพารามิเตอร์ที่วัดหรืออ่านค่าได้ จากโครมาโทแกรมโดยตรงสามารถใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร แต่การเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดลอง เช่น อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จะทำให้การพิสูจน์เอกลักษณ์อาจผิดพลาดได้ จึงนิยมพารามิเตอร์ตัวอื่น เช่น เวลาการคงไว้สัมพัทธ์ ซึ่งให้ผลถูกต้องกว่า

3) Corrected retention time (t'_R) คือ ระยะเวลาตั้งแต่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่ ถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารตัวอย่างบนโครมาโทแกรม หรือระยะเวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในเฟสอยู่กับที่ ดังแสดงในรูป 2.4

4) แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, k') เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารตัวอย่างหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยกโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก ค่า k' นี้หาได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

corrected retention time ของสารที่วิเคราะห์ (t'_R) หารด้วยเวลาสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ (t_o) ดังนี้

$$k' = (t_R - t_o)/t_o \quad \text{---------- (2)}$$

k' เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงลักษณะการทำงานของคอลัมน์ ปัจจัยที่มีผลต่อค่า k' คือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง โดยทั่วไปค่า k' ของสารควรอยู่ระหว่าง 2-5 ทั้งนี้เพราะเวลาที่ใช้และแยกสมดุลกันดี และค่า k' ที่เหมาะสมของการแยกสารที่ซับซ้อนควรมีค่าระหว่าง $1 \leq k' \leq 16$ ในการปฏิบัติควรหาค่า k' ของพีกของสารที่ต้องการทดสอบอย่างน้อย 1 พีก คือพีกแรกเพื่อให้แน่ใจว่าพีกของสารที่ต้องการทดสอบแยกออกจากพีกของตัวทำละลายหรือพีกของสารปนเปื้อน ซึ่งมักจะถูกชะออกมาใกล้หรือที่เดียวกับ t_o พีกของสารที่ทำการทดสอบไม่ควรมีค่า k' สูงเกิน 10-15 เพราะจะใช้เวลานานและจะทำให้พีกที่ได้กว้างและการแยกไม่ดี ทำให้การตรวจวัดลำบาก ค่า k' บอกให้ทราบถึงเวลาที่สารชะล้างออกมาจากคอลัมน์บอกลักษณะของพีกกว้างหรือแคบ การตรวจวัดยากหรือง่าย ความแรงของเฟสเคลื่อนที่แรงหรืออ่อน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จากข้อมูลนี้สามารถนำมาปรับค่า k' ให้เหมาะสมเพื่อให้การแยกสารได้ดีที่สุด

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบค่า k'

ข้อมูล	k' ต่ำ	k' สูง
เวลาที่สารถูกพาออกจากคอลัมน์	น้อย	มาก
ลักษณะของพีก	แหลมสูง	กว้างเตี้ย
การตรวจวัด	ง่าย	ยาก
ความแรงของเฟสเคลื่อนที่	แรง	อ่อน

ที่มา : แม้น และอมร (2534)

การปรับหรือควบคุมค่า k' ในกรณีที่ค่า k' ที่ได้การทดลองไม่เหมาะสม อาจสูงไปหรือต่ำไปทำให้การแยกไม่ดีมีวิธีการปรับหรือควบคุมค่า k' หรือเวลาของเวลาของการชะเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้นหรือดีที่สุดได้ดังนี้

- ปรับเปลี่ยนสัดส่วนผสมหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับเปลี่ยนสัดส่วนหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย ในทางปฏิบัติการเลือกเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมนั้นจะต้องพิจารณาจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติของสารตัวอย่างเป็นหลัก และความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมทำโดยการแยกสารที่ต้องการแยกสารที่ต้องวิเคราะห์ 1-2 ครั้ง แล้วพิจารณาค่า k' ที่ได้ หลังจากนั้นจึงปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้แรงขึ้นหรืออ่อนลงเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น วิธีที่ง่ายและสะดวกในการปรับความแรง คือปรับความเข้มข้นของตัวทำละลาย, ความเป็นกรด-ด่าง, ความมีขั้ว โดยไม่เปลี่ยนสมบัติทางเคมี หรือชนิดของตัวทำละลายที่เป็นส่วนประกอบของเฟสเลื่อนที่ โดยทั่วไปมักจะใช้ตัวทำละลายผสมที่ให้ค่า $1 \leq k' \leq 10$ เพื่อให้การแยกเกิดขึ้น และเวลาในการแยกไม่นานเกินไป ถ้าต้องการเปลี่ยนค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงน้อย ในทางตรงข้ามถ้าต้องการลดค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงมาก

- เพิ่มหรือลดปริมาณของเฟสอยู่กับที่ในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟฟีแบบแยกขนาดจำเพาะ (size exclusion chromatography) ทำให้โดยการเพิ่ม หรือลดปริมาณของรูพรุน และพื้นที่ผิวของสารบรรจุในคอลัมน์ ในกรณีที่เป็นโครมาโทรกราฟฟีแบบกระจาย (partition chromatography) ทำโดยการเพิ่มหรือลดปริมาณเฟสของเหลวบนสารช่วยพยุง และในกรณีของสารที่เป็นโครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบนสารบรรจุการปรับเปลี่ยนปัจจัยที่มีผลต่อค่า K อุณหภูมิและอัตราวามเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นปัจจัยที่มีผลุต่อความผันแปรของค่า K ดังนั้นจึงมีผลต่อค่า k' ด้วย

5) ค่าซีเล็คติวิตี้ (selectivity factor, α) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่แยกออกจากกันดีเพียงใด การแยกออกจากกันนี้ขึ้นกับค่า t'_R หรือค่า k' เท่านั้น โดยไม่คำนึงถึงความกว้างของพีก และค่าที่เกี่ยวข้องกับ relative partition coefficient หรืออัตราส่วนของแฟกเตอร์ความจุของสารสองชนิดที่มีพีกติดกัน สามารถคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \qquad \text{---------- (3)}$$

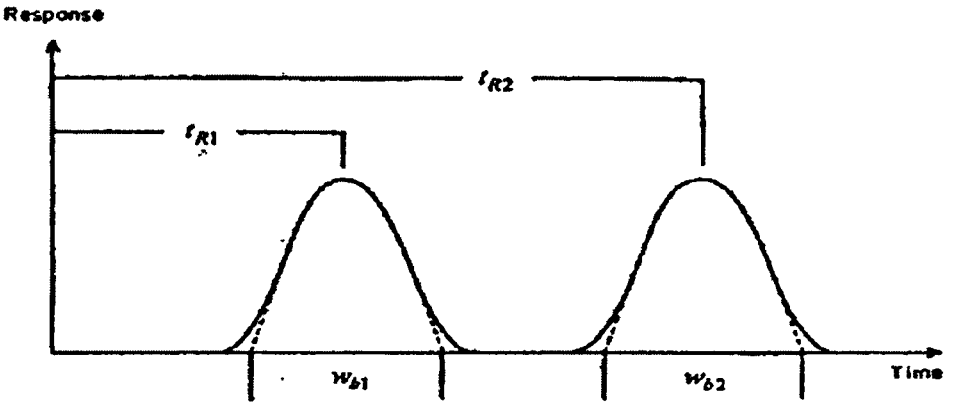
k'_1 = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกที่ 1

k'_2 = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกที่ 2

t'_{R1} = Corrected Retetion Time ของพีกที่ 1

t'_{R2} = Corrected Retetion Time ของพีกที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 โครมาโทแกรมของการแยกสารสองชนิด
ที่มา : แม้น และอมร (2534)

ค่าซิเล็คติวิตี้ เป็นค่าที่มีความสำคัญมาก คือเป็นตัวบอกให้ทราบว่าคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่นั้นทำงานอยู่ในสภาวะใด ค่านี้ขึ้นกับองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่พื้นที่ผิวของเฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิในการแยกสาร α จะมีค่ามากกว่า 1 จึงจะมีการแยกเกิดขึ้นถ้า $\alpha = 1$ แสดงว่าพีกทั้งสองทับกัน เนื่องจากพีกทั้งสองมีเวลาการคงไว้เท่ากับ ค่า α เหมาะสมคือ อยู่ในช่วง 1.5 - 4.0

การควบคุมหรือปรับเปลี่ยนค่าซิเล็คติวิตี้ เพื่อให้สารสองชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันได้ดีขึ้นเท่านั้น ทำโดยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

- ปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่โดยการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่คือเปลี่ยนสมบัติทางเคมีตัวทำละลาย
- เปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเฟสเคลื่อนที่ วิธีนี้นิยมใช้กับการแยกสารที่มีการแตกตัวเป็นอิออน เช่น กรดหรือด่าง การปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างของเฟสเคลื่อนที่มักจะทำให้ค่า α เปลี่ยนแปลง แต่ค่า k' เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ส่วนมากใช้วิธีการแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange) ไอออนแพร์ (ion-pair)
- เปลี่ยนเฟสอยู่กับที่ ทำโดยการเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์วิธีนี้ไม่สะดวก เสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าการปรับเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ จึงไม่คอยเป็นที่นิยม แต่ให้ผลดีมาก ถ้ามีการเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่เฟสเคลื่อนที่ก็ต้องมีการปรับเปลี่ยนให้มีความแรงพอที่จะทำให้ค่า k' ที่เหมาะสม
- เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ โดยทั่ว ๆ ไปการเพิ่มอุณหภูมิ จะทำให้ค่า k' ลดลง ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ จำเป็นต้องลดความแรงของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อเป็นการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชดเชยให้ค่า k′อยู่ในช่วงที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์มีผลผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า α เพียงเล็กน้อย

- ใช้ปฏิกริยาพิเศษทางเคมี ปฏิกิริยาที่นิยมใช้ คือ คอมแพล็กเซชัน (complexation) โดยการเติมซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) ลงในเฟสเคลื่อนที่ซึ่งซิลเวอร์ไอออนนี้จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ t_R และ α ทำให้การแยกดีขึ้น

6) ประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากความกว้างของพีกที่ถูกชะล้างออกมา ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี พีกแต่ละพีกที่ถูกชะล้างออกมาจะต้องมีฐานที่แคบและแยกออกจากกันได้ ค่าที่วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวนเพลทของคอลัมน์ (number of theoretical plates, N) และความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ (height eqivalant to a theoreticcal plate, H หรือ HETP)

จำนวนเพลทของคอลัมน์เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ว่าคอลัมน์นั้นมีการบรรจุดีเพียงใดพิจารณาจากความกว้างของพีกขณะเคลื่อนผ่านคอลัมน์ โดยเปรียบเทียบความกว้างของพีกกับเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ สามารถคำนวณได้จากโครมาโทแกรม ดังนี้

$$N = a\left(\frac{t'_R}{W}\right)^2 \qquad \text{---------- (4)}$$

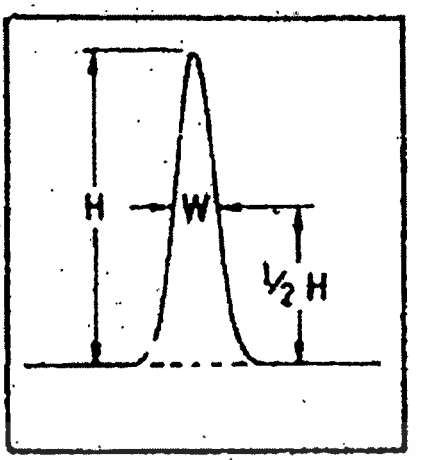
N = จำนวนเพลท

t_R = เวลาการคงไว้ของสาร

W = ความกว้างของพีกที่ตำแหน่งของความสูงที่กำหนด

a = ค่าคงที่ขึ้นกับวิธีการวัดความกว้างของพีก ตามตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.6 โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณจำนวนเพลทของคอลัมน์ (N)
ที่มา : แม้น และอมร (2534)

ตารางที่ 2.2 ค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีกโดยวิธีการต่าง ๆ

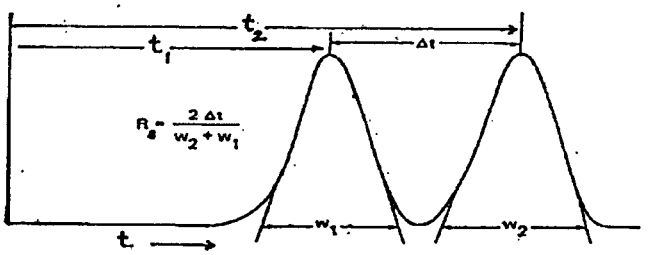
วิธี	a
ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง	5.54
ความกว้างของพีกที่ 4.4 % ของความสูง (5σ)	25
Tangent	16

ที่มา : แม้น และอมร (2534)

7) ค่าความสามารถในการแยก (resolution)

เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีกทั้งสอง คำนวณได้จากระยะห่างกันระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุดของพีกทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีกทั้งสอง ดังแสดงในภาพที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.7 โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่าการแยก (R_s)
ที่มา : แม้น และอมร (2534)

$$R_S = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \qquad \text{---------- (5)}$$

R_s = ค่าความสามารถในการแยก (Resolution)
t_1 และ t_2 = การคงไว้ของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ
W_1 และ W_2 = ความกว้างของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ถ้าพีกสมมาตร R_s มีค่าเท่ากับ 1.5 แสดงว่าการแยกของพีกทั้งสองลงถึงเบสไลน์จะมีการทับกันเพียงประมาณ 0.3 % ถือเป็นการแยกอย่างสมบูรณ์ ถ้า R_s มีค่าเท่ากับ 1.0 พีกทั้งสองจะทับกันบางส่วนคือ ประมาณ 2% และการแยกนี้สามารนำมาใช้งานด้านการทดสอบเชิงปริมาณได้ถ้า R_s มีค่าเท่ากับ 0.75 พีกทั้งสองจะทับกันมากจึงไม่สามารถใช้งานด้านการทดสอบเชิงปริมาณได้ ถ้า R_s มีค่าสูงเกินไปพีกทั้งสองจะห่างกันมาก ทำให้ห่างกันมากจะทำให้สิ้นเปลืองเวลาและตัวทำละลายโดยไม่จำเป็น ดังนั้นการแยกควรปรับสภาวะของการแยกเพื่อให้ R_s ที่เหมาะสม

จะเห็นว่าค่าความสามารถในการแยกเกี่ยวข้องกับเวลาการคงไว้และความกว้างของพีก คือ เวลาการคงไว้เกี่ยวข้องกับ แฟกเตอร์ความจุ (k') และค่าซิเล็คติวิตี้ (α) ส่วนความกว้างของพีกเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ (N) ค่า R_s จะเพิ่มเมื่อ Δt เพิ่ม และความกว้างของพีกต้องลดลง จากความสัมพันธ์ของค่าความสามารถในการแยกกับพารามิเตอร์ดังกล่าวสามารถเขียนเป็นสมการความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$R_S = (1/4)(\alpha - 1)\sqrt{N}\left[\frac{k'}{1+k'}\right] \qquad \text{---------- (6)}$$

(1) (2) (3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

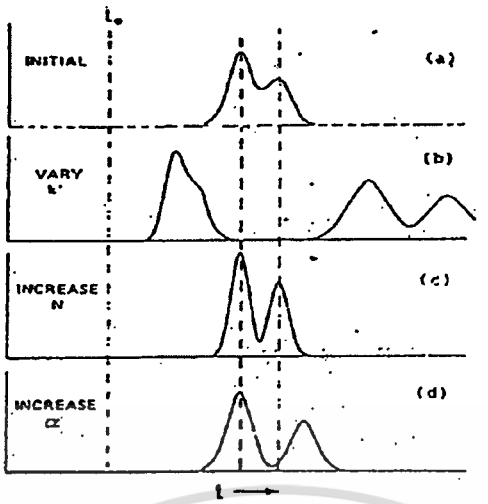
จากสมการสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุดและใช้เวลาน้อย ได้สามวิธี คือการปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ (k'), ค่าซิเล็คติวิตี้ (α)และจำนวนเพลท (N) ในเวลาทำงานจะต้องพิจารณาดูว่า ควรปรับพารามิเตอร์ตัวใดก่อนหลังเพื่อให้การแยกดีขึ้น สิ่งที่ง่ายและสะดวกคือ ควรปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ และค่าซิเล็คติวิตี้ก่อน ถ้าการแยกยังไม่ดีจึงปรับค่าจำนวนเพลท ซึ่งไม่สะดวกและเสียค่าใช้จ่ายสูง

จากสมการ 6 เทอมที่ (1) ประสิทธิภาพของคอลัมน์ เกี่ยวข้องกับอิทธิพลทางไคเนติก (kinetic effect) ซึ่งมีผลต่อความกว้างของพีก เทอมที่ (2) ค่าซิเล็คติวิตี้ และเทอมที่ (3) ค่าแฟกเตอร์ความจุ เกี่ยวกับเทอร์โมไดนามิกส์ของสารที่ทำการแยกขึ้นกับค่ากระจายตัวของสาร (distribution coefficient, K) และปริมาณของเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ พารามิเตอร์ในเทอมที่ (2) คือ ค่าซิเล็คติวิตี้ (α) เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของสารทั้งสองชนิดเท่านั้น ส่วนพารามิเตอร์ในเทอมที่ 3 คือค่าแฟกเตอร์ความจุเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทั้งของสารและคอลัมน์

การปรับค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) สามารถปรับค่าจำนวนเพลทของคอลัมน์ เพื่อให้ความสามารถในการแยกดีขึ้นนั้นเป็นทางเลือกสุดท้ายเพราะเสียค่าใช้จ่ายสูงและไม่สะดวก การเพิ่มค่าจำนวนเพลทของคอลัมน์ ทำโดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ ทำให้พีกแคบลง โดยทั่วๆ ไปมักจะลดลงความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ซึ่งค่าความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ นี้มีความสัมพันธ์กับค่าจำนวนเพลทของคอลัมน์ คือค่าความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ต่ำ ค่าจำนวนเพลทของคอลัมน์จะสูง การลดลงความสูงของเพลทแต่ละเพลททำโดยเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ลดขนาดของอนุภาคสารบรรจุในคอลัมน์ ลดความหนืดของเฟสเคลื่อนที่ (เพื่อเพิ่มอัตราการกระจายตัวของสารในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้พีกแคบลง) และเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ ตัวอย่างแสดงผลของการปรับค่า k', α และ N ที่มีต่อ Resolution ดังในภาพที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

105048



ภาพที่ 2.8 โครมาโทแกรมแสดงผลของการปรับค่า k', α และ N ที่มีต่อ R_s
ที่มา : แม้น และอมร (2534)

จากภาพที่ 2.8 สามารถอธิบายผลของการปรับค่า k', α และ N ที่มีต่อความสามารถในการแยกได้ดังนี้ เช่น การแยกสารสองชนิด ด้วยรีเวิร์สเฟสคอลัมน์ ใช้ส่วนผสมของน้ำและเมทานอล เป็นเฟสเคลื่อนที่ เริ่มด้วยใช้เมธานอลกับน้ำในอัตราส่วน 50 : 50 สารทั้งสองจะแยกดังในรูป 2.8(a) ค่า k' ที่ได้อยู่ในช่วง $0.5 < k' < 2$ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการปรับค่า k' ก่อนเพราะสะดวก ถ้าต้องการลดค่า k' จะต้องเพิ่มความแรงของเฟสเคลื่อนที่ คือ เพิ่มสัดส่วนของเมธานอลต่อน้ำเป็น 70 : 30 ผลการแยกไม่ดี พีกทับกันดังในรูป 2.8 (b) ด้านซ้าย เพราะฉะนั้นต้องเพิ่มค่า k' เพื่อให้การแยกดีขึ้นโดยการลดแรงของเฟสเคลื่อนที่เป็น 35 : 65 การแยกดีขึ้น แต่ความสูงของพีกลดลงมาก และใช้เวลานานดังในรูป 2.8 (b) ด้านขวา (c) ส่วนภาพที่ 2.8 เป็นการปรับค่า N โดยการเพิ่มจำนวนเพลท เช่นความยาวของคอลัมน์จาก 10 เซนติเมตร เป็น 15 เซนติเมตร ผลของการแยกพีกแคบลง ความสูงเพิ่มขึ้น เวลาไม่เปลี่ยนไปจากเริ่มแรก (โดยทั่วไปการเพิ่มค่า N หรือความยาวของคอลัมน์เวลาจะเปลี่ยนแปลง) รูป 2.8 (d) เป็นการปรับค่า α โดยการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่จาก เมธานอลเป็นอะซิโตไนไตรล์ เช่น ใช้ 40 % อะซิโตไนไตรล์ในน้ำ ผลการแยกดีขึ้นเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ และความสูงของพีกเปลี่ยนไม่มากนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.3 LC- MS/MS

เครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการแยกยากลุ่มเตตราซัยคลินด้วยเทคนิคลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) แล้วทำการตรวจวัดมวลต่อประจุของยากลุ่มเตตราซัยคลินด้วยตรวจวัดชนิดแมสสเปกโทรมิเตอร์/แมสสเปกโทรมิเตอร์ (MS/MS) โดยที่เครื่องแยกมวล (mass analyzer) ในแมสสเปกโทรมิเตอร์ชุดที่หนึ่ง จะคัดแยกมวลสารของ precursor ion และเครื่องแยกมวลในแมสสเปกโทรมิเตอร์ชุดที่สอง จะคัดแยกมวลสารของ daughter ion ที่ได้จากการแตกตัวของ precursor ion ซึ่งตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป (European Commission Decision 2002/657/EC) กำหนดว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS จะต้องตรวจวัด precursor ion จำนวน 1 ion และ daughter ion จำนวน 2 ions (Micomass UK Limited, 2002)

ปริมาณการตกค้างของสารกลุ่มเตตราซัยคลินในแต่ละประเทศผู้นำเข้าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเช่น กุ้ง ปลา เป็นต้น ได้ระบุปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ (maximum residue limits , MRLs) ไว้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ประมง

ประเทศ	รายชื่อสารตกค้าง	ผลิตภัณฑ์	ปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
สหรัฐอเมริกา	ออกซีเตตราซัยคลิน	ปลาแซลมอน ปลาดุก, กุ้งมังกร	2.0
ญี่ปุ่น	ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน	ปลาเพาะเลี้ยง กุ้งเพาะเลี้ยง หอยนางรม	0.2
จีน	ออกซีเตตราซัยคลิน	เนื้อจระเข้แช่แข็ง	0.2
สิงคโปร์	ออกซีเตตราซัยคลิน	ปลาเพาะเลี้ยง กุ้งเพาะเลี้ยง	0.1
เกาหลีใต้	ออกซีเตตราซัยคลิน	ปลาเพาะเลี้ยง กุ้งเพาะเลี้ยง	0.2
ประเทศอื่นๆ	ออกซีเตตราซัยคลิน	ปลาเพาะเลี้ยง กุ้งเพาะเลี้ยง	0.2

ที่มา : Fish Inspection and Quality Control Division (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปุษยา และสุธาทิพย์ (2543) ทำการทดสอบสารปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็งส่งออก ระหว่าง ปี พ.ศ. 2537 ถึง 2541 เป็นจำนวนทั้งสิ้น 5,205 ตัวอย่าง โดยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เชิงปริมาณ เท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และให้ผลการปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละ 1.15 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยมีปริมาณการปนเปื้อนในช่วง 0.10-3.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งตัวอย่างที่ตรวจพบปริมาณออกซีเตตราซัยคลินสูงกว่ามาตรฐานโคเด็กซ์ (Codex MRL) ที่กำหนดปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 0.77 ของตัวอย่างทั้งหมด ในตัวอย่างปี พ.ศ. 2537, 2538, 2539, 2540 และ 2541 จำนวน 1478, 1567, 1055, 628 และ 477 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.49, 0.77, 1.14, 1.75 และ 0.63 ตามลำดับ และค่าที่พบอยู่ในช่วง 0.16-0.49, 0.14-1.46, 0.13-3.31, 0.13-0.69 และ 0.10-2.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงปัญหาการตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในกุ้งส่งออก ดังนั้นจึงจำเป็นที่ทั้งภาครัฐ และภาคเอกชนต้องให้ความเข้าใจและต้องควบคุมการใช้ ออกซีเตตราซัยคลิน เพื่อป้องกันการคืนสินค้า และลดปัญหาที่เกิดขึ้นในการส่งออก

จากการเก็บข้อมูลทางสถิติของห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาสมุทรสาคร ของผลการทดสอบสารออกซีเตตราซัยคลินที่ตกค้างในกุ้ง และผลิตภัณฑ์กุ้ง ระหว่างเดือนมกราคม ถึง กันยายน พ.ศ. 2550 เป็นจำนวนทั้งสิ้น 1,026 ตัวอย่าง โดยเครื่อง HPLC - FLD ยี่ห้อ Agilent รุ่น HP 1100 Series คอลัมน์ SymmetryShield RP8 (150 x 3.9 mm, 5 µm) ในขณะทำการทดสอบมีการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 25 °C โดยใช้สภาวะการชะแบบไอโซเครติกอีลูชัน เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อิมิดาโซล 1.0 โมลาร์ และเมธานอล ในอัตราส่วน 85: 15 โดยปริมาตร อัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบฟลูออเรสเซนต์ ปริมาตรการฉีดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เชิงปริมาณ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเดือนมกราคม, กุมภาพันธ์, มีนาคม, เมษายน, พฤษภาคม, มิถุนายน, กรกฎาคม, สิงหาคม และเดือนกันยายน จำนวน 83, 64, 86, 91, 153, 114, 97, 234, 104 ตัวอย่าง โดยพบจำนวนการปนเปื้อน 10, 3, 0, 0, 6, 0, 0, 1, 3 ตัวอย่างตามลำดับ ปริมาณการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.070-0.080, 0.020-0.026, 0, 0, 0.020- 0.032, 0 , 0, 0.023 และ 0.023-0.878 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากผลการเก็บข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่ายังมีการใช้สารเคมีดังกล่าว และพบการตกค้างของของออกซีเตตราซัยคลินในกุ้ง และผลิตภัณฑ์กุ้งเกินมาตรฐาน

สุดา และฉันทนา (2540) ทดสอบการตกค้างของยาออกซีเตตราซัยคลินในกุ้งกุลาดำก่อนจับจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดภูเก็ต โดยวิธี Microbiological assay และ เทคนิค HPLC โดยตัวอย่างกุ้ง ในปี 2538 (ก.พ.-ธ.ค.) และปี 2539 (ม.ค.-ธ.ค.) นำมาทดสอบโดยวิธี Microbiological assay ใช้เชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด *Micrococcus luteus* ATTCC 9341 *Bacillus subtilis* ATTCC 6633 และ *Bacillus mycoides* ATTCC 11778 เป็นเชื้อทดสอบ พบยาออกซีเตตราซัยคลินตกค้างในกุ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กุลาดำร้อยละ 0.88 จากตัวอย่างทั้งหมด (n=340) ปี 2538 ร้อยละ 1.05 (n=382) ปี 2539 การทดสอบปริมาณการตกค้างของยาออกซีเตตราซัยคลิน โดยเทคนิค HPLC จาก 387 ตัวอย่าง จากเดือนกุมภาพันธ์ 2539 ถึงเดือนมกราคม 2540 ใช้ Novapak C18 Column (150 x 3.9 mm.) ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซีโตไนไตรล์ และกรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วน 17:83 โดยปริมาตร พบว่าร้อยละ 48.06 ของตัวอย่างทั้งหมดมียาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกุ้ง โดยร้อยละ 36.95, 5.94 และ 5.16 มียาออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 0.001-0.005 ไมโครกรัมต่อกรัม และมากกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ผลการสำรวจการใช้ยาปฏิชีวนะพบว่าเกษตรกรนิยมใช้ยาออกซีเตตราซัยคลิน ออกโซลินิกแอซิด และยาซัลฟา ในระหว่างการเลี้ยงกุ้งร้อยละ 58.70 ในปี 2538 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 65.45 ในปี 2539 ของตัวอย่างที่ใช้ยาปฏิชีวนะในระหว่างการเลี้ยง แต่มีเพียงร้อยละ 3.83 และ 1.83 ของตัวอย่าง ที่ใช้ยาในช่วงการเลี้ยง 90 วันขึ้นไป.

2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method of validation) (ทิพวรรณ,2549)

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่จะให้ผลถูกต้อง และเป็นที่น่าเชื่อถือนั้น วิธีทดสอบเป็นองค์ประกอบที่สำคัญยิ่ง ดังนั้นเมื่อเลือกนำวิธีทดสอบใดมาใช้ ไม่ว่าจะเป็นวิธีมาตรฐานหรือ วิธีที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ก็จะต้องทดสอบว่าสามารถใช้ทดสอบตัวอย่างได้ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องปฏิบัติ ก่อนนำวิธีการทดสอบนั้นมาใช้งานไม่ว่าวิธีการทดสอบนั้นจะถูกดำเนินการมาอย่างไร เช่น การนำวิธีมาตรฐานมาใช้กับการทดสอบตัวอย่างอาหาร หรือ matrix ที่นอกเหนือจากที่กำหนดไว้ในขอบข่ายของวิธีนั้น หรือ มีการปรับเปลี่ยนเงื่อนไขที่กำหนดไว้ในวิธีมาตรฐานหรือวิธีที่มีอยู่เดิมหรือวิธีที่จะนำมาใช้ไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับคุณลักษณะเฉพาะของวิธีหรือมีไม่สมบูรณ์ตามความจำเป็นของการใช้งานหรือ เป็นวิธีใหม่ที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้น ส่วนในกรณีที่นำวิธีมาตรฐาน หรือวิธีที่พัฒนาอย่างดีแล้วมาใช้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ก็จำเป็นต้องทวนสอบ (verify) โดยห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันสมรรถนะของห้องปฏิบัติการว่าสามารถทำได้ตามที่ระบุในวิธี การตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบ เป็นกระบวนการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษา หรือยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีการทดสอบ (method performance characteristics) และประเมินด้วยวิธีการทางสถิติว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความถูกต้อง และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ซึ่งคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเหล่านี้ ได้แก่ ช่วงของการทดสอบ (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นของการทดสอบ (accuracy) ความเที่ยงของการทดสอบ (precision) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ความจำเพาะเจาะจง (specificity / selectivity) และความทนของวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ruggedness / robustness) เป็นต้น การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะเหล่านี้อาจไม่จำเป็นต้องดำเนินการทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีทดสอบ และวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

คุณลักษณะเฉพาะของวิธีการทดสอบ : การหาค่า และการประเมิน การยอมรับ

(method performance characteristics : determination and assessment of acceptance)

(ทิพวรรณ, 2549)

คุณลักษณะเฉพาะของวิธีการทดสอบได้แก่

2.3.1 ช่วงของการทดสอบ (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity)

ช่วงการทดสอบ คือช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ระหว่างค่าต่ำสุด และค่าสูงสุดที่เป็นเส้นตรง และให้ผลการทดสอบที่มีความเที่ยง ความแม่นตามเกณฑ์ที่ยอมรับ ภายใต้สภาวะการทดลองที่ระบุไว้ (NATA Tech Note 17 :1997)

ส่วนความเป็นเส้นตรงเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงโดยตรงระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือตรวจวัด และความเข้มข้นของสารในช่วงของการทดสอบ (AOAC – PVMC : 1993)

- ขั้นตอนการทดสอบช่วงของการทดสอบ (range)

1) กำหนดช่วงของความเข้มข้นของสารที่จะทดสอบ

2) ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ (fortified sample blank หรือ fortified sample) ที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อย 7 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ แล้วทดสอบตามขั้นตอน

3) เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ (แกน X) กับสัญญาณ (แกน Y)

4) พิจารณาช่วงความเข้มข้นที่เป็นความเป็นเส้นตรง

- ขั้นตอนการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

1) ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้นภายในช่วงของการทดสอบอย่างน้อย 7 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ แล้วทดสอบตามขั้นตอน

2) เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ (แกน X) กับสัญญาณ (แกน Y)

3.) หาค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) ; $r \geq 0.995$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ความแม่นของการทดสอบ (accuracy)

ความแม่นเป็นคุณลักษณะของวิธีที่แสดงความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์ต่อค่าจริง หรือค่าอ้างอิงที่ยอมรับ (ISO 3534-1:1993) การทดสอบความแม่นทำได้โดยการประเมินด้วยการคำนวณร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของวิธีที่มีต่อสารตัวอย่าง

ขั้นตอนการทดสอบความแม่นของการทดสอบ

1) เตรียมตัวอย่างที่ไม่มีสารที่สนใจ (sample blank) และตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ ที่ระดับความเข้มข้น ภายในช่วงการทดสอบ มากกว่า หรือเท่ากับ 3 ความเข้มข้นๆ ละ 10 ซ้ำ

2) ทดสอบตามวิธีทดสอบ หาค่าเฉลี่ยของปริมาณสารในตัวอย่างที่เติมสาร (C1) และปริมาณสารในตัวอย่างที่ไม่มีสารที่สนใจทดสอบ (C2)

3) ประเมินด้วย ความแม่น จากค่าร้อยละการกลับคืน

$$\text{ค่าร้อยละการกลับคืน} = \frac{(C1-C2) \times 100}{C3}$$

โดยที่ C3 คือ ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนของสารตามมาตรฐานโคเด็กซ์ ได้กำหนดงานด้านสารตกค้างจากยาสัตว์ตกค้างในอาหาร และยาฆ่าแมลง ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐานโคเด็กซ์

ความเข้มข้น	ร้อยละการกลับคืน
< 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม	50-120
> 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ≤ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	60-120
> 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม≤ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70-120
> 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม< 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70-110
> 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70-110

ที่มา : Codex Alimentarius Commission (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 ความเที่ยงของการทดสอบ (precision)

ความเที่ยงเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด (ISO 3534-1 : 1993) ความเที่ยงจะบอกถึงความคลาดเคลื่อนสุ่ม (ramdom error) ที่เกิดขึ้น โดยทั่วไป การแสดงความเที่ยงของการทดสอบแสดงได้หลายแบบ เช่น การทวนซ้ำได้ (repeatability) หรือการทำซ้ำ (reproducibility) ซึ่งทั้ง 2 แบบนี้จัดเป็น ความเที่ยงที่มีค่าแคบที่สุด และกว้างที่สุด

การทวนซ้ำได้ (repeatability) เป็นตัวแปรที่บอกถึงความแปรปรวนที่เกิดขึ้นเมื่อนักวิเคราะห์คนเดิมทำการทดลอง ตัวอย่างหนึ่งซ้ำๆ กัน หลายครั้งในเวลาเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน โดยใช้เครื่องมือชุดเดิม และวิธีเดียวกัน แสดงค่าในรูปของ RSD_r ส่วนการทำซ้ำได้เป็นตัวบอกความแปรปรวนที่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดเดียวกัน ด้วยวิธีเดียวกันภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน เช่น สถานที่ปฏิบัติงานแตกต่างกัน นักวิเคราะห์แตกต่างกัน เรื่องมือแตกต่างกันช่วงระยะเวลาแตกต่างกัน หรือแม้แต่สิ่งแวดล้อม และการทดสอบแตกต่างกัน แสดงค่าในรูป RSD_R

โดยทั่วไปการระบุ ความเที่ยง จะระบุในรูปของ %RSD แต่เนื่องจากความเที่ยงขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสาร ดังนั้นจึงควรหาค่า %RSD ที่ความเข้มข้นหลายระดับ โดยระบุระดับความเข้มข้นด้วย ในการทดสอบวิธีทดสอบ อาจแสดงความเที่ยงเป็นค่า %RSD ที่ใหญ่ที่สุดเพียงค่าเดียวได้ ถ้าความแปรแปรวนที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ไม่แตกต่างจากความแปรปรวนที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ ในช่วงการทดสอบ

ขั้นตอนการทดสอบความเที่ยงของการทดสอบ

1) เตรียมตัวอย่างที่ไม่มีสารที่สนใจทดสอบ และตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ ที่ระดับความเข้มข้น ภายในช่วงการทดสอบ มากกว่า หรือเท่ากับ 3 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 10 ซ้ำ แล้วทำการทดสอบตามขั้นตอน

2) นำผลการทดสอบของคำนวณของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่สนใจทดสอบ และตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3) คำนวณค่า %RSD ที่ความเข้มข้นนั้นๆ

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$$

หมายเหตุ

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ

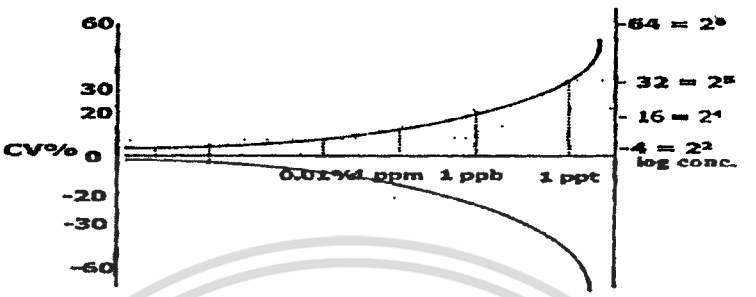
SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ

%RSD = Experimental RSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) คำนวณคำนวณ Predicted RSD $_r$

Predicted RSD $_r$ เป็นค่าที่คำนวณจาก Horwitz's equation โดย Dr. William Horwitz ซึ่งได้ทำการเก็บข้อมูลจากห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง ซึ่งให้ลักษณะการกระจายของข้อมูลเป็นรูป trumpet



ภาพที่ 2.9 Horwitz trumpet (Horwitz's curve)

ที่มา : ทิพวรรณ (2549)

จากภาพเมื่อปริมาณความเข้มข้นน้อยลงเกณฑ์การยอมรับความเที่ยง (%CV) จะมีค่ามากขึ้น โดย

Horwitz's equation

สำหรับ repeatability : $RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

หมายเหตุ RSD_r = ค่า RSD จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (repeatability); จัดเป็น Predicted RSD

C = Concentration ratio (ไม่มีหน่วย)

5.) การประเมินการยอมรับความเที่ยงโดยใช้ HORRAT ดังสมการ

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSD}}{\text{Predicted RSD}_r}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการคำนวณค่า Predicted RSD ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ analyte	C	Predicted RSD
100% (100g/100g)	1	$0.66 \times 2 \times (1^{-0.1505})$ = 1.3
10% (10g/100g)	0.1	$0.66 \times 2 \times (0.1^{-0.1505})$ = 1.8
1% (1g/100g)	0.01	$0.66 \times 2 \times (0.01^{-0.1505})$ = 2.6
0.1% (0.1g/100g)	0.001	$0.66 \times 2 \times (0.001^{-0.1505})$ = 3.7
100 ppm (100mg/kg)	$1 \times 10^{-4} = 0.00001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-4})^{-0.1505}$ = 5.2
10 ppm (10mg/kg)	$1 \times 10^{-5} = 0.000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-5})^{-0.1505}$ = 7.4
1 ppm (1mg/kg)	$1 \times 10^{-6} = 0.0000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-6})^{-0.1505}$ = 10.5
0.1 ppm หรือ 100 ppb	$1 \times 10^{-7} = 0.00000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-7})^{-0.1505}$ = 14.9
0.01 ppm หรือ 10 ppb	$1 \times 10^{-8} = 0.000000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-8})^{-0.1505}$ = 21.1
0.001 ppm หรือ 1ppb	$1 \times 10^{-9} = 0.0000000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-9})^{-0.1505}$ = 29.8

ที่มา : ทิพวรรณ (2549)

ตารางที่ 2.6 เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ตามมาตรฐาน Codex

มาตรฐาน	ค่า HORRAT ที่ยอมรับ
Codex	≤ 2

ที่มา : Codex Alimentarius Commission (2002)

2.3.4 ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD)

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ด้วยความเชื่อมั่น 99% (NATA Tech Note #17 : 1997)โดยที่ความเข้มข้นระดับนี้ ไม่อาจบอกเป็นปริมาณที่มีความถูกต้อง และเที่ยงตรงในระดับที่ยอมรับได้ เนื่องจากความไม่แน่นอนสูง

ขั้นตอนการทดสอบ LOD (กรณีที่ sample blank ไม่สามารถอ่านสัญญาณได้)

1) ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบที่ระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้ เช่น LOQ หรือระดับต่ำสุดของความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่เหมาะสม จำนวน 7-10 ซ้ำ

2) คำนวณค่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3) คำนวณค่า LOD จากสูตร LOD = 3SD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ ที่ความเข้มข้นระดับนี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่น และความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ (NATA Tech Note #17 : 1997)

ขั้นตอนการทดสอบ LOQ (กรณีที่ sample blank ไม่สามารถอ่านสัญญาณได้)

1) หาค่า LOQ โดยประมาณ จาก SD ที่ได้จากการหา LOD
2) ประมาณค่า LOQ จากสูตร LOQ = 10SD
3) ยืนยันค่า LOQ ที่มีความแม่น และความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้
   - ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ หรือใกล้เคียง จำนวน 10 ซ้ำ
   - ทดสอบคำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
   - ประเมินการยอมรับความแม่นและความเที่ยง

2.3.6 ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

ความจำเพาะเจาะจง (specificity) เป็นความสามารถของวิธีวิทดสอบที่จะตรวจวัดได้เฉพาะสิ่งที่ต้องการ โดยยังคงความถูกต้องตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยความจำเพาะเจาะจง (selectivity) เป็นความสามารถของวิธีทดสอบที่สามารถแยกสิ่งที่ต้องการทดสอบออกจากสิ่งเจือปนอื่นๆ

ขั้นตอนการหาความจำเพาะเจาะจง (specificity / selectivity)

1) ทดสอบตัวอย่าง ที่มีการเติมสารรบกวน (spiked sample)
2) ตรวจสอบผลการทดสอบหลังพิจารณาว่าสารรบกวนเหล่านั้นทำให้ผลการทดสอบผิดไปหรือไม่

2.3.7 ความคงทนของวิธี (robustness / ruggedness)

ความคงทนของวิธี (robustness) เป็นคุณสมบัติที่แสดงว่าวิธีทดสอบนั้นมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนการทดสอบอย่างไร โดยความคงทนของวิธี (ruggedness) เป็นคุณสมบัติการทำซ้ำของผลการทดสอบ ตัวอย่างใดตัวอย่างหนึ่งภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ

ขั้นตอนการทดสอบความทนของวิธี (ruggedness / robustness)

1) ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการทดสอบ เช่น เวลา, อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด – ด่าง
2) ทดสอบตัวอย่างโดยเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่กำหนดไว้ครั้งละ 1 ตัว
3) ประเมินผลการทดสอบโดยใช้ความแม่น และความเที่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Urairat และคณะ (2006) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบปริมาณสารประกอบซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides), เตตราซัยคลิน (tetracycline) และ ไพริเมทามีน (pyrimethamine) ในน้ำนม โดยการสกัดผ่านคอลัมน์ SPE HLB Oasis cartridge และทดสอบด้วยเครื่องลิคควิดโครมาโทกราฟฟี แมสสเปกโทรมิเตอร์ (LC –MS) ยี่ห้อ Agilent รุ่น HP 1100 Series และ SL 1100 Series โดยใช้คอลัมน์ SymmetryShield RP8 (150 x 2.1 mm, 3.5 μm) ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้สภาวะการชะแบบเกรเดียนท์ชัน ของเฟสเคลื่อนที่ A ประกอบด้วย กรดออกซาลิก 1 มิลลิโมลาร์ และ อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน(95:5)โดยปริมาตร และเฟสเคลื่อนที่ B ประกอบด้วย กรดออกซาลิก 1 มิลลิโมลาร์ และ อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน (5:95) โดยปริมาตร อัตราการไหลเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 5 ไมโครลิตร พบว่าสารในกลุ่มดังกล่าวให้ค่า LOD อยู่ในช่วง 0.48 – 0.61 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.61 – 8.64 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงของการใช้งาน ตั้งแต่ 1.00 - 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงความเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9900 ความถูกต้องของวิธีทดสอบมีค่าร้อยละการกลับคืนของสารอยู่ในช่วง 72.01- 97.39 ค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการทำซ้ำดีกว่า 11.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 ตัวอย่าง

กุ้งขาว *(Litopenaeus vannamai)* จาก บ่อกุ้งนายทองสุก ไกรโสภณ 264/2 หมู่ 6 ตำบล หอมศีล อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 (Mettler – Toledo, PB 3002-S, สวิสเซอร์แลนด์)

3.2.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler – Toledo, AB 204-S, สวิสเซอร์แลนด์)

3.2.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Heraeus, Megafuge 1.0R, เยอรมัน)

3.2.4 เครื่องลดปริมาตรตัวอย่าง (Organomation Associates.Jnc, 12 Position N-Evap™ 111, สหรัฐอเมริกา)

3.2.5 เครื่องลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง (Agilent, 1100 Series, เยอรมัน)

3.2.6 ชุดสกัดสารให้บริสุทธ์ (Waters, Gast, เยอรมัน)

3.2.7 SPE HLB Oasis Cartridge 200 mg , 6 cc.(Water, เยอรมัน)

3.2.8 เครื่องโฮโมจิไนซ์เซอร์ (Jika Laboratechnik , T 25B Ultra Turra, เยอรมัน)

3.2.9 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M Ω $^{-cm}$(Milli-Q Synthesis System, ฝรั่งเศส)

3.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับทดลอง

3.3.1 กรดไดโซเดียมเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติก (di-sodium ethylene diaminetetraacetic acid, Na_2EDTA) AR grade ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

3.3.2 ได-โซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟส (di-sodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4), AR grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.3.3 กรดซิติก (citric acid monohydrate), AR grade ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

3.3.4 เมธานอล (methanol, CH_3OH), HPLC grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile, CH_3CN), HPLC grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.3.6 กรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid , TCA) , AR grade ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

3.3.7 กรดออกซาลิก (oxalic acid), AR grade ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

3.3.8 สารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 95 ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน

3.3.9 สารมาตรฐานเตตราซัยคลิน ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 95 ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน

3.3.10 สารมาตรฐานคลอร์เตตราซัยคลิน ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 95 ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน

3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง

บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาสมุทรสาคร

3.5 วิธีการดำเนินการ

3.5.1 การเตรียมสารมาตรฐานเตตราซัยคลินและอนุพันธ์

ชั่งสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน 0.010 กรัม ละลาย และปรับปริมาตรด้วยเมธานอลให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร ทำเช่นเดียวกันในการเตรียมเตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้น ปิเปตสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด อย่างละ 0.02 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยเฟสเคลื่อนที่จนครบปริมาตร10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.5.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์

การทดสอบหาปริมาณในการทดสอบเชิงคุณภาพสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และ คลอร์เตตราซัยคลิน ใช้เครื่องลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 Series คอลัมน์ ZORBAX Eclipse XDB-C8, 250x 4.6 mm, 5 µm (Agilent) ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อนาที และตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบ photodiode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และปริมาตรการฉีดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร

3.5.2.1 ผลของอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชัน

การทดสอบหาสภาวะในการแยกสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ ในเชิงคุณภาพ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตามข้อ 3.5.1) และใช้เฟสเคลื่อนที่ แบบไอโซเครติกอีลูชัน (isocratic elution) โดยบัฟเฟอร์ ได้แก่ กรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์ และตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน กรดออกซาลิก : เมธานอล : อะซีโตไนไตรล์ ที่แตกต่างกัน 14 สภาวะ จำนวน 2 ครั้ง ตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในสภาวะไอโซเครติกอีลูชัน

สภาวะ	อัตราส่วน		
	กรดออกซาลิก	เมธานอล	อะซีโตไนไตรล์
1	60	15	25
2	60	30	10
3	60	40	0
4	60	5	35
5	60	0	40
6	30	26.2	43.8
7	40	10	50
8	49.4	30	20.6
9	65.3	7.5	27.2
10	70	17.5	12.5
11	70.6	0	29.4
12	80	20	0
13	83	5	12
14	90	3.8	6.2

หมายเหตุ : สภาวะที่ 1 ใช้สภาวะวิธีของ Cinquina และคณะ (2003)
สภาวะที่ 2 ถึง 3 ทดสอบผลตัวทำละลายอินทรีย์ เมธานอล
สภาวะที่ 4 ถึง 5 ทดสอบผลตัวทำละลายอินทรีย์ อะซีโตไนไตรล์
สภาวะที่ 6 ถึง 14 ทดสอบผลบัฟเฟอร์ ของ 0.01 โมลาร์ กรดออกซาลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิจารณาเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT) และค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs)

3.5.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพ

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพของสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ ทำโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สภาวะของเฟสเคลื่อนที่ ที่แตกต่างกัน 3 สภาวะดังนี้

1) สภาวะไอโซเครติกอีลูชัน เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย กรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์ : เมธานอล : อะซีโตไนไตรล์ เท่ากับ 60:15:25 โดยปริมาตร ตามวิธีของ Cinquina และคณะ (2003)

2) สภาวะไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย กรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์: เมธานอล: อะซีโตไนไตรล์ เท่ากับ 83:5:12 โดยปริมาตร ดัดแปลงจากวิธีของ Cinquina และคณะ (2003)

3) สภาวะเกรเดียนท์อีลูชัน เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย กรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์ (A): เมธานอล (B): อะซีโตไนไตรล์ (C) ดังนี้คือ ที่เวลา 0 นาที A:B:C เท่ากับ 83:5:12, ที่เวลา 7.0 นาที A:B:C เท่ากับ 70:5:25, ที่เวลา 7.5 นาที A:B:C เท่ากับ 70:5:25, ที่เวลา 9.0 นาที A:B:C เท่ากับ 83:5:12 และที่ เวลา 15.0 นาที อัตราส่วนคือ A:B:C เท่ากับ 83:5:12

ในแต่ละสภาวะทดสอบซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ เพื่อหาเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT) ค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) ให้มากกว่า 2 และค่าความสามารถในการยึดสารที่ทดสอบไว้ในคอลัมน์ (k') ให้มากกว่า 2 (Synder และ คณะ, 1979)

3.5.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการทดสอบตัวอย่าง

การทดสอบประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ทำโดยการทดสอบตัวอย่างกุ้ง ในเชิงคุณภาพ และตัวอย่างกุ้งที่เติมสารละลายมาตรฐาน ทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยการสกัดตัวอย่างกุ้งตามขั้นตอนการสกัดของ Cinquina และคณะ (2003) และการทำสารให้บริสุทธิ์ ด้วยการผ่านคอลัมน์ SPE HLB Oasis Cartridge (ภาพที่ 3.1) จากนั้นทดสอบตามสภาวะในข้อ 3.5.2.2 จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อพิจารณาลักษณะของโครมาโทแกรม

3.5.3 ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์

ศึกษาหาตัวทำละลายขั้นตอนสุดท้ายที่เหมาะสม ในการละลายสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้ง โดยใช้ตัวทำละลายที่ใช้กับสารมาตรฐานและตัวอย่างกุ้งจำนวน 4 สภาวะ ดังตารางที่ 3.2 และใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดเท่ากับ 0.08, 0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างกุ้งที่เติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด จะใช้ความเข้มข้นของสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตรฐานทั้ง 3 ชนิดเท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยการสกัดตัวอย่างกุ้งตามขั้นตอนการสกัดของ Cinquina และคณะ (2003) (ภาพที่ 3.1)

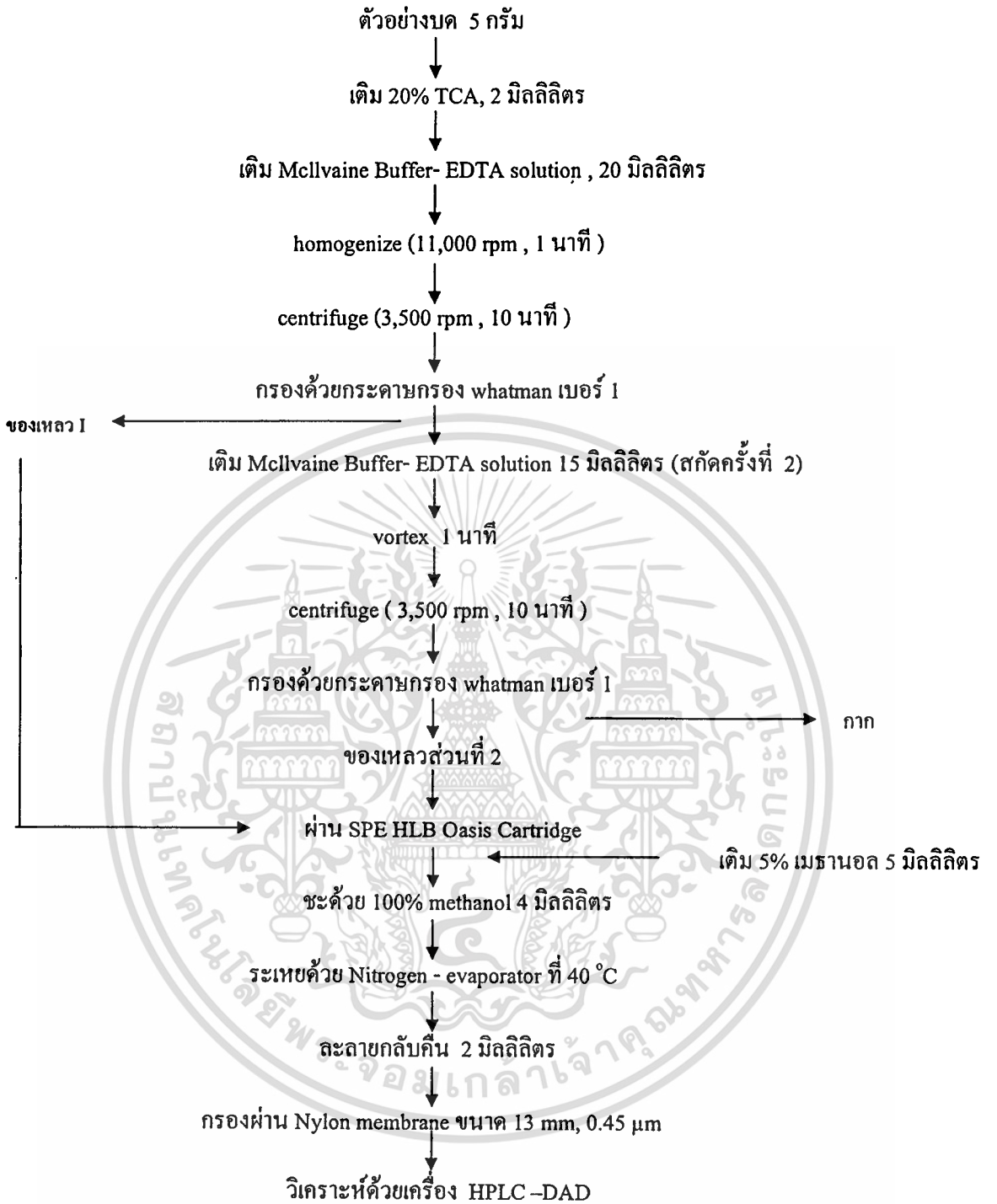
จากนั้นทดสอบด้วยเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะการชะที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.5.2 แล้วนำพื้นที่ใต้พีกมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ และคำนวณหาค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) รวมทั้งหาค่าการคืนกลับของสารของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด

ตารางที่ 3.2 ตัวทำละลายกลับคืนในสารละลายมาตรฐานผสมและตัวอย่างกุ้ง

สภาวะ	ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	ตัวทำละลายกลับคืน	
		เฟสเคลื่อนที่	เมธานอล
1	สารละลายมาตรฐาน	/	
	ตัวอย่างกุ้ง	/	
2	สารละลายมาตรฐาน	/	
	ตัวอย่างกุ้ง		/
3	สารละลายมาตรฐาน		/
	ตัวอย่างกุ้ง		/
4	สารละลายมาตรฐาน		/
	ตัวอย่างกุ้ง	/	

หมายเหตุ เฟสเคลื่อนที่ ได้แก่กรดออกซาลิก: เมธานอล: อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 83:5:12 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 การเตรียมตัวอย่างของขั้นตอนการสกัดสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cinquina และคณะ (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4 ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบด้วยเครื่องลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง (Method Validation)

นำสภาวะการชะที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.5.2 และสภาวะการละลายตัวอย่างที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.5.3 มาดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบหาปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในกุ้ง (EURACHEM GUIDE, 1998) ดังนี้

3.5.4.1 การทดสอบช่วงการทดสอบ (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity)

ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อย 7 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 ทำการสกัดตัวอย่างดังภาพที่ 3.1 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ (แกน X) กับ สัญญาณ (แกน Y) พิจารณาช่วงความเข้มข้นที่เป็นความเป็นเส้นตรง

ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
ออกซีเตตราซัยคลิน	0.04, 0.12, 0.16, 0.2, 0.24, 0.28, 0.32
เตตราซัยคลิน	0.05, 0.12, 0.16, 0.2, 0.24, 0.28, 0.32
คลอร์เตตราซัยคลิน	0.14, 0.16, 0.2, 0.24, 0.26, 0.28, 0.32

จากนั้นทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้นภายในช่วงของการทดสอบ อย่างน้อย 7 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 ทำการสกัดตัวอย่างดังภาพที่ 3.1 ประเมินจากการเขียนกราฟ ระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และสัญญาณพื้นที่ของพีก (แกน Y) แล้วพิจารณาความสัมพันธ์ด้วยค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) โดยค่า r ที่ยอมรับได้มีค่ามากกว่า 0.995

3.5.4.2 การประเมินปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection , LOD)

ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบที่ระดับต่ำสุด โดยผ่านการสกัดตัวอย่างและการทดสอบด้วยเรื่อง HPLC ภายใต้ผลการทดลองในข้อ 3.5.2 และ 3.5.3 และพิจารณาความเข้มข้นที่ให้ค่า signal to noise มากกว่า 3 จำนวน 10 ซ้ำ หาค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน SD และใช้สูตรการคำนวณหาค่า LOD โดย LOD = 3SD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.3 การประเมินปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

นำค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการประเมินหาค่า LOD ในข้อ 3.5.4.2 มาคำนวณหาค่า LOQ โดย LOQ = 10SD และยืนยันค่า LOQ ที่คำนวณได้ จำนวน 10 ซ้ำแล้วประเมินผลความแม่นด้วยร้อยละของการกลับคืน และความเที่ยงประเมินด้วย HORRAT

3.5.4.4 การประเมินความแม่นของการทดสอบ (accuracy)

ประเมินโดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นในช่วงของการทดสอบ อย่างน้อย 3 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ จากนั้นประเมินความความแม่นด้วยร้อยละของการกลับคืน

3.5.4.5 การประเมินความเที่ยงของการทดสอบ (precision)

ประเมินโดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นในช่วงของการทดสอบ อย่างน้อย 3 ระดับ (ตามความเข้มข้นในข้อ 3.5.4.4) ระดับละ 10 ซ้ำ โดยประเมินความสามารถในการทดสอบซ้ำ (repeatability) โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Relative Standard Deviation, %RSD) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่เติมลงไป โดยใช้เกณฑ์การประเมินด้วย HORRAT โดยนำค่าความเข้มข้นที่ให้ผล %Recovery มาคำนวณหา $\%RSD_r$ โดยใช้ Horwitz's equation

สำหรับ repeatability : $RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

หมายเหตุ RSD_r = ค่า RSD จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (repeatability); จัดเป็น Predicted RSD

C = Concentration ratio (ไม่มีหน่วย)

ประเมินการยอมรับความเที่ยงโดยใช้ HORRAT = Experimental RSD / Predicted RSD_r เกณฑ์การยอมรับต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

3.6 การประเมินผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Ramdom Design : CRD) การทดลองที่ 3.5.2.2 ทดสอบความแปรปรวน (ANOVA) และ การทดลองที่ 3.5.3 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T –test : Paired Two Sample for Mean ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสภาวะการทดสอบปริมาณสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูงซึ่งให้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลสภาวะการชะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์

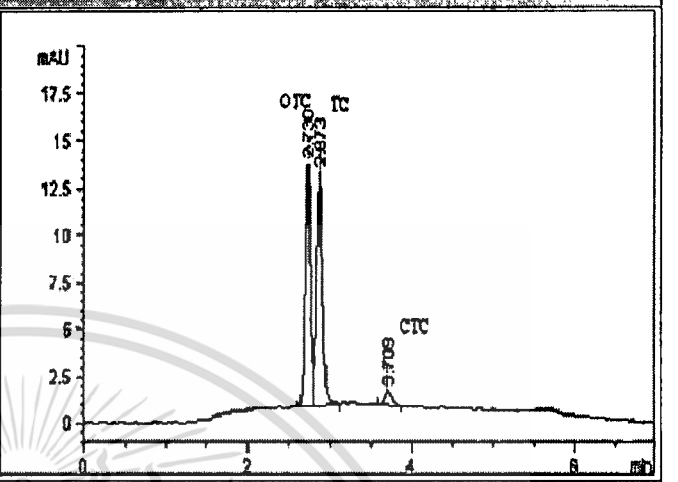
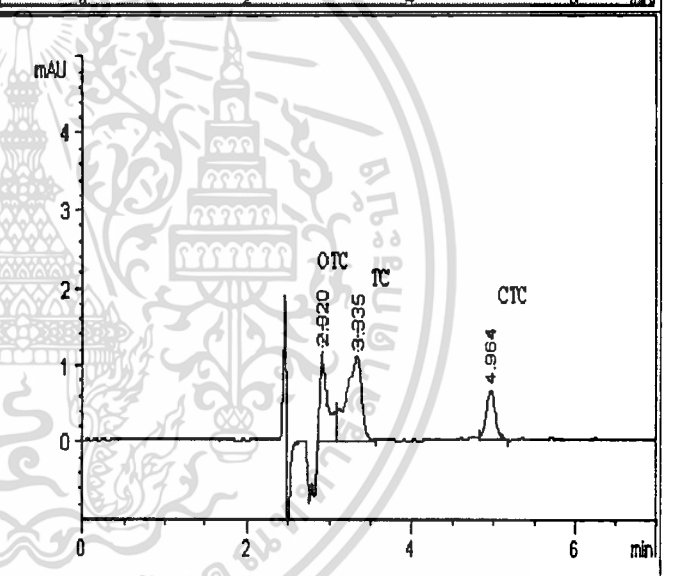
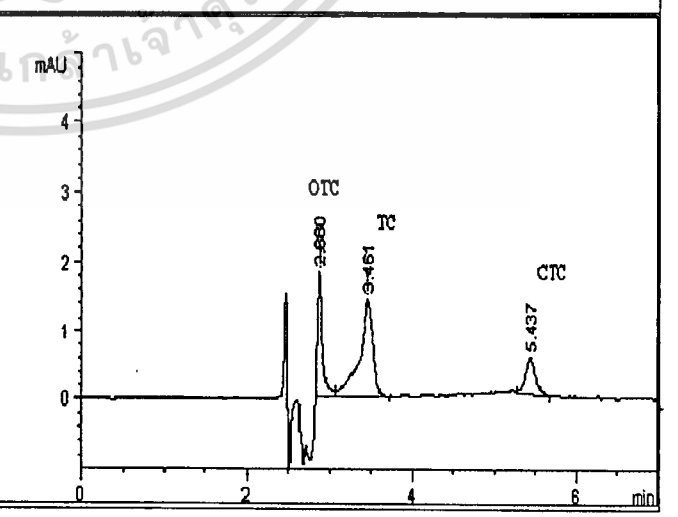
4.1.1 ผลของอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชัน

การใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชันในอัตราส่วนต่างๆเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารมาตรฐานเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ทั้ง 2 ชนิด ทำการทดสอบโดยการปรับเพิ่ม หรือลดอัตราส่วนของเฟสเคลื่องที่ ได้แก่ กรดออกซาลิก เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ จำนวน 14 อัตราส่วน (สภาวะ)ให้ผลดังตารางที่ 4.1

ผลการทดสอบสารมาตรฐานเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ทั้ง 2 ชนิด พบว่า การใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชัน ตามวิธีการของ Cinquina และคณะ (2003) โดยใช้อัตราส่วนของกรดออกซาลิก : เมธานอล : อะซีโตไนไตรล์ เท่ากับ 60:15:25 นั้นใช้เวลาในการทดสอบทั้งสิ้นประมาณ 4 นาที (ตารางที่ 4.1, สภาวะที่ 1) โดยโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานจะให้ฐานพีกของออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลินซ้อนทับกัน และมีค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT) ใกล้เคียงกัน รวมทั้งมีค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) เท่ากับ 1.04 จึงทำให้ไม่สามารถทดสอบออกมาในรูปของคุณภาพและปริมาณได้ซึ่งค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกันต้องมีค่ามากกว่า 2 ตาม Synder และ คณะ (1979)

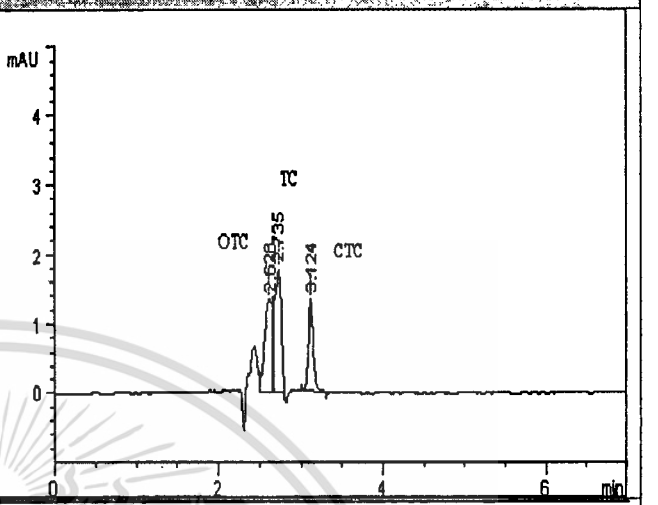
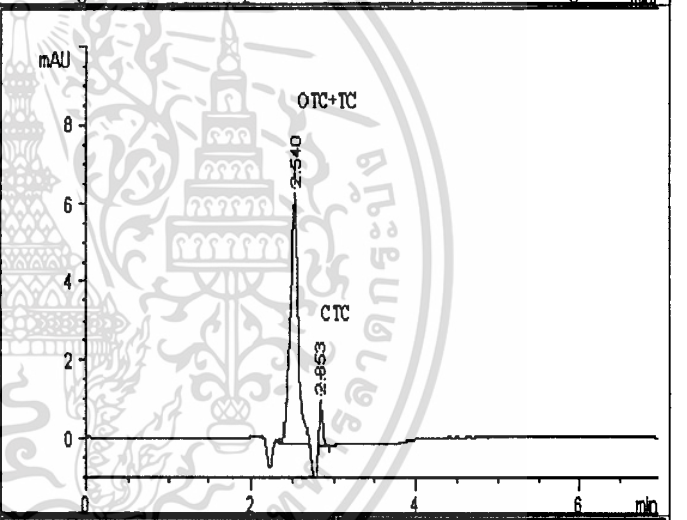
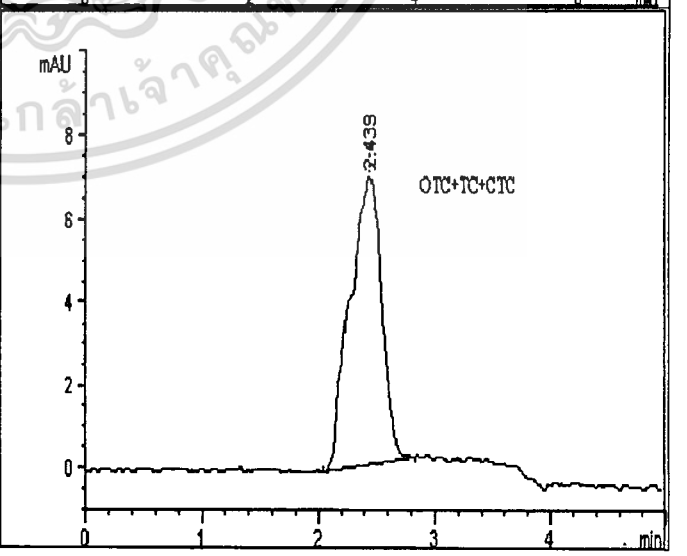
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ภายใต้สภาวะการชะแบบไอโซเครติกอีลูชันในอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ

สภาวะที่	อัตราส่วน			โครมาโทแกรม
	กรดออกซาลิก	เมธานอล	อะซีโตไนไตรล์	
1	60	15	25	
2	60	30	10	
3	60	40	0	

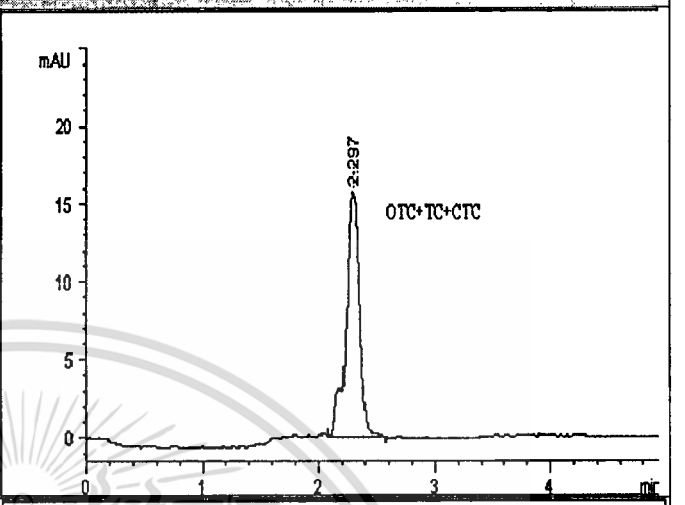
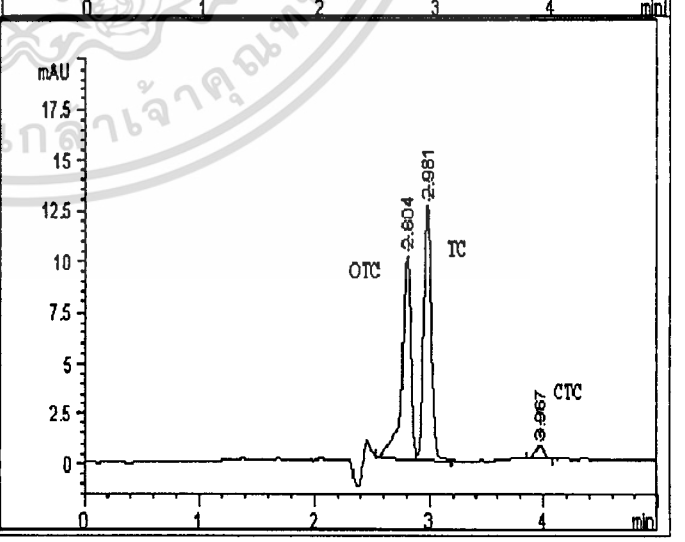
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

สภาวะที่	อัตราส่วน			โครมาโทแกรม
	กรดออกซาลิก	เมธานอล	อะซีโตไนไตรล์	
4	60	5	35	
5	60	0	40	
6	30	26.2	43.8	

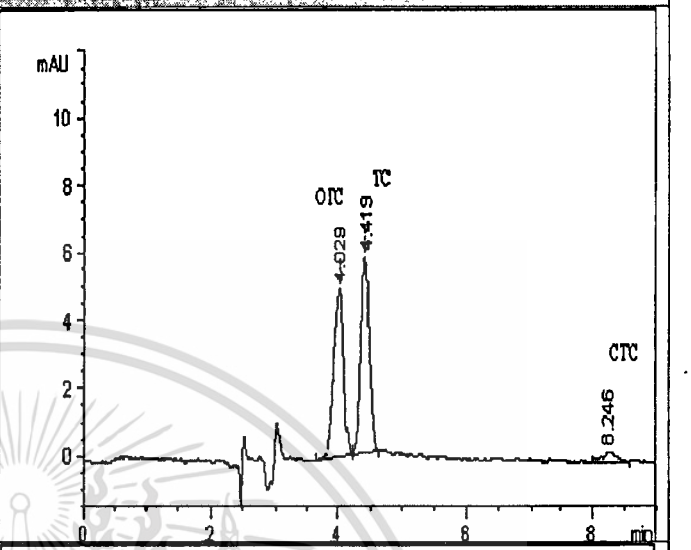
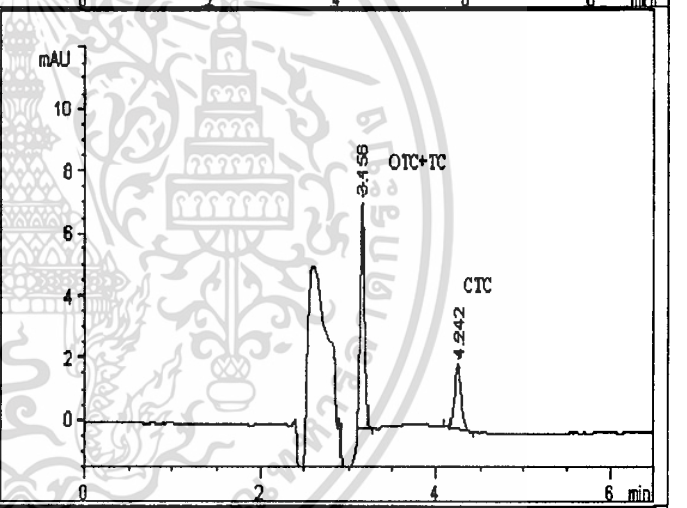
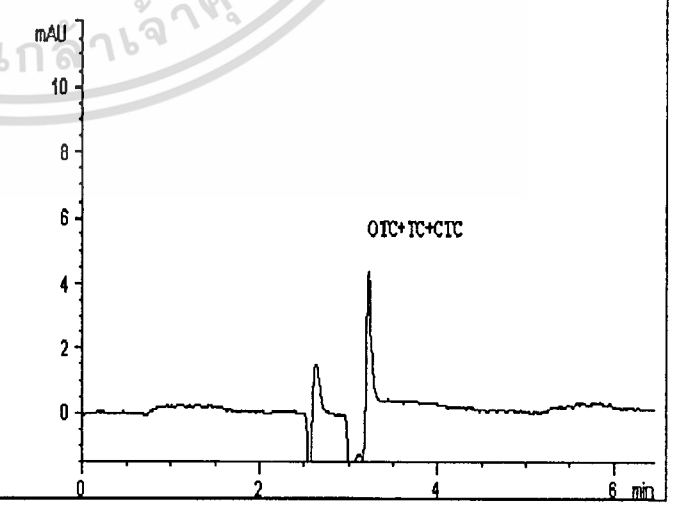
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

สภาวะที่	อัตราส่วน			โครมาโทแกรม
	กรดออกซาลิก	เมธานอล	อะซีโตไนไตรล์	
7	40	10	50	
8	49.4	30	20.6	
9	65.3	7.5	27.2	

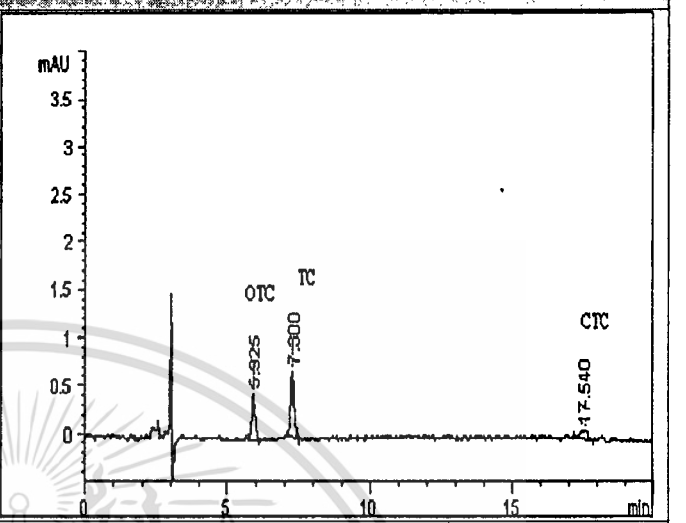
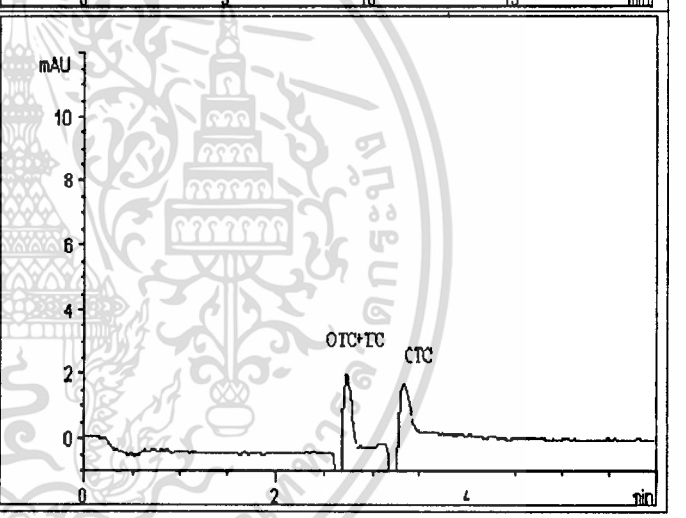
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

สภาวะที่	อัตราส่วน			โครมาโทแกรม
	กรดออกซาลิก	เมธานอล	อะซีโตไนไตรล์	
10	70	17.5	12.5	
11	70.6	0	29.4	
12	80	20	0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

สภาวะที่	อัตราส่วน			โครมาโทแกรม
	กรดออกซาลิก	เมธานอล	อะซีโตไนไตรล์	
13	83	5	12	
14	90	3.8	6.2	

เมื่อให้อัตราส่วนของกรดออกซาลิกคงที่ในการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่โดยการเพิ่มอัตราส่วนของเมธานอล และลดอัตราส่วนของอะซีโตไนไตรล์ ดังนี้ 60:30:10 และ 60:40:0 แสดงดังสภาวะที่ 2 และ 3 (ตารางที่ 4.1) ตามลำดับ จากโครมาโทแกรม ทั้ง 2 พบว่า จะใช้เวลาในการทดสอบทั้งสิ้น 6 นาที โดยออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลินจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น และพีกของออกซีเตตราซัยคลินจะเกิดการซ้อนทับกับช่วงเวลาที่พีกของสารที่ไม่สามารถถูกหน่วงเหนี่ยว หรือเกิดอันตรกิริยาใดๆในคอลัมน์ (void time) ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบเชิงปริมาณในตัวอย่าง อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามยังสามารถแยกพีกของเตตราซัยคลินออกจากพีกออกซีเตตราซัยคลินได้ แต่รูปร่างของพีกไม่สมมาตร (front peak) เป็นผลมาจากการเพิ่มอัตราส่วนของเมธานอลที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าพีกของคลอร์เตตราซัยคลินยังคงแยกอย่างชัดเจน รวมทั้งมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) ระหว่างเตตราซัยคลินและคลอร์เตตราซัยคลิน ทั้งสองเท่ากับ 6.21 และ 8.56 ตามลำดับ

การปรับเพิ่มอัตราส่วนของอะซีโตไนไตรล์ และลดอัตราส่วนของเมธานอลดังนี้ 60:5:35 และ 60:0:40 จะให้ผลดังสภาวะที่ 4 และ 5 (ตารางที่ 4.1) ตามลำดับ พบว่าจะใช้เวลาในการทดสอบทั้งสิ้น 3.5 นาที โดยฐานพีกของออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลินซ้อนทับกัน ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ส่วนการใช้อัตราส่วน 60:0:40 พีกของออกซีเตตราซัยคลิน และเตตร้าซัยคลินจะอยู่รวมเป็นพีกเดียวกัน แต่พีกของคลอร์เตตราซัยคลินแยกออกจากเตตราซัยคลินได้อย่างชัดเจนในทั้ง 2 สภาวะไอโซเครติกอีลูชันที่ทดสอบ ดังนั้นแสดงว่าการปรับอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ จะไม่สามารถแยกพีกของออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลินได้ดีกว่าการใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ตามวิธีการของ Cinquina และคณะ (2003) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เมธานอลจะทำให้ออกซีเตตราซัยคลินถูกหน่วงเหนี่ยว (retain) หรือเกาะติดอยู่กับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ได้ดีกว่าการใช้อะซีโตไนไตรล์ ส่งผลให้สารประกอบออกซีเตตราซัยคลินและเตตราซัยคลินแยกออกจากกันได้ดีขึ้น แต่พีกจะอยู่ในรูปที่ไม่สมมาตร ส่วนการใช้อะซีโตไนไตรล์นั้น ไม่ส่งผลให้ออกซีเตตราซัยคลินถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเกาะติดอยู่กับเฟสอยู่กับที่ ดังนั้นออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลินจะถูกชะผ่านตามเฟสเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วกว่า

เมื่อปรับอัตราส่วนของกรดออกซาลิกในเฟสเคลื่อนที่ โดยการปรับลดกรดออกซาลิกจาก 60 เป็น 30 และเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่เมธานอลและอะซีโตไนไตรล์ พบว่าไม่สามารถแยกออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลินออกจากกันได้เลย (สภาวะที่ 6) นอกจากนี้การใช้อัตราส่วนของกรดออกซาลิกเท่ากับ 40 ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (สภาวะที่ 7) แต่ในสภาวะที่ 8 เมื่อใช้อัตราส่วนของกรดออกซาลิกเป็น 49.4 พบว่าสามารถแยกคลอร์เตตราซัยคลินออกจากออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลินได้ แต่ออกซีเตตราซัยคลินและเตตราซัยคลินยังคงรวมตัวเป็นพีกเดียวกันอยู่

ในการทดสอบการเพิ่มอัตราส่วนของกรดออกซาลิก จาก 60 ถึง 90 ด้วยการปรับลดอัตราส่วนของเมธานอลและอะซีโตไนไตรล์ (สภาวะที่ 9-14) พบว่าระยะเวลาในการทดสอบจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากคลอร์เตตราซัยคลินเป็นสารประกอบที่มีความเป็นขั้วต่ำ จึงถูกหน่วงเหนี่ยว หรือเกาะติดกับเฟสอยู่กับที่ได้นานขึ้น ส่งผลให้ใช้เวลาการชะออกมาจากคอลัมน์นานกว่าการใช้เฟสเคลื่อนที่ ที่มีองค์ประกอบของตัวทำละลายอินทรีย์มากหรือมีขั้วต่ำกว่า จากการใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 65.3:7.5:27.2 (สภาวะที่ 9) พบว่า พีกของออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลินแยกออกจากกันได้ดีขึ้น แต่ยังมีค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกันเท่ากับ 1.42 นอกจากนี้พีกของออกซีเตตราซัยคลินยังมีฐานพีกกว้าง และอยู่ติดกับพีกของสารที่ไม่สามารถถูกหน่วงเหนี่ยว หรือเกิดอันตรกิริยาใดๆในคอลัมน์ (void time) จึงทำให้สัญญาณพีกออกซีเตตราซัยคลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจรวมกัน ส่งผลให้เมื่อนำไปทดสอบหาปริมาณสารนั้น อาจทำให้พื้นที่ใต้กราฟพีกของออกซีเตตราซัยคลินอาจมีค่ามากกว่าความเป็นจริงได้ การใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่นี้จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 4 นาที และยังคงสามารถแยกคลอร์เตตราซัยคลินได้อย่างชัดเจน ค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน เท่ากับ 7.41 แต่พีกมีลักษณะเตี้ยและฐานพีกกว้าง

เมื่อปรับเพิ่มอัตราส่วนของกรดออกซาลิกเป็น 70 และปรับอัตราส่วนของเมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ในอัตราส่วนใกล้เคียงกันจะทำให้พีกแยกออกจากกันได้ดีขึ้น การใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 70:17.5:12.5 (สภาวะที่ 10) พบว่าใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งสิ้น 9 นาที พีกของออกซีเตตราซัยคลินและเตตราซัยคลิน แยกออกจาก void time ได้ดีขึ้นกว่าการลดอัตราส่วนของกรดออกซาลิก นอกจากนี้ยังมีค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน ระหว่างเตตราซัยคลินและคลอร์เตตราซัยคลิน เท่ากับ 1.47 และ 10.8 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพีกของคลอร์เตตราซัยคลินยังมีลักษณะเตี้ยและฐานพีกกว้าง

การปรับเพิ่มอัตราส่วนของกรดออกซาลิก โดยการใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 70.6: 0: 29.4 (สภาวะที่ 11) พบว่า การให้อัตราส่วนของเมธานอลเท่ากับ 0 จะใช้เวลาในการทดสอบทั้งสิ้น 5 นาที พีกของออกซีเตตราซัยคลินไม่สามารถแยกออกจาก void time ได้ แต่พีกของเตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลินแยกออกจากกันอย่างชัดเจน โดย มีค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน ระหว่างเตตราซัยคลินและคลอร์เตตราซัยคลินเท่ากับ 6.19 ส่วนการใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 80:20:0 (สภาวะที่ 12) นั้นพบว่าการให้อัตราส่วนของอะซีโตไนไตรล์เท่ากับศูนย์ พบว่าพีกทั้ง 3 ชนิดถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้นและรวมอยู่กับ void time หรือพีกของสารที่ไม่สามารถถูกหน่วงเหนี่ยว ทำให้เมื่อหาปริมาณของสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในตัวอย่างเกิดความผิดพลาดได้

การเพิ่มอัตราส่วนของกรดออกซาลิกในเฟสเคลื่อนที่ เป็น 83:5:12 (สภาวะที่ 13) และ 90:3.8:6.2 (สภาวะที่ 14) พบว่า ในสภาวะแรกนั้นใช้เวลาในการทดสอบทั้งสิ้น 18 นาที สามารถแยกสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ได้อย่างชัดเจน โดยคลอร์เตตร้าซัยคลินมีค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) เท่ากับ 25.0 พีกมีลักษณะเตี้ยและฐานพีกกว้าง (broad peak) จึงอาจส่งผลให้การทดสอบเชิงปริมาณมีความผิดพลาดค่อนข้างสูง ส่วนสภาวะที่สอง พบว่า ใช้เวลาในการทดสอบทั้งสิ้น 4 นาที ซึ่งไม่สามารถเห็นเป็นรูปพีก และไม่สามารถหาค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs)

ในการทดสอบด้วยการให้อัตราส่วนของออกซาลิกคงที่ โดยลดอัตราส่วนเมธานอล เพิ่มอะซีโตไนไตรล์ (สภาวะที่ 3 และ5) พบว่า พีกของสารเตตราซัยคลินเคลื่อนที่รวมกัน เนื่องจากความมีขั้วของตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์เพิ่มขึ้น และจะเห็นได้ว่า อะซีโตไนไตรล์ ในระบบรีเวร์สเฟส (reversed-phase) จะมีขั้วน้อยกว่ามากกว่าเมธานอล ทำให้สารเตตราซัยคลิน ถูกชะออกมาเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดสอบด้วยการปรับอัตราส่วนของกรดออกซาลิกในเฟสเคลื่อนที่ ด้วยการเพิ่มอัตราส่วนของกรดออกซาลิก และลดอัตราส่วนของอะซีโตไนไตรล์ โดยให้เมธานอลคงที่ (สภาวะที่ 5, 11) จะทำให้ความมีขั้วของระบบเพิ่มขึ้น ทำให้พีกแยกจากกันได้ดีขึ้น และเพิ่มอัตราส่วนของกรดออกซาลิก และลดอัตราส่วนของ เมธานอล และให้อะซีโตไนไตรล์คงที่ (สภาวะที่ 3, 12) จะทำให้พีกทั้ง 3 ถูกชะออกจากคอลัมน์เร็ว แสดงว่าความมีขั้วของระบบเพิ่มขึ้น และจะเห็นได้ว่าเมื่อสารประกอบคลอร์เตตราซัยคลิน ละลายอยู่ในรูปสารละลายจะมีคุณสมบัติเป็น Zwitterion ซึ่งมีทั้งประจุบวก และลบอยู่ภายในโมเลกุลเดียวกัน เมื่ออยู่ในเฟสเคลื่อนที่ (กรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์) มีสภาวะเป็นกรด ประจุลบของสารคลอร์เตตราซัยคลินจะถูกสะเทิน (neutralization) โมเลกุลของสารประกอบเตตราซัยคลินจะแสดงสมบัติความไม่มีขั้วมากขึ้น และเกิดอันตรกิริยากับเฟสอยู่กับที่ได้ดีขึ้น ดังนั้นโมเลกุลจึงยึดอยู่กับภายในคอลัมน์ได้ดีขึ้น และต้องใช้เวลานานขึ้นในการออกจากคอลัมน์ (Nelson ,1998) จากผลการทดลองสามารถสรุปความมีขั้วของตัวทำละลายในการชะสารกลุ่มเตตราซัยคลินในแต่ละองค์ประกอบดังนี้ อะซีโตไนไตรล์มีขั้วน้อยกว่ากว่ากรดออกซาลิก และเมธานอล Stavros (2000)

จากโครมาโทแกรมสามารถสรุปค่าเวลาที่ออกจากคอลัมน์ และความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชันในการทดสอบทั้ง 14 สภาวะ ได้ดังตารางที่ 4.2 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชัน ในการแยกสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ของเฟสเคลื่อนที่ไอโซเครติกอีลูชัน พบว่าการใช้อัตราส่วนของกรดออกซาลิก : เมธานอล : อะซีโตไนไตรล์ เท่ากับ 83:5:12 จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน ของสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ให้ค่าการแยกพีกออกจากกันมากกว่า 2 และสามารถแยกพีกได้อย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT) และค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) ของสารละลายมาตฐานเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชัน

สภาวะ	อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่	ออกซีเตตราซัยคลิน		เตตราซัยคลิน		คลอร์เตตราซัยคลิน	
		RT	Rs	RT	Rs	RT	Rs
1	60:15:25	2.781	-	2.922	1.04	3.777	6.71
2	60:30:10	2.920	-	3.335	1.82	4.964	6.21
3	60:40:0	2.880	-	3.471	3.44	5.437	8.56
4	60:5:35	2.628	-	2.735	0.36	3.124	2.63
5	60:0:40	-	-	-	-	2.853	2.26
6	30:26.2:43.8	-	-	-	-	-	-
7	40:10:30	-	-	-	-	-	-
8	49.4:30:20.6	-	-	-	-	-	-
9	65.3:7.5:27.2	2.804	-	2.981	1.42	3.962	7.41
10	70:17.5:12.5	4.029	-	4.419	1.47	8.246	10.79
11	70.6:0:29.4	-	-	3.156	3.56	4.242	6.19
12	80:20:0	-	-	-	-	-	-
13	83:5:12	5.899	-	7.269	5.986	17.453	25.012
14	90:3.8:6.2	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : (-) ไม่สามารถแยกพีกออกจากกันได้

สภาวะที่ 1 ผลของวิธีของ Cinquina และคณะ (2003)

สภาวะที่ 2 ถึง 3 ผลของ เมธานอล

สภาวะที่ 4 ถึง 5 ผลของ อะซีโตไนไตรล์

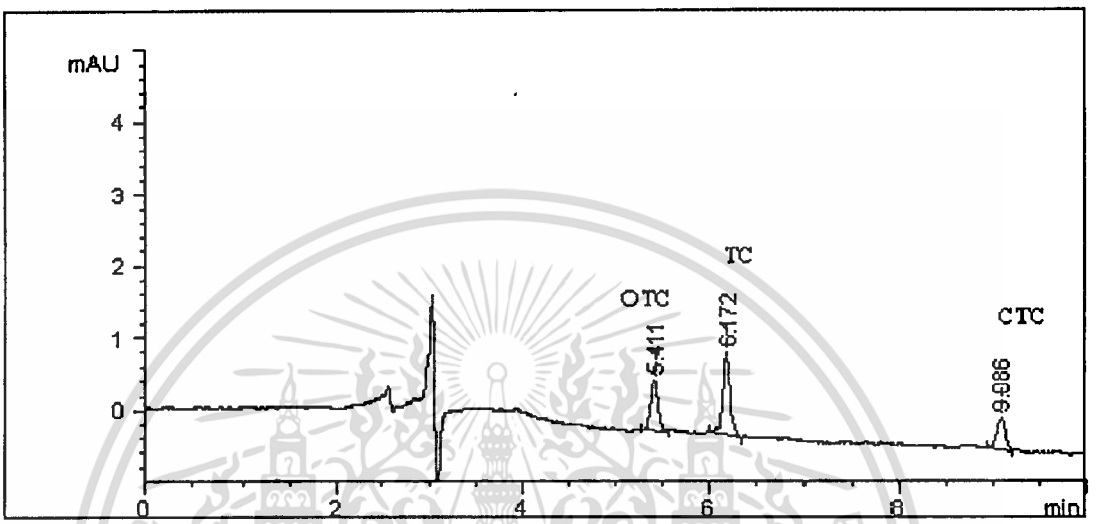
สภาวะที่ 6 ถึง 14 ผลของ 0.01 โมลาร์ กรดออกซาลิก

4.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพ

อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชันที่เหมาะสม ในการแยกสารประกอบเตตร้าซัยคลินและอนุพันธ์ จะใช้เวลาประมาณ 18 นาที (สภาวะที่ 13 ,ตารางที่ 4.1) ซึ่งเป็นเวลาที่นานและสิ้นเปลืองสารเคมี ดังนั้นจึงดัดแปลงสภาวะในการทดสอบ โดยการเปลี่ยนความแรงของเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์อีลูชัน ด้วยการปรับสัดส่วนของกรดออกซาลิก, เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ เพื่อลดเวลาที่ใช้ในการทดสอบแต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารมาตรฐานทั้ง 3ชนิด จากผลการปรับเปลี่ยนสภาวะของเฟสเคลื่อนที่พบว่า สารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน มีฐานพีกแคบและสูง รวมทั้งมีค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) ของทั้ง 3 พีก มากกว่า 5.02 และใช้เวลาทั้งสิ้น 10 นาที (ภาพที่ 4.1) ดังนั้นสภาวะดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมในการทดสอบสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ทั้งสอง



ภาพที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ของเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์อีลูชัน (gradient elution condition) ในอัตราส่วน(83:5:12)

เมื่อเปรียบเทียบผลของการเปลี่ยนสภาวะไอโซเครติกอีลูชันของวิธี Cinquina และคณะ (2003) กับสภาวะไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง และเกรเดียนท์อีลูชัน (ตารางที่ 4.3) พบว่าในแต่ละสภาวะจะส่งผลให้เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ ค่าความสามารถในการแยกพีคออกจากกัน และค่าความสามารถในการยึดสารที่ทดสอบไว้ในคอลัมน์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (RT) ค่าความสามารถในการยึดสารที่ทดสอบไว้ในคอลัมน์ (k') และค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน (Rs) ของสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์

สารประกอบ	พารามิเตอร์	สภาวะ		
		ไอโซเครติก อีลูชัน	ไอโซเครติกอีลูชัน แบบดัดแปลง	เกรเดียนท์อีลูชัน
ออกซีเตตราซัยคลิน	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±0.2037[c]	18.295±1.173[b]	22.087±3.885[a]
เตตราซัยคลิน	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]
คลอร์เตตราซัยคลิน	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]

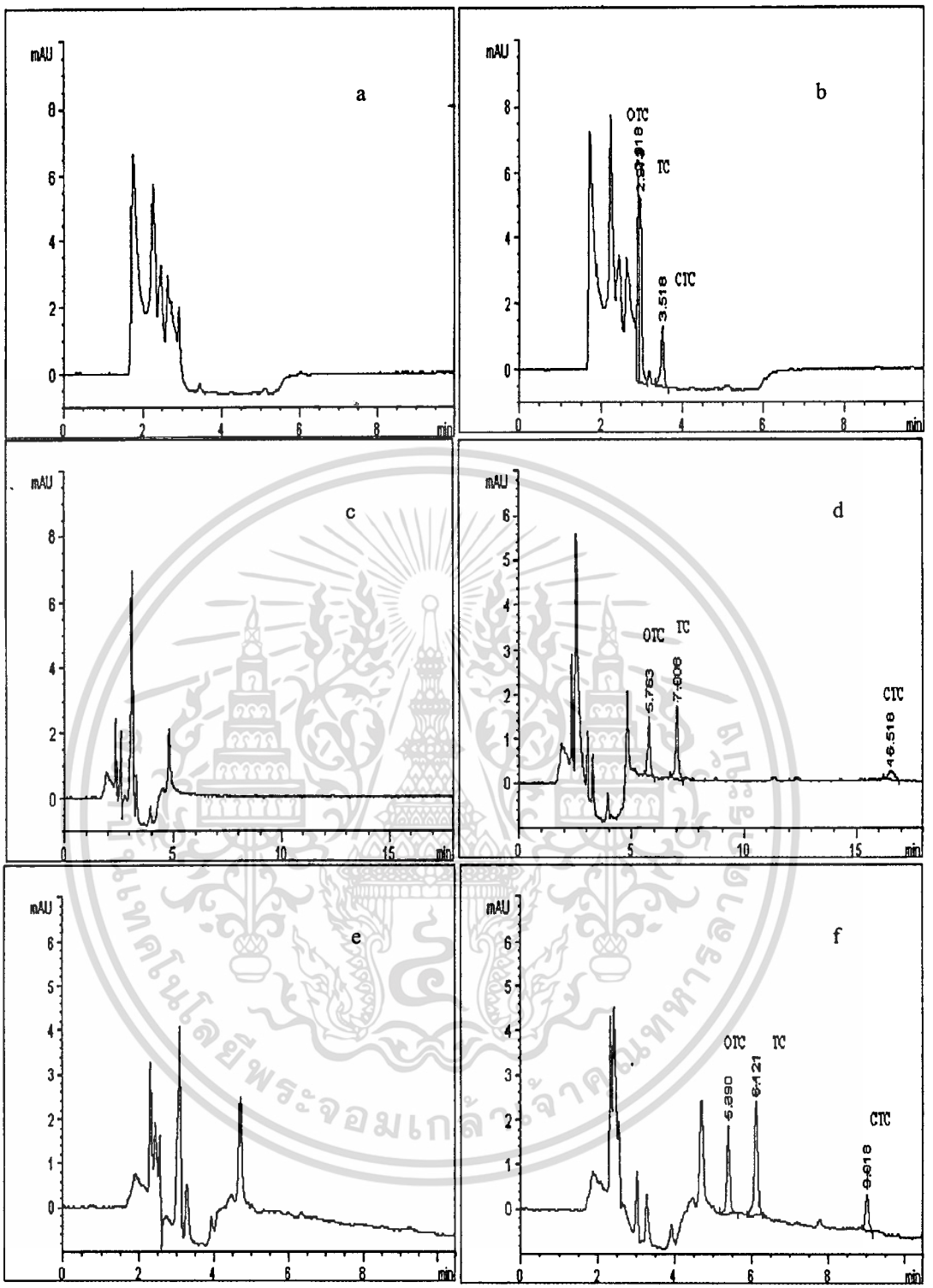
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4.3 พบว่าการปรับสภาวะไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง จะทำให้ค่า RT ของสารมาตรฐานทั้งสามชนิดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่า k' และ Rs เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถแยกออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลิน ออกจากกันได้ดีขึ้น แต่สารคลอร์เตตราซัยคลินยังคงใช้เวลาค่อนนาน แต่เมื่อทดสอบโดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์อีลูชัน พบว่า RT ของสารมาตรฐานทั้ง 3 ลดลงจากสภาวะไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง ส่งผลให้ค่า k' และ Rs ลดลง ยกเว้นค่า Rs ของออกซีเตตราซัยคลินที่เพิ่มขึ้น แม้นและอมร (2534) ได้กล่าวการเปลี่ยนแปลงของค่า RT, Rs และ k' ขึ้นอยู่กับการปรับเปลี่ยนสภาวะและการเปลี่ยนอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่และประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้งาน

4.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการทดสอบตัวอย่าง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการทดสอบตัวอย่าง ทำโดยการทดสอบตัวอย่างกุ้งที่ไม่มีสารประกอบเตตราซัยคลินในเชิงคุณภาพ และตัวอย่างกุ้งที่เติมสารละลายมาตรฐาน ทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ แสดงดังภาพที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมของตัวอย่างกุ้ง (ซ้าย) และตัวอย่างกุ้งที่เติมสารละลายมาตรฐาน เตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ (ขวา) โดยใช้สภาวะการชะแบบไอโซเครติกอีลูชัน (b), ไอโซเครติกอีลูชัน แบบดัดแปลง(d) และเกรเดียนท์อีลูชัน(f)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบสัญญาณพีกของตัวอย่างกุ้ง ในเชิงคุณภาพที่สภาวะของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ แสดงดัง ภาพที่ 4.2a, 4.2c และ 4.2e โดยสัญญาณพีกของตัวอย่างกุ้ง จะมีสัญญาณที่แตกต่างกันในแต่ละสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ ส่วนตัวอย่างกุ้งที่เติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 4.2b, 4.2d และ 4.2f) พบว่าสัญญาณของตัวอย่างกุ้งในการทดสอบตามสภาวะแบบไอโซเครติกอีลูชัน มีการซ้อนทับของพีกของสารละลายมาตรฐาน (ภาพที่ 4.2b) ทำให้ไม่สามารถทดสอบสารในเชิงปริมาณได้ แต่การใช้สภาวะไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง จะทำให้พีกของสารละลายมาตรฐานนั้นแยกออกจากจากสัญญาณตัวอย่างกุ้งได้ชัดเจน (ภาพที่ 4.2d) แต่ใช้เวลาในการทดสอบนาน รวมทั้งรูปร่างพีกของคลอร์เตตราซัยคลินมีลักษณะเตี้ยและฐานพีกกว้างอาจทำให้การทดสอบเชิงปริมาณผิดพลาด ส่วนการใช้สภาวะแบบเกรเดียนท์อีลูชัน จะทำให้พีกของสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน แยกจากกันตัวอย่างได้อย่างชัดเจน ใช้เวลาน้อยในการทดสอบ (ภาพที่ 4.2f) ดังนั้นการทดสอบตัวอย่างกุ้งภายใต้สภาวะเกรเดียนท์อีลูชัน จึงให้ผลการทดสอบเชิงคุณภาพที่ดีกว่าสภาวะแบบไอโซเครติกอีลูชัน และสภาวะไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง

4.2 ผลของตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้ง

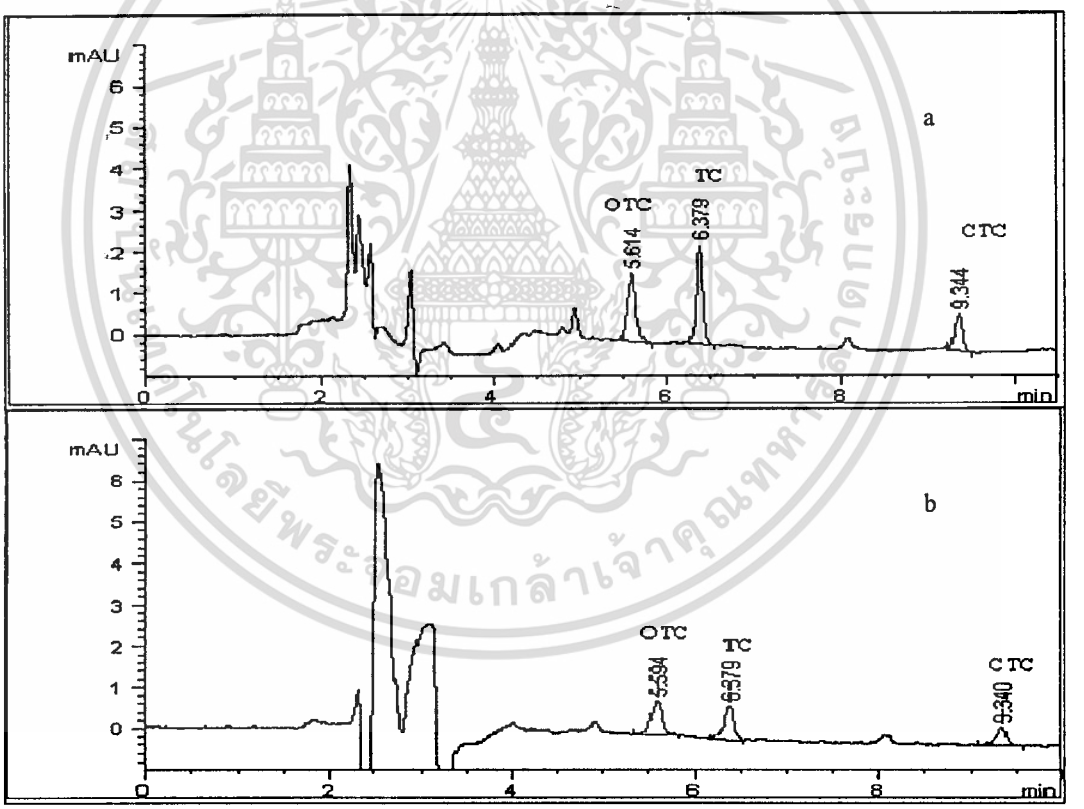
การเตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.08 ถึง 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เจือจางด้วยเฟสเคลื่อนที่ (83:5:12) และเมธานอล (ตารางที่ 4.4) พบว่า การละลายสารละลายมาตรฐานด้วยเฟสเคลื่อนที่ ให้ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน อยู่ระหว่าง 0.99906 - 0.99989 ส่วนการละลายด้วยเมธานอล ให้ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์อยู่ระหว่าง 0.99814- 0.99832 ซึ่งตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดในการละลายสารละลายมาตรฐานให้ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ มากกว่า 0.995 และอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานกำหนดของ EURACHEM GUIDE (1998) ดังนั้นจึงสามารถใช้ตัวทำละลาย เฟสเคลื่อนที่ และ เมธานอล ในการทดสอบหาปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ได้

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) ของการใช้ตัวทำละลายในสารมาตรฐานเตตราซัยคลินและอนุพันธ์

สารประกอบ	ค่าเฉลี่ยสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r)	
	เฟสเคลื่อนที่	เมธานอล
ออกซีเตตราซัยคลิน	0.99906	0.99814
เตตราซัยคลิน	0.99989	0.99832
คลอร์เตตราซัยคลิน	0.99910	0.99873

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมการทดสอบสารมาตรฐานเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ด้วยการละลายตัวอย่างกุ้งในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง และละลายสารละลายมาตรฐานด้วยเฟสเคลื่อนที่ แสดงดังภาพที่ 4.5a ส่งผลให้พีกที่ได้มีลักษณะสูง (peak high) และสมมาตร เนื่องมาจากสภาวะการละลายตัวอย่างด้วยเฟสเคลื่อนที่ ที่ประกอบด้วย กรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์ : เมธานอล : อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 83:5:12 กับสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ที่พาสารเข้าระบบ HPLC เป็นสภาวะเดียวกัน และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วมากในสัดส่วนที่น้อย ส่วนการละลายตัวอย่างกุ้งในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง และละลายสารละลายมาตรฐานด้วยเฟสเคลื่อนที่ ด้วยเมธานอล ให้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 4.5b จะให้พีกมีลักษณะที่เตี้ย เนื่องมาจากมีการละลายด้วยเมธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ และเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมาก จึงทำให้พีกมีลักษณะเตี้ย และมีฐานพีกที่กว้างกว่า ทำให้ไม่สามารถมองเห็นพีกที่ชัดเจน ดังนั้นควรใช้ตัวทำละลายที่เป็นชนิดเดียวกันสำหรับสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง ตัวทำละลายนั้นควรจะเป็นเฟสเคลื่อนที่หรือตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่าหรือเท่ากับเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้ลักษณะของพีกที่สูง และให้ผลการทดสอบที่ดีในเชิงปริมาณ และคุณภาพ (ศรัณญา และศิริพร,2550)



ภาพที่ 4.5 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ด้วยการละลายสารมาตรฐานและตัวอย่างกุ้งด้วยเฟสเคลื่อนที่ (a) และการละลายสารมาตรฐานด้วยเฟสเคลื่อนที่และตัวอย่างกุ้งด้วยเมธานอล (b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบผลการใช้ตัวทำละลายในสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างกุ้งด้วยเฟสเคลื่อนที่และเมธานอล เพื่อหาค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารประกอบเตตราซัยคลิน สามารถแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่4.5 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้ง

สภาวะ	ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	ตัวทำละลาย		ค่าเฉลี่ยการกลับคืนของสาร(ร้อยละ)		
		เฟสเคลื่อนที่	เมธานอล	ออกซีเตตราซัยคลิน	เตตราซัยคลิน	คลอร์เตตราซัยคลิน
1	สารละลายมาตรฐาน	/		107±2[c]	90±4[c]	89±8[c]
	ตัวอย่างกุ้ง	/				
2	สารละลายมาตรฐาน	/		72±6[d]	36±4[d]	47±5[d]
	ตัวอย่างกุ้ง		/			
3	สารละลายมาตรฐาน		/	248±44[b]	110±18[b]	114±24[b]
	ตัวอย่างกุ้ง		/			
4	สารละลายมาตรฐาน		/	371±45[a]	290±30[a]	209±35[a]
	ตัวอย่างกุ้ง	/				

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดสอบค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสาร ในขั้นตอนการละลายตัวอย่างกุ้งในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง ในสภาวะที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งความถูกต้องในการทดสอบหาปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ ตามข้อแนะนำของ Codex Alimentarius Commission (2002) ควรอยู่ระหว่างร้อยละ 110-70 จากตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าการละลายสารละลายมาตรฐานผสม และตัวอย่างกุ้งด้วยเฟสเคลื่อนที่ มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และ คลอร์เตตราซัยคลินเท่ากับ 107, 90 และ 89 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสาร ดังกล่าวเป็นที่ยอมรับว่ามีความเหมาะสมในการทดสอบสารในเชิงคุณภาพและปริมาณ และตรงตามข้อแนะนำของ Codex ส่วนการละลายสารมาตรฐานผสมและตัวอย่างกุ้งด้วยเมธานอล จะมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนอยู่ระหว่าง 110 - 248 ซึ่งเป็นค่ามากกว่าข้อแนะนำ เนื่องมาจากการละลายด้วยเมธานอลให้สัญญาณของพีกที่ต่ำและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีพื้นที่ฐานพีกที่กว้าง เมื่อทดสอบผลในเชิงปริมาณจะมีค่ามากกว่าความเป็นจริง ส่วนการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการละลายสารมาตรฐานและตัวอย่างกุ้งหรือใช้เมธานอลเพียงอย่างเดียวจะให้ผลที่ต่ำกว่า หรือสูงกว่าข้อแนะนำ เนื่องมาจากการละลายสารมาตรฐานและตัวอย่างละลายอยู่ต่างสภาวะกัน ดังนั้นการละลายสารมาตรฐานและตัวอย่างกุ้งด้วยเฟสเคลื่อนที่จะให้ค่าเฉลี่ยการคืนกลับของสารออกซีเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ได้ดีที่สุด

4.3 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบหาปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้งด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทรกราฟฟีสมรรถนะสูง (method validation)

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบตามคุณลักษณะเฉพาะของวิธีการทดสอบ (method performance characteristics) ทั้ง 5 คุณลักษณะได้แก่ ช่วงของการทดสอบ (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ความแม่นของการทดสอบ (accuracy) และความเที่ยงของการทดสอบ (precision) สามารถสรุปดังตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 คุณลักษณะที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบ

พารามิเตอร์	ออกซีเตตราซัยคลิน	เตตราซัยคลิน	คลอร์เตตราซัยคลิน
- ช่วงการทดสอบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	0.04- 0.32	0.05- 0.32	0.14- 0.32
- ความเป็นเส้นตรง ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์	0.9982	0.9991	0.9977
- ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	0.012	0.015	0.05
- ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	0.05	0.06	0.15
- ความแม่น (ร้อยละ)	82 (0.04) 103 (0.2) 107 (0.28)	81 (0.05) 81 (0.20) 88 (0.28)	81 (0.14) 88 (0.20) 91 (0.28)
- ความเที่ยง	0.34 (0.04) 0.12 (0.2) 0.22 (0.28)	0.27 (0.05) 0.25 (0.20) 0.36 (0.28)	0.46 (0.14) 0.48 (0.20) 0.51 (0.28)

หมายเหตุ : (.....) ความเข้มข้นที่เติมในตัวอย่างมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

4.3.1 ผลการทดสอบช่วงการทดสอบ และ ความเป็นเส้นตรง (range and linearity)

จากการทดสอบช่วงการทดสอบ และความเป็นเส้นตรงพบว่าสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.04 – 0.32 , 0.05 - 0.32 และ 0.14 – 0.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และมีค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของสารกับพื้นที่ใต้พีกมีค่า มากกว่า 0.995 ซึ่งวิธีการทดสอบที่ได้ปรับปรุงนี้ให้ช่วงความเข้มข้นของสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ อยู่ระหว่างค่าต่ำสุด และค่าสูงสุด ที่เป็นเส้นตรง และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารประกอบเตตราซัยคลิน

4.3.2 ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection , LOD) ในการทดสอบออกซีเตตราซัยคลิน, เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ในกุ้งเท่ากับ 0.012, 0.015 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งสามารถทดสอบสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ได้ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับวิธีทดสอบที่ทดสอบในเนื้อสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Cinquina และคณะ, 2003) ที่มีค่า LOD เท่ากับ 0.107, 0.121 และ 0.129 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความไว (sensitivity) ในการตรวจวัดของเครื่อง HPLC

4.3.3 ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ในการทดสอบออกซีเตตราซัยคลิน, เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ในกุ้ง โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนและค่า HORRAT แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนของสาร และ ค่า HORRAT ที่ระดับ LOQ (n=10)

ชนิดสารประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน	HORRAT
ออกซีเตตราซัยคลิน	0.05	106	0.35
เตตราซัยคลิน	0.06	91	0.42
คลอร์เตตราซัยคลิน	0.15	87	0.53

n = number of replicate

ออกซีเตตราซัยคลิน, เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน มีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 0.05, 0.06 และ0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับซึ่งสามารถทดสอบสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับวิธีทดสอบของ Cinquina และคณะ (2003) ที่ทดสอบในเนื้อสัตว์ ที่มีค่า LOQ เท่ากับ 0.11, 0.12 และ 0.13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อนำวิธีที่ปรับปรุงมาทดสอบความแม่น และความเที่ยงที่ระดับดังกล่าว พบว่าความแม่น มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 106, 91 และ 87 ตามลำดับ ตามมาตรฐานโคเด็กซ์ และความเที่ยงของการทำซ้ำ โดยพิจารณาค่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.35, 0.42 และ 0.53 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความถูกต้อง และแม่นยำสามารถนำไปพัฒนาต่อ

4.3.4 ความแม่นของการทดสอบ (accuracy)

ความแม่นของวิธีแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสาร ดังตารางที่ 4.6 พบว่า สารออกซีเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.04 , 0.20 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารเท่ากับ 82, 103 และ 107 ตามลำดับ สารเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.05 , 0.20 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารเท่ากับ 81, 81 และ 88 ตามลำดับ และ สารคลอร์เตตราซัยคลินค่าที่ระดับความเข้มข้น 0.14 , 0.20 ,0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารเท่ากับ 81, 88 และ 91 ตามลำดับ ผลความแม่นของการทดสอบ ให้ผลดีกว่าเมื่อเทียบกับวิธีทดสอบของ Cinquina และคณะ(2003) ที่ทดสอบในเนื้อสัตว์ โดยมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารเท่ากับ 82 – 90 ในช่วงความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0.05 -0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งร้อยละการกลับคืนของสารอยู่ในเกณฑ์ 70 – 110 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

4.3.5 ความเที่ยงของการทดสอบ (precision)

ความเที่ยงของวิธีแสดงด้วย HORRAT ดังตารางที่ 4.6 พบว่า สารออกซีเตตราซัยคลินค่าที่ระดับความเข้มข้น 0.04, 0.2 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.34, 0.12 และ 0.22 ตามลำดับ สารเตตราซัยคลินค่าที่ระดับความเข้มข้น 0.05 , 0.2 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.27, 0.25 และ 0.36 ตามลำดับ และ สารคลอร์เตตราซัยคลินค่าที่ระดับความเข้มข้น 0.14 , 0.2 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.46, 0.48 และ 0.51 ตามลำดับ ซึ่งค่า HORRAT target มีค่าน้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ในกุ้งที่ดัดแปลงจากวิธีของ Cinquina และคณะ (2003) พบว่า เป็นวิธีการทดสอบที่มีความถูกต้องโดยผ่านเกณฑ์การประเมินตามมาตรฐานโคเด็กซ์ สามารถนำวิธีทดสอบไปประยุกต์ใช้ในงานทดสอบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. อัตราส่วนที่เหมาะสมในการใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกอีลูชัน ของการแยกสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ ได้แก่ การใช้อัตราส่วนของกรดออกซาลิก : เมธานอล : อะซีโตไนไตรล์ เท่ากับ 83:5:12 โดยให้ค่าความสามารถในการแยกพีกออกจากกัน ของสารประกอบเตตราซัยคลิน และอนุพันธ์ มีค่ามากกว่า 2 และสามารถแยกพีกได้อย่างชัดเจน แต่ใช้เวลาในการทดสอบนานถึง 18 นาที

2. สภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบเชิงคุณภาพสารประกอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน ด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง ได้แก่ การใช้สภาวะแบบเกรเดียนท์อีลูชัน สามารถแยกพีกทั้ง 3 ชนิด ได้ชัดเจนกว่าการใช้สภาวะแบบไอโซเครติกอีลูชัน และใช้ระยะเวลาในการทดสอบสั้นกว่าสภาวะไอโซเครติกอีลูชันแบบดัดแปลง ทำให้สามารถลดการใช้สารเคมี และเวลาในการปฏิบัติงานได้

3. การละลายตัวอย่างในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่าง และละลายสารละลายมาตรฐานเพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ในกุ้งด้วยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย กรดออกซาลิก 0.01 โมลาร์ : เมธานอล : อะซีโตไนไตรล์ (83:5:12) ให้ผลการทดสอบในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณมีความถูกต้องและมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารในช่วง 89 – 107

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบออกซีเตตราซัยคลิน มีความเข้มข้นในช่วงการทดสอบ 0.04 - 0.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและมีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบ ($r = 0.9982$) มีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ เท่ากับ 0.012 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบ ตรวจพบได้เชิงปริมาณและคุณภาพ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความแม่นของวิธีมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารอยู่ในช่วง 82 – 107 และความเที่ยงของวิธีโดยที่ HORRAT อยู่ในช่วง 0.12 – 0.34

5. เตตราซัยคลินมีความเข้มข้นในช่วงการทดสอบ 0.05 - 0.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและมีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบ ($r = 0.9991$) มีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพเท่ากับ 0.015 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงปริมาณและคุณภาพ เท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความแม่นของวิธี มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารอยู่ในช่วง 81 – 88 และความเที่ยงของวิธีโดยที่ HORRAT อยู่ในช่วง 0.25–0.36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. คลอร์เตตราซัยคลิน มีความเข้มข้นช่วงการทดสอบ 0.14 - 0.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบ (r = 0.9977) มีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบ ตรวจพบได้เชิงปริมาณ และคุณภาพเท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความแม่นของวิธี มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารอยู่ในช่วง 81 – 91 และความเที่ยงของวิธีโดยที่ HORRAT อยู่ในช่วง 0.46–0.51

7. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของการปรับปรุงสภาวะการทดสอบปริมาณเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูงตามคุณลักษณะเฉพาะของวิธีดังกล่าว ให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ ตามมาตรฐานสากล

5.2 ข้อเสนอแนะ

การปรับปรุงสภาวะการทดสอบเชิงคุณภาพ และปริมาณของสารประกอบเตตราซัยคลินและอนุพันธ์ ด้วยวิธีลิคควิดโครมาโทกราฟฟีแบบสมรรถนะสูง สามารถนำไปพัฒนาให้มีความไวในการตรวจวัด โดยเปลี่ยนเทคนิคในการทดสอบเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ เช่น การตรวจวัดโดยใช้เครื่อง LC/MS หรือ LC-MS/MS เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมปศุสัตว์ 2552. **enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA** [Online]. Available : http://dld.go.th/vrd_ep/method/sub_chemical/ELISA.htm

เกศินี หลายสุทธิสาร. 2546, **ผลของยาออกซีเตตร้าซัยคลินต่อการยับยั้งแบคทีเรียในเลือด และการตกค้างของยาในเนื้อกุ้งกุลาดำ.** [Online]. Available : http://elib.fisheries.go.th/LIBCAB/DRAWERS/ARTICLE/DATA0003/00003726.PDF

ชลอ ลิ้มสุวรรณ.2543 คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. **ฐานเศรษฐกิจ,** กรุงเทพฯ. 202 หน้า

ปุษยา แสงวิรุฬห์ และ สุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิวงศ์.2543. ออกซีเตตราซัยคลินตกค้างในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็งส่งออก. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์** 42 (2),155-159.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. **แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว.** กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 123 หน้า.

เพ็ญศรี รอดมา. 2537 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้าง oxytetracycline โดยวิธี bioassay. **เอกสารประกอบคำบรรยาย.** กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

พัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2547. **โครมาโทรกราฟฟีแบบของเหลวแรงดันสูง : หลักการและการประยุกต์ใช้.** ห้างหุ้นส่วนจำกัดขอนแก่นการพิมพ์. ขอนแก่น. 329 หน้า

แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2534. **Principles and techniques of instrumental analysis.** ห้างหุ้นส่วนจำกัดชวนพิมพ์. กรุงเทพ. 886 หน้า

ศรัณญา สามเสาร์ และ ศิริพร ตั้งจิตราพิทักษ์.2550. **ผลของตัวทำ ละลายที่มีต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ,** [Online].Available : http://www.sithiphorn.com/newweb/newsletter/.pdf

สถาบันอาหาร.2552. **ข้อมูลสถิติปริมาณ และมูลค่าการส่งออก** , [Online]. Available : http://foodsafety.nfi.or.th/pdf/..

สถาบันอาหาร. 2550.**Tetracycline**, [Online]. Available : http://foodsafety.nfi.or.th/pdf/webfoodsafety/ forconsumar/Manage/anti/เตตร้าซัยคลิน. pdf .

สุดา ตัณฑวณิช และ ฉันทนา แก้วตาปี. 2540. การสำรวจยาปฏิชีวนะและการวิเคราะห์การตกค้างของยาออกซีเตตร้าซัยคลินในกุ้งกุลาดำก่อนจับในจังหวัดภูเก็ตโดย HPLC และวิธี Microbiological assay. 17 หน้า. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 25/2540.** ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งภูเก็ต.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cinquina, A.L., Longo,F., Anastasi,G., Giannetti,L. and Cozzani. R. 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.**1-12.

EURACHEM GUIDE: **The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide Method Validation and Related Topics,** 1998.

Eliangiringa, K., Chambuso, M., and Kitwala, J. 2008. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polym er reversed-phase column . **J. Food Chemistry, 107,** 1289- 1293.

Fish Inspection and Quality Control Division Department of Fisheries. April 2006. **Chemical Reference Criteria for Fishery Product. Revision III**. Thailand .

Koesukwiwat, U., Jayanta, S., and Leepipatpiboon, N. 2006. Validation of a liquid chromatography – mass spectrometry multi – residue method for the simultaneous determination of Sulfonamides, Tetracycline and Pyrimethamine in milk. **J. Chromatography A,** 1140, 147-156.

Koesukwiwat, U., Jayanta, S., and Leepipatpiboon, N. 2006. Solid phase extraction for multiresidue determination of Sulfonamides, Tetracycline and Pyrimethamine in Bovine ' s milk. **J. Chromatography A,** 1149, 102-111.

Micromass UK Limited. 2002. **The Quattro Ultima Pt User ' s Guide.** United Kingdom.

Nelson M.L., November, 1998. CHEMICAL AND BIOLOGICAL DYNAMICS., **ADV DENT RES**. Volume 12, 5- 11.

Oasis Applications Notebook 2003 : **Agrochemical, Food, Pharmaceuticals,** Forensics, and Environental, Water, Milford, MA, USA.

Oka, H., Y. Ito. and Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **J. Chromatography A,** 882, 109-133.

Stavros Kromidas. 2000. **Practical Problem Solving in HPLC**. Germany : Wiley – VCH.

Snyder, L.R., Glajch, J.L. and Kirkland, J.J. 1997. **Practical HPLC Method and Development.** 2 edition. New York : John Wiley & Sons, Inc.

The united States Phamacopeial Convention. 2006. **United States Phamacopeia 25 – National Formular 201**. USA : Rockville,MD.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง (linearity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

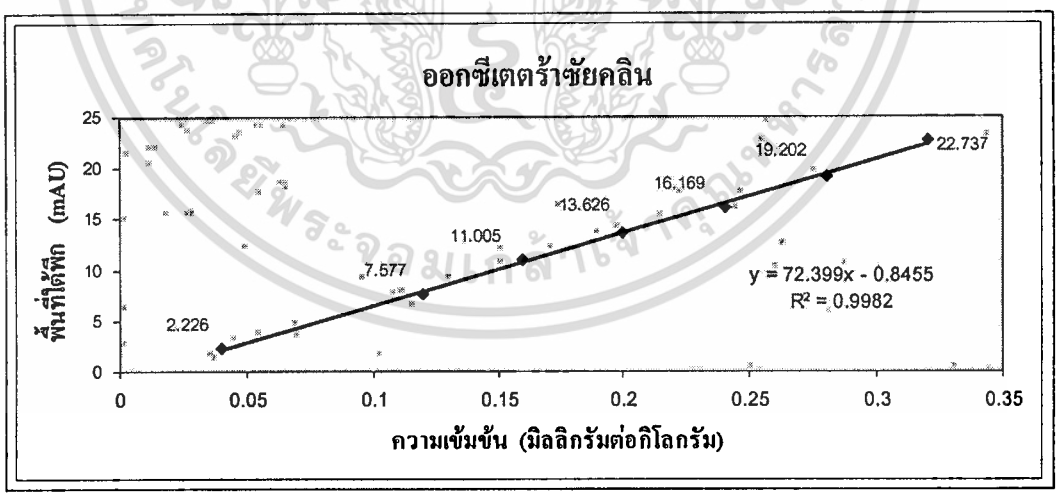
การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง (linearity)

ก.1 การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน

ตารางที่ ก.1 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน (n =3)

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานออกซีเตตาซัยคลิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0.04	2.226
0.12	7.577
0.16	11.005
0.20	13.626
0.24	16.169
0.28	19.202
0.32	22.737

หมายเหตุ : n = จำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน

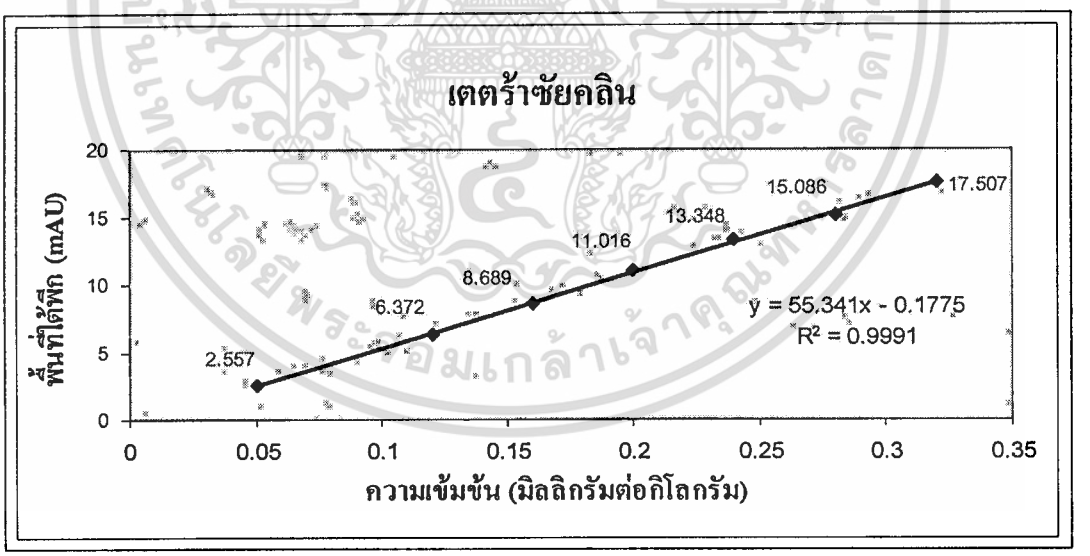
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน

ตารางที่ ก.2 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน (n =3)

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0.05	2.557
0.12	6.372
0.16	8.689
0.20	11.016
0.24	13.348
0.28	15.086
0.32	17.507

หมายเหตุ : n = จำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น



ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน

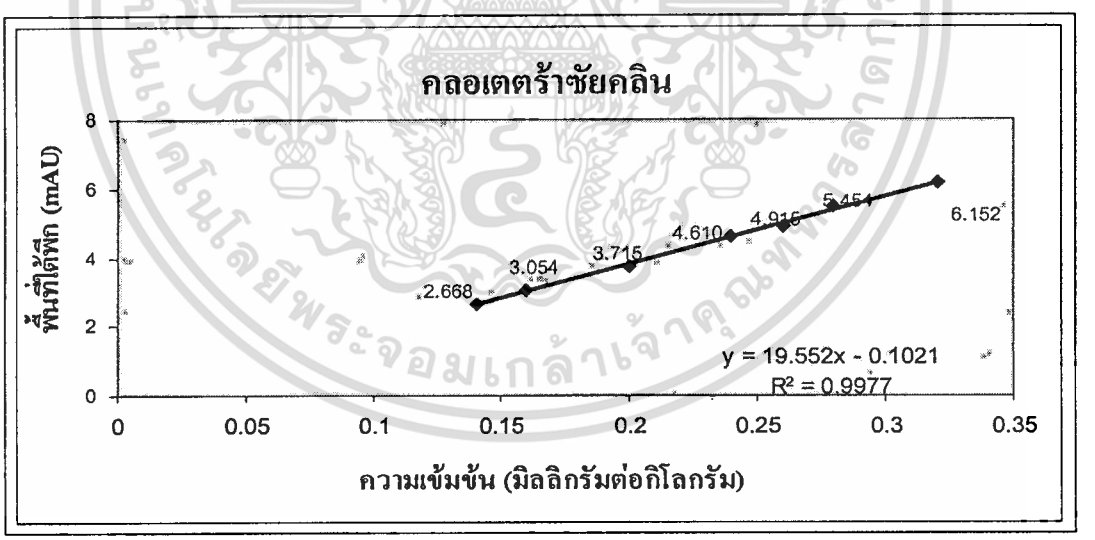
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานคลอร์เตตราซัยคลิน

ตารางที่ ก.3 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานคลอร์เตตราซัยคลิน (n =3)

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานคลอร์เตตราซัยคลิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0.14	2.668
0.16	3.054
0.20	3.715
0.25	4.610
0.26	4.915
0.28	5.454
0.32	6.152

หมายเหตุ : n = จำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น



ภาพที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานคลอร์เตตราซัยคลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การคำนวณค่า LOD และประมาณค่า LOQ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่า LOD และประมาณค่า LOQ

ข.1 การคำนวณค่า LOD และประมาณค่า LOQ สารออกซีเตตราซัยคลิน

การหาปริมาณ LODโดยทดสอบตัวอย่างกุ้ง พบว่าในตัวอย่างกุ้งไม่พบสารออกซีเตตราซัยคลิน จึงเติมสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลินลงในตัวอย่าง 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด (signal to noise) มีค่ามากกว่า 3 และทดสอบตัวอย่างซ้ำ ที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณหาค่า LOD = 3SD และประมาณค่า LOQ = 10SD ดังตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข.1 ผลการคำนวณค่า LOD และ ประมาณค่า LOQ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน

จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกุ้ง	น้ำหนักตัวอย่าง	ออกซีเตตราซัยคลิน	
			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	Signal to noise
1	0	5.01	0.039	5.1
2	0	5.02	0.044	5.0
3	0	5.01	0.042	7.4
4	0	5.01	0.034	4.2
5	0	5.01	0.042	6.6
6	0	5.02	0.042	5.2
7	0	5.01	0.043	5.4
8	0	5.01	0.035	6.1
9	0	5.01	0.047	6.7
10	0	5.02	0.040	6.8
ค่าเฉลี่ย			0.041	
SD			0.004	
3SD= LOD			0.012	
10SD=LOQ			0.04	

ออกซีเตตราซัยคลินมีค่า LOD เท่ากับ 0.012 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การประมาณค่า LOQ เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (นำความเข้มข้น LOQ เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินด้วยความแม่น และความเที่ยง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การคำนวณค่า LOD และประมาณค่า LOQ สารเตตราซัยคลิน

การหาปริมาณ LODโดยทดสอบตัวอย่างกุ้ง พบว่าในตัวอย่างกุ้งไม่พบสารเตตราซัยคลิน จึงเติมสารมาตรฐานเตตราซัยคลินลงในตัวอย่าง 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด มีค่ามากกว่า 3 และทดสอบตัวอย่างซ้ำ ที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณหาค่า LOD = 3SD และประมาณค่า LOQ = 10SD ดังตารางที่ ข.2

ตารางที่ ข.2 ผลการคำนวณค่า LOD และ ประมาณค่า LOQ ของสารเตตราซัยคลิน

จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกุ้ง	น้ำหนักตัวอย่าง	เตตราซัยคลิน	
			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	Signal to noise
1	0	5.01	0.021	4.2
2	0	5.02	0.024	3.0
3	0	5.01	0.019	5.4
4	0	5.01	0.017	3.5
5	0	5.01	0.016	3.8
6	0	5.02	0.010	3.3
7	0	5.01	0.018	3.7
8	0	5.01	0.013	3.4
9	0	5.01	0.016	3.3
10	0	5.02	0.026	4.6
ค่าเฉลี่ย			0.018	
SD			0.005	
3SD= LOD			0.015	
10SD=LOQ			0.05	

จากตาราง เตตราซัยคลินมีค่า LOD เท่ากับ 0.015 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การประมาณค่า LOQ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (นำความเข้มข้น LOQ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินด้วยความแม่น และความเที่ยง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3 การคำนวณค่า LOD และประมาณค่า LOQ สารคลอร์เตตราซัยคลิน

การหาปริมาณ LODโดยทดสอบตัวอย่างกุ้ง พบว่าในตัวอย่างกุ้งไม่พบสารคลอร์เตตราซัยคลิน จึงเติมสารมาตรฐานคลอร์เตตราซัยคลินลงในตัวอย่าง 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด มีค่ามากกว่า และทดสอบตัวอย่างซ้ำที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณหาค่า LOD = 3SD และประมาณค่า LOQ = 10SD ดังตารางที่ ข.3

ตารางที่ ข.3 ผลการคำนวณค่า LOD และ ประมาณค่า LOQ ของสารคลอร์เตตราซัยคลิน

จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกุ้ง	น้ำหนักตัวอย่าง	คลอร์เตตราซัยคลิน	
			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	signal to noise
1	0	5.01	0.130	6.6
2	0	5.01	0.128	3.7
3	0	5.01	0.125	5.3
4	0	5.01	0.148	3.9
5	0	5.01	0.109	5.5
6	0	5.02	0.114	3.6
7	0	5.01	0.130	3.4
8	0	5.01	0.118	6.5
9	0	5.01	0.096	3.6
10	0	5.02	0.121	3.5
ค่าเฉลี่ย			0.122	
SD			0.014	
3SD= LOD			0.05	
10SD=LOQ			0.14	

คลอร์เตตราซัยคลินมีค่า LOD เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การประมาณค่า LOQ เท่ากับ 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (นำความเข้มข้น LOQ เท่ากับ 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินด้วย ความแม่น/ความเที่ยง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณค่าความแม่น (accuracy) และความเที่ยง(precision) ที่ระดับ LOQ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่าความแม่น และความเที่ยง LOQ

ค.1 การคำนวณค่าความแม่น และความเที่ยง LOQ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารออกซีเตตราซัยคลิน

เนื่องจากความเข้มข้น LOQ เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมประเมินด้วยความแม่นและความเที่ยง ไม่ผ่านเกณฑ์จึงได้นำความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินด้วยความแม่นและความเที่ยง ดังตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 การคำนวณค่าความแม่น และความเที่ยงของสารออกซีเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	ออกซีเตตราซัยคลิน 0.05 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน
1	5.01	0.049	98
2	5.02	0.049	98
3	5.01	0.048	96
4	5.00	0.055	109
5	5.01	0.054	108
6	5.01	0.056	112
7	5.00	0.054	108
8	5.01	0.055	109
9	5.01	0.055	110
10	5.00	0.055	110
N=	10		
Ave		0.053	106
SD		0.0030	6.05
%RSD		5.72	5.72
Horwitz Equation (RSD_r)		16.43	
HORRAT target		0.35	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตาราง ออกซีเตตราซัยคลินมีค่า LOQ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความแม่น พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนมีค่าเฉลี่ย 106 และเมื่อประเมินความเที่ยง พบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.35 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

ค.2 การคำนวณค่าความแม่น และความเที่ยง LOQ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเตตราซัยคลิน

เนื่องจากความเข้มข้น LOQ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมประเมินด้วยความแม่นและความเที่ยงไม่ผ่านเกณฑ์จึงได้นำความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมาประเมินด้วยความแม่นและความเที่ยงดังตารางที่ ค.2

ตารางที่ ค.2 การคำนวณค่าความแม่น และความเที่ยงของสารเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	เตตราซัยคลิน 0.06 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน
1	5.01	0.056	93
2	5.02	0.055	91
3	5.01	0.056	93
4	5.00	0.049	82
5	5.01	0.057	95
6	5.01	0.047	78
7	5.00	0.055	92
8	5.01	0.059	99
9	5.01	0.056	93
10	5.00	0.057	95
N=	10		
Ave		0.055	91
SD		0.0037	6.24
%RSD		6.85	6.85
Horwitz Equation (RSD_r)		16.36	
HORRAT target		0.42	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตตราซัยคลินมีค่า LOQ เท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความแม่นพบว่า ค่าร้อยละการกลับคืนมีค่าเฉลี่ย 91 และเมื่อประเมินความเที่ยงพบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.42 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

ค.3 การคำนวณค่าความแม่น และความเที่ยง LOQ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารคลอร์เตตราซัยคลิน

นำความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินด้วยความแม่นและความเที่ยง ดังตารางที่ ค.3

ตารางที่ ค.3 แสดงการคำนวณค่าความแม่น และความเที่ยงของสารคลอร์เตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	คลอร์เตตราซัยคลิน 0.15 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน
1	5.01	0.125	83
2	5.02	0.117	78
3	5.01	0.137	91
4	5.00	0.128	85
5	5.01	0.119	80
6	5.01	0.137	91
7	5.00	0.140	93
8	5.01	0.139	93
9	5.01	0.142	95
10	5.00	0.118	79
N=	10		
Ave		0.130	87
SD		0.0100	6.65
%RSD		7.67	
Horwitz Equation (RSD_r)		14.35	
HORRAT target		0.53	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตาราง คลอร์เตตราซัยคลินมีค่า LOQ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความแม่น พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนมีค่าเฉลี่ย 106 และประเมินความเที่ยง พบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.35 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่าความแม่น (accuracy) ของวิธีทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่าความแม่นวิธีทดสอบ

ค่าความแม่นคือการแสดงความใกล้ของค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบค่าความถูกต้องคำนวณได้จากร้อยละการกลับคืน

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{(C1-C) \times 100}{C3}$$

C1 คือ ปริมาณสารที่ต้องการวัดในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C2 คือ ปริมาณสารที่ต้องการวัดในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน

C3 คือ ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม

เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนของสารตามมาตรฐานโคเด็กซ์ ได้กำหนดงานด้านสารตกค้างจากยาสัตว์ตกค้างในอาหาร และยาฆ่าแมลง ดังตารางที่ ง.1

ตารางที่ ง.1 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐานโคเด็กซ์ มีเกณฑ์มาตรฐานดังนี้

ความเข้มข้น	ร้อยละการกลับคืน
< 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม	50-120
> 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ≤ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	60-120
> 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม≤ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70-120
> 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม< 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70-110
> 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70-110

ที่มา : Codex Alimentarius Commission (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.1 การคำนวณค่าความแม่นสารออกซีเตตราซัยคลิน 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ ง.2 การคำนวณค่าความแม่นของการทดสอบ ของสารออกซีเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	ออกซีเตตราซัยคลิน 0.04 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน
1	5.01	0.038	94
2	5.02	0.034	86
3	5.01	0.032	80
4	5.00	0.032	81
5	5.01	0.032	79
6	5.01	0.032	80
7	5.00	0.031	79
8	5.01	0.032	79
9	5.01	0.032	80
10	5.00	0.032	79
N=	10		
Ave		0.033	82
SD		0.0019	4.87

ออกซีเตตราซัยคลินระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความแม่น พบว่า ร้อยละการกลับคืนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.2 การคำนวณค่าความแม่นสารเตตราซัยคลิน 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ ง.3 การคำนวณค่าความแม่นของการทดสอบ ของสารเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	เตตราซัยคลิน 0.05 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน
1	5.01	0.038	77
2	5.02	0.041	83
3	5.01	0.039	78
4	5.00	0.043	86
5	5.01	0.043	87
6	5.01	0.038	77
7	5.00	0.039	79
8	5.01	0.041	81
9	5.01	0.041	82
10	5.00	0.042	84
N=	10		
Ave		0.041	81
SD		0.0019	3.75

เตตราซัยคลินระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความแม่น พบว่า ร้อยละการกลับคืนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 81 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.3 การคำนวณค่าความแม่น คลอร์เตตราซัยคลิน 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ ง.4 การคำนวณค่าความแม่นของการทดสอบ ของสารคลอร์เตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	คลอร์เตตราซัยคลิน 0.14 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน
1	5.01	0.138	99
2	5.02	0.125	89
3	5.01	0.114	82
4	5.00	0.125	89
5	5.01	0.119	85
6	5.01	0.125	89
7	5.00	0.118	84
8	5.01	0.134	96
9	5.01	0.113	81
10	5.00	0.132	94
N=	10		10
Ave		0.1243	89
SD		0.0083	5.96

คลอร์เตตราซัยคลินระดับความเข้มข้น 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความแม่น พบว่า ร้อยละการกลับคืนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 89 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.4 การคำนวณค่าความแม่นออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ ง.5 การคำนวณค่าความแม่นของการทดสอบ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	ออกซีเตตราซัยคลิน 0.20 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		เตตราซัยคลิน 0.20 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		คลอร์เตตราซัยคลิน 0.20 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน
1	5.01	0.208	104	0.160	80	0.158	79
2	5.02	0.200	100	0.159	79	0.200	100
3	5.01	0.203	101	0.175	88	0.183	91
4	5.00	0.207	103	0.159	80	0.170	85
5	5.01	0.208	104	0.158	79	0.185	92
6	5.01	0.210	105	0.163	81	0.171	86
7	5.00	0.208	104	0.155	77	0.177	89
8	5.01	0.211	106	0.166	83	0.171	85
9	5.01	0.205	103	0.161	81	0.181	90
10	5.00	0.207	104	0.162	81	0.167	83
N=	10		10		10		10
Ave		0.207	103	0.162	81	0.176	88
SD		0.0034	1.68	0.0056	2.79	0.0117	5.83

ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความแม่น พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนมีเท่ากับ 103, 81 และ 88 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.5 การคำนวณค่าความแม่นออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ ง.6 การคำนวณค่าความแม่นของการทดสอบ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	ออกซีเตตราซัยคลิน 0.28 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		เตตราซัยคลิน 0.28 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		คลอร์เตตราซัยคลิน 0.28 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน
1	5.01	0.278	99	0.223	80	0.224	80
2	5.02	0.300	107	0.241	86	0.246	88
3	5.01	0.306	109	0.238	85	0.247	88
4	5.00	0.305	109	0.261	93	0.275	98
5	5.01	0.303	108	0.242	86	0.251	90
6	5.01	0.303	108	0.251	90	0.259	93
7	5.00	0.305	109	0.248	89	0.243	87
8	5.01	0.296	106	0.264	94	0.274	98
9	5.01	0.295	105	0.250	89	0.245	88
10	5.00	0.302	108	0.251	90	0.275	98
N=	10		10		10		10
Ave		0.299	107	0.247	88	0.254	91
SD		0.0085	3.02	0.0116	4.15	0.0168	6.01

ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความแม่น พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนมีเท่ากับ 107, 88 และ 91 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การคำนวณค่าความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่าความเที่ยงวิธีทดสอบ

ความเที่ยงเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด

จ.1 การคำนวณค่าความเที่ยงสารออกซีเตตราซัยคลิน 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ จ.1 การคำนวณค่าความเที่ยงของการทดสอบสารออกซีเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	ออกซีเตตราซัยคลิน 0.04 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1	5.01	0.038
2	5.02	0.034
3	5.01	0.032
4	5.00	0.032
5	5.01	0.032
6	5.01	0.032
7	5.00	0.031
8	5.01	0.032
9	5.01	0.032
10	5.00	0.032
N=	10	
Ave		0.033
SD		0.0019
%RSD		5.97
Horwitz Equation (RSD_R)		17.67
HORRAT target		0.34

ออกซีเตตราซัยคลินระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินด้วยความเที่ยง พบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.34 อยู่ในเกณฑ์น้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.2 การคำนวณความเที่ยง สารเตตราซัยคลิน 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ จ.2 การคำนวณค่าความเที่ยงของการทดสอบ ของสารเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.05มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	เตตราซัยคลิน 0.05 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1	5.01	0.038
2	5.02	0.041
3	5.01	0.039
4	5.00	0.043
5	5.01	0.043
6	5.01	0.038
7	5.00	0.039
8	5.01	0.041
9	5.01	0.041
10	5.00	0.042
N=	10	
Ave		0.041
SD		0.0019
%RSD		4.60
Horwitz Equation (RSD_r)		17.10
HORRAT target		0.27

เตตราซัยคลินระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความเที่ยง พบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.27 อยู่ในเกณฑ์น้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.3 การคำนวณค่าความเที่ยงคลอร์เตตราซัยคลิน 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ จ.3 การคำนวณค่าความเที่ยงของการทดสอบสารคลอร์เตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	คลอร์เตตราซัยคลิน 0.14 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1	5.01	0.138
2	5.02	0.125
3	5.01	0.114
4	5.00	0.125
5	5.01	0.119
6	5.01	0.125
7	5.00	0.118
8	5.01	0.134
9	5.01	0.113
10	5.00	0.132
N=	10	
Ave		0.1243
SD		0.0083
%RSD		6.71
Horwitz Equation (RSD_r)		14.45
HORRAT target		0.46

คลอร์เตตราซัยคลินระดับความเข้มข้น 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความเที่ยง พบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.46 อยู่ในเกณฑ์น้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.4 การคำนวณค่าความเที่ยง ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ จ.4 การคำนวณค่าความเที่ยงของการทดสอบ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	ออกซีเตตราซัยคลิน 0.20 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	เตตราซัยคลิน 0.20 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	คลอร์เตตราซัยคลิน 0.20 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1	5.01	0.208	0.160	0.158
2	5.02	0.200	0.159	0.200
3	5.01	0.203	0.175	0.183
4	5.00	0.207	0.159	0.170
5	5.01	0.208	0.158	0.185
6	5.01	0.210	0.163	0.171
7	5.00	0.208	0.155	0.177
8	5.01	0.211	0.166	0.171
9	5.01	0.205	0.161	0.181
10	5.00	0.207	0.162	0.167
N=	10			
Ave		0.207	0.162	0.176
SD		0.0034	0.0056	0.0117
%RSD		1.62	3.45	6.62
Horwitz Equation (RSD_r)		13.39	13.89	13.71
HORRAT target		0.12	0.25	0.48

ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลินระดับความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความเที่ยง พบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.12, 0.25 และ 0.48 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์น้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ จ. 5 การคำนวณค่าความเที่ยงของการทดสอบ ของสารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักตัวอย่าง	ออกซีเตตราซัยคลิน 0.28 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	เตตราซัยคลิน 0.28 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	คลอร์เตตราซัยคลิน 0.28 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1	5.01	0.278	0.223	0.224
2	5.02	0.300	0.241	0.246
3	5.01	0.306	0.238	0.247
4	5.00	0.305	0.261	0.275
5	5.01	0.303	0.242	0.251
6	5.01	0.303	0.251	0.259
7	5.00	0.305	0.248	0.243
8	5.01	0.296	0.264	0.274
9	5.01	0.295	0.250	0.245
10	5.00	0.302	0.251	0.275
N=	10			
Ave		0.299	0.247	0.254
SD		0.0085	0.0116	0.0168
%RSD		2.82	4.70	6.63
Horwitz Equation (RSD_r)		12.66	13.03	12.98
HORRAT target		0.22	0.36	0.51

ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอร์เตตราซัยคลินระดับความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินด้วยความเที่ยง พบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.22, 0.36 และ 0.51 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์น้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนภาวรรณ ตุ้มสังข์ทอง
วัน เดือน ปีเกิด	29 กรกฎาคม 2521 ที่จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	2543 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย
	2552 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประวัติการทำงาน	2547-ปัจจุบัน บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สำนักงานสาขาสมุทรสาคร
ประสบการณ์	- การใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้าง
	- การจัดทำเอกสารตามระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ISO /IEC 17025 : 2005
	- การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบอาหารทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้