การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในน้ำผึ้ง ในเขตภาคเหนือของไทยโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์
สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์

ชื่อเรื่อง

การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในน้ำผึ้ง
ในเขตภาคเหนือของไทยโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

โดย

นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....
(อาจารย์ ดร.สุภาพร แสงศรีจันทร์)
วันที่ 15 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 51

กรรมการที่ปรึกษา .....
(อาจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล)
วันที่ 15 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 51

กรรมการที่ปรึกษา .....
(อาจารย์ ดร.ภูสิต ปุกมณี)
วันที่ 15 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 51

กรรมการที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณี คงดี)
วันที่ 15 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 51

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร .....
(อาจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล)
วันที่ 15 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 51

สำนักงานบัณฑิตศึกษารับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)
ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา
วันที่ 15 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 2551

ชื่อเรื่อง การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในน้ำผึ้งในเขตภาคเหนือของไทยโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ชื่อผู้เขียน นายนรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์

ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.สุภาพร แสงศรีจันทร์

บทคัดย่อ

วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลินที่ตกค้างในน้ำผึ้ง การแยกออกซีเตตราซัยคลิน ด็อกซีซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ด้วยเฟสคงที่ชนิดคาร์บอน 8 และตัวพาของเหลวผสมระหว่าง 50% เมธานอล และสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ประกอบด้วยไดโซเดียมอีดีทีเอ และแคลเซียมคลอไรด์ ที่พีเอชเท่ากับ 8.10 ตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 518 นาโนเมตร (393 นาโนเมตรสำหรับการกระตุ้น) ใช้เวลาวิเคราะห์ 20 นาที จากวิธีดังกล่าวพบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีค่าความเป็นเส้นตรงสูง (สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995) ในช่วงความเข้มข้น 5–1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างน้ำผึ้งถูกทำการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่พีเอชเท่ากับ 4.0 หลังจากนั้นสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB จากวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน แต่ไม่สามารถตรวจวัดด็อกซีซัยคลินได้ ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัดของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน เท่ากับ 3.39 0.30 และ 4.68 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ ของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน เท่ากับ 11.30 1.00 และ 15.60 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ร้อยละของการกลับคืน ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ที่เติมในน้ำผึ้ง ที่ระดับความเข้มข้น 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าค่าร้อยละของการกลับคืนสูงกว่า 80% ของทุกสาร วิธีการดังกล่าวสามารถนำไปตรวจวัดคุณภาพของตัวอย่างน้ำผึ้งจำนวน 5 ยี่ห้อที่วางขายตามท้องตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ได้

Title	Determination of Tetracycline Residues in Honey Samples Collected from Northern Thailand by High Performance Liquid Chromatography
Author	Mr. Narin Toakaenchan
Degree of	Master of Science in Applied Chemistry
Advisory Committee Chairperson	Dr. Supaporn Sangsrichan

ABSTRACT

A high performance liquid chromatography method utilizing fluorescence detection was developed to determine tetracycline residues in honey. The separation of four tetracycline residues; oxytetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline, was observed on a reverse-phase C_8 column with a gradient elution. This mobile phase system consisted of 50% (v/v) methanol and 25 mM sodium acetate buffer which contained disodium ethylenediaminetetraacetate and calcium chloride with pH of 8.10. Fluorescence detection was observed at 518 nm (excitation wavelength at 393 nm) with analysis time of 20 minutes. Results showed that standard calibration curves for four tetracycline residues showed good linearities ($r^2 > 0.995$) in concentration range of 5-1000 ng/mL. For honey sample extraction, McIlvaine buffer with pH of 4.0 was used followed by HLB cartridge extraction. The proposed analytical method was able to analyze the presence of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline but not for doxycycline. The limit of detections (LODs) were found to be equivalent to 3.39, 0.30 and 4.68 μg/kg, respectively, while the quantification of detections (LOQs) were 11.30, 1.00 and 15.60 μg/kg for oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline, respectively. The recoveries of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline from spiked samples at 50, 100 and 200 μg/kg levels, were higher than 80% for all compounds. This analytical method was then successfully applied to evaluate the quality of 5 brands of honey commercially available in Chiang Mai markets.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณท่าน อาจารย์ ดร.สุภาพร แสงศรีจันทร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ ให้คำปรึกษา และคำแนะนำ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ลงด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณี คงดี และ อาจารย์ ดร.ภูสิต ปุกมณี ที่ช่วยแนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิจัย พร้อมทั้งตรวจสอบแก้ไขจนกระทั่งสำเร็จเป็นวิทยานิพนธ์อย่างสมบรูณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุนันทา วงกานต์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการร่วมเป็นประธานคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชา คณาจารย์ และบุคลากรภาควิชาเคมีทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ นอกจากนี้ ข้าพเจ้าขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี-มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สัญญาเลขที่ MRG-WII505S057 และทุนสนับสนุนของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการวิจัยครั้งนี้

ท้ายสุดนี้ขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยสนับสนุนทั้งด้านกำลังทรัพย์ กำลังใจที่ดีเสมอมา ขอขอบคุณญาติผู้ใหญ่ทุกท่านในครอบครัว เพื่อนและน้องที่คอยเป็นกำลังใจตลอดการศึกษา ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์

ธันวาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(10)
สารบัญภาพผนวก	(12)
อักษรย่อและสัญลักษณ์	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการศึกษา	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	6
น้ำผึ้งและองค์ประกอบ	6
ยาปฏิชีวนะ	8
มาตรฐานและข้อกำหนดของยาปฏิชีวนะในอาหาร	11
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	13
ฟลูออเรสเซนซ์	20
การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE)	21
สรุปสาระสำคัญจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง	27
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	33
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	33
วิธีการทดลอง	36

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 49

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยศึกษาตัวแปรทางกายภาพและทางเคมี 49

การศึกษาหาวิธีการสกัดกลุ่มสารเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง 65

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation of method) ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ 77

วิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง 83

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 89

สรุปผลการวิจัย 89

ข้อเสนอแนะ 91

บรรณานุกรม 92

ภาคผนวก 98

ภาคผนวก ก ตัวอย่างการคำนวณปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) 99

ภาคผนวก ข ภาพโครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลิน 101

ภาคผนวก ค ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 211) พ.ศ. 2543 เรื่องน้ำผึ้ง 109

ภาคผนวก ง ประวัติผู้วิจัย 112

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	องค์ประกอบของน้ำผึ้งทั่วไป	6
2	สมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบของน้ำผึ้งชนิดต่างๆ	7
3	ค่าคงที่การแตกตัว (p*Ka*) ของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน	9
4	ปริมาณกำหนดสารตกค้างของกลุ่มเตตราซัยคลินในอาหารประเภทต่างๆ	12
5	คุณสมบัติและการเลือกใช้ชนิดของแข็งดูดซับ	23
6	คุณสมบัติทั่วไปของเฟสของแข็งชนิด HLB	26
7	สรุปวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเตตร้าซัยคลิน	31
8	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	33
9	สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	34
10	สภาวะที่ใช้ในการฉีดวิเคราะห์สาร ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	39
11	พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัด SPE โดยวิธีออกแบบการทดลองแบบ 3 factor 2 level factorial design	43
12	สภาวะที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างน้ำปราศจากไอออนด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB	44
13	ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เวลาต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	52
14	ผลการฉีดวิเคราะห์สาร ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	56
15	รายละเอียดของคอลัมน์ที่ใช้ในการทดลอง	56
16	สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	58
17	ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางด้วย เมธานอล และในสารละลายบัฟเฟอร์ B	59
18	ค่า SD , %RSD ของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการฉีดวิเคราะห์ 7 ซ้ำ ของสารละลายมาตรฐานผสมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ B	60

		หน้า
19	ผลการฉีดวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 5 – 1000 ng/mL	61
20	ข้อมูลจากกราฟมาตรฐาน	64
21	ผลการสกัดด้วย liquid liquid extraction และเฟสของแข็ง	66
22	ค่าร้อยละของการกลับคืน ที่ได้จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดเมื่อทำการเติมสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/mL	68
23	ผลการศึกษาความแปรปรวน (ANOVA)	70
24	ค่าร้อยละของการกลับคืนของสารกลุ่มเตตราซัยคลินเมื่อทำการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งที่เติมสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยสภาวะต่างๆ	75
25	ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy)	80
26	สรุปค่าปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลิน	82
27	รายละเอียดของตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีการเก็บตัวอย่าง	83
28	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินและคุณสมบัติทางเคมีในตัวอย่างน้ำผึ้งที่วางขายตามตลาดในเชียงใหม่	84

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	โครงสร้างของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน	10
2	ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง HPLC	13
3	การแยกของสารผสมในคอลัมน์ปลายเปิด	14
4	โครมาโทแกรมและค่าทางโครมาโทกราฟีของการแยกสารประกอบ	16
5	โครมาโมแกรมสำหรับการคำนวณค่า N	18
6	โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่า R	19
7	โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่า asymmetry factor และ tailing factor	19
8	กระบวนการเกิดฟลูออเรสเซนซ์	20
9	ขั้นตอนในการแยกด้วยย SPE	22
10	โครงสร้างของเฟสของแข็งชนิด HLB Oasis	26
11	ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างแบบ liquid liquid extraction	42
12	ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างด้วยเฟสของแข็ง	42
13	ขั้นตอนการสกัดหาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง	46
14	สเปกตรัมแสดง excitation (Ex) และ emission (Em) ของสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน	50
15	แสดงค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เวลาต่าง ๆ	52
16	โครมาโทแกรมของสารออกซีเตตราซัยคลิน (OTC) เตตราซัยคลิน (TC) คลอเตตราซัยคลิน (CTC) และด็อกซีซัยคลิน (DC)	57
17	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	59
18	กราฟมาตรฐานของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน	62
19	กราฟมาตรฐานของสารละลายด็อกซีซัยคลิน	62
20	กราฟมาตรฐานของสารละลายเตตราซัยคลิน	63
21	กราฟมาตรฐานของสารละลายคลอเตตราซัยคลิน	63

		หน้า
22	ผลของค่า pH ของสารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่ส่งผลต่อค่า %recovery	71
23	ผลของชนิดสารละลายที่ใช้ในการล้าง HLB ที่ส่งผลต่อค่า %recovery	72
24	ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ ที่ส่งผลต่อต่อค่า %recovery	72
25	โครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดสารเตตราซัยคลินวิธีต่างๆ	76
26	โครมาโทแกรมของน้ำผึ้งที่มีการเติมสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน	79
27	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง SD กับความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ตรวจวิเคราะห์ได้	81
28	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง SD กับความเข้มข้นของเตตราซัยคลินที่ตรวจวิเคราะห์ได้	82
29	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง SD กับความเข้มข้นของคลอเตตราซัยคลินที่ตรวจวิเคราะห์ได้	82
30	กราฟแสดงปริมาณความชื้นในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ	85
31	กราฟแสดงปริมาณความหวานในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ	86
32	กราฟแสดงค่าพีเอชในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ	86
33	กราฟแสดงค่า HMF ในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ	87
34	กราฟแสดงค่าปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ	87

สารบัญภาพผนวก

ภาพ		หน้า
1	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 1LOH	102
2	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 1SOH	102
3	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 1FRH	103
4	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 2LOH	103
5	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 2WFH	104
6	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 3LOH	104
7	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 3FRH	105
8	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 3SUH	105
9	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 3LYH	106
10	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 4LOH	106
11	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 4FRH	107
12	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 4LYH	107
13	โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 5LOH	108

อักษรย่อและสัญลักษณ์

µg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µg/kg	ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
ng/mL	นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
k'	capacity factor
t_R	retention time
t'_R	corrected retention time
ACN	อะซิโทไนไทรล์
CTC	คลอเตตราซัยคลิน
DC	ด็อกซีซัยคลิน
DMF	dimethyl formamide
FIA	flow injection analysis
H	height equivalent of a theoretical plate
HMF	ไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล
Int	intensity
IPA	isopropanol
LU	luminescence unit
MeOH	เมธานอล
N	number of theoretical plates
OTC	ออกซีเตตราซัยคลิน
pH	สภาวะกรดด่าง (พีเอช)
R	resolution
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
SD_0	ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ blank
TC	เตตราซัยคลิน

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งนับเป็นอีกอาชีพหนึ่งที่มีผู้ประกอบการอยู่ทั่วโลก แล้วยังให้ผลผลิตที่ให้ประโยชน์มากมายมหาศาล สามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เชื่อมโยงไปสู่อุตสาหกรรมได้หลากหลาย อาทิ น้ำผึ้ง เกสร นมผึ้ง หรือไขผึ้งที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และเทียนไข สร้างรายได้เข้าประเทศในแต่ละปีไม่ต่ำกว่า 60 ล้านบาท โดยมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นเรื่อยๆ หากแต่ทุกวันนี้อุตสาหกรรมแมลงยังคงประสบกับปัญหาโรคของผึ้งซึ่งเป็นปัญหาสำคัญและต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน ได้แก่ การระบาดของโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ในตัวอ่อนผึ้ง เช่น โรคจากเชื้อราชอล์คบรูด (chalkbrood) โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน (American foulbrood) และโรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียน (European foulbrood) เนื่องจากโรคเหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายทำให้ตัวอ่อนผึ้งตาย อีกทั้งยังมีการแพร่ระบาดง่ายและรวดเร็วหากไม่มีการป้องกัน แนวทางการแก้ปัญหาที่ผ่านมาของเกษตรกรทั่วโลกจะใช้วิธีบำบัดและควบคุมโรคในผึ้งที่เกิดจากจุลินทรีย์โดยใช้สารปฏิชีวนะ ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenical) และเตตราซัยคลิน (tetracycline) ทำให้มีสารตกค้างอยู่ในน้ำผึ้ง อันเป็นชนวนก่อให้เกิดปัญหาการกีดกันทางการค้าตามมา ในปี 2545 น้ำผึ้งจากประเทศจีนถูกห้ามการส่งออก โดยทาง Food Standard Agency มีการตรวจพบสารปฏิชีวนะ streptomycin และ chloramphenical ในน้ำผึ้งที่นำเข้าจากจีน กระแสการต่อต้านการใช้สารปฏิชีวนะในการบำบัดและป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียจึงเกิดขึ้น อีกทั้งในประเทศกลุ่มยุโรปยังได้ออกกฎหมายห้ามใช้สารดังกล่าวกับสัตว์ทุกประเภทตั้งแต่ปี 2537 โดยขณะนี้ในประเทศผู้ซื้อผลิตภัณฑ์จากผึ้งยังได้ตื่นตัวตรวจสอบสารดังกล่าวในน้ำผึ้งทั้งหมดที่นำเข้าจากประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย เป็นต้น (ส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมงสำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2547; สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2547)

จากสถิติการจดทะเบียนฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งทั่วประเทศ ในปี 2547 มีจำนวน 1,567 ฟาร์ม สามารถผลิตน้ำผึ้งได้ประมาณ 10,000 ตัน นมผึ้งประมาณ 100 ตัน เกสรผึ้งประมาณ 200 ตัน และไขผึ้งประมาณ 120 ตัน ซึ่งแหล่งเลี้ยงผึ้งกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ ภาคเหนือมีการเลี้ยงมากที่สุดมีสัดส่วนร้อยละ 89.38 ของปริมาณการเลี้ยงผึ้งทั้งหมด จังหวัดที่มีการเลี้ยงมากที่สุด คือ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และ แพร่ รองลงมาได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีสัดส่วนการเลี้ยงร้อยละ 4.42 ภาคกลางมีสัดส่วนการเลี้ยงร้อยละ 3.40 และภาคใต้ ส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงผึ้งโพรง มีสัดส่วนการเลี้ยงร้อยละ 2.80 ตามลำดับ ซึ่งน้ำผึ้งที่ได้รับความนิยมบริโภคและทำรายได้ให้กับประเทศมากที่สุด คือ น้ำผึ้งจากดอกลำไย รองลงมาคือ สาบเสือ ลิ้นจี่ และทานตะวัน เป็นต้น นอกจากนี้การเลี้ยงผึ้งยังก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์อีกหลายอย่าง เช่น นมผึ้ง (royal jelly) เกสรผึ้ง ไขผึ้ง พันธุ์ผึ้ง ยางไม้ และอื่นๆ เป็นต้น (ส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมงสำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2547)

ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ เตตราซัยคลิน ได้แก่ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน เป็นยาที่มีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ อันได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย ริกเกตเซีย เชื้อรา เชื้อปาราสิต และโปรโตซัว (Thailabonline, 2000) และได้มีการนำมาใช้ในด้านการเกษตรต่าง ๆ เช่น ในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง หรือในฟาร์มเลี้ยงผึ้ง เพื่อใช้ในการรักษาและควบคุมโรคในสัตว์ดังกล่าว จึงทำให้มีการตกค้างของกลุ่มยาปฏิชีวนะในสินค้าเกษตร ทำให้มีการกำหนดปริมาณสารตกค้าง (MRL) ของยาปฏิชีวนะกลุ่มดังกล่าวในสินค้าเกษตร เช่น สหภาพยุโรป ได้กำหนดให้ในน้ำนม มีสารกลุ่ม เตตราซัยคลิน ตกค้างได้ไม่เกิน 0.1 μg/mL (Council Regulation, EEC No. 2377/90, 1990) ในส่วนของน้ำผึ้งนั้นประเทศญี่ปุ่นกำหนดให้มีสารกลุ่ม เตตราซัยคลิน ตกค้างได้ไม่เกิน 0.1 mg/kg (Dinko, et al., 2005) และประเทศเบลเยียมกำหนดให้มีสารกลุ่ม เตตราซัยคลิน ตกค้างได้ไม่เกิน 50 μg/kg (Reybroeck, 2003)

ในการทดสอบวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ เตตราซัยคลิน ได้มีการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างหลากหลายชนิด เช่น ในตัวอย่างของอาหาร (Nakazawa, et al., 1999) น้ำนม (Cinquina, et al., 2003; Furasawa, 2003; ปริญญา, 2550; Spisso et al., 2007) เนื้อสัตว์ต่างๆ (Sokol and Matisova, 1994; Senyuva, et al., 2000; Schneider, et al., 2007) ด้านสิ่งแวดล้อม (สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2550; Blackwell, et al., 2004; Sung-Chul and Kenneth, 2007) ด้านวัตถุดิบของยาปฏิชีวนะ (Couto, et al., 1998; Pena, et al., 1998; Lu, et al., 2004) รวมถึงในน้ำผึ้ง (Salter, 2003; Pena, et al., 2005; Wan, et al. 2005) เป็นต้น มีหลายเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งได้แก่ การตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น (Alfredsson, et al., 2005; Weigel and Gaterman, 2005) และเทคนิคทางด้านโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วย

การตรวจวัดที่แตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น วิธีการตรวจวัดแบบยูวี วิสิเบิล (Senyuva, et al., 2000; Cinquina, et al., 2003; Furasawa, 2003) วิธีการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Blackwell, et al., 2004; Schneider, et al., 2007; Spisso, et al., 2007) และวิธีการตรวจวัดแบบแมสสเปกโทรเมตรี (Sung-Chul and Kenneth, 2007; Wang, et al., 2008) โดยการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น (screen test) นั้นยังไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ในระดับที่ต่ำกว่า 10 μg/kg ในขณะที่การตรวจวัดแบบยูวี วิสิเบิลนั้นยังให้ความไว (sensitivity) ที่ต่ำเมื่อเทียบกับการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ และการตรวจวัดแบบแมสสเปกโทรเมตรียังใช้ต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ที่ค่อนข้างที่สูงกว่าเทียบกับการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะทำการศึกษาหาระดับยาปฏิชีวนะของกลุ่มเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในน้ำผึ้งในเขตจังหวัดเชียงใหม่ โดยเลือกใช้เทคนิคการตรวจวัดด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ในการศึกษาทดสอบ เนื่องจากเครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีความจำเพาะสูงกว่ายูวี วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ และสามารถตรวจวัดสารได้ในปริมาณน้อยๆ โดยเมื่อสารได้รับการกระตุ้นด้วยแสงยูวี สารตัวอย่างจะให้ฟลูออเรสเซนซ์ออกมาซึ่งมีความยาวคลื่นเฉพาะและจะถูกวัดด้วยโฟโตเซลล์ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้มีความเหมาะสม มีประสิทธิภาพสูง และรวดเร็วเหมาะสำหรับงานประจำที่ตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะของกลุ่มเตตราซัยคลิน ในตัวอย่างของน้ำผึ้งจึงทำให้คาดว่าเมื่อรวมเทคนิคการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวเข้ากับเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์แล้ว จะช่วยทำให้ช่วยประหยัดเวลาค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างลดลงและทำการทดสอบตัวอย่างในปริมาณมากๆ ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์

2. เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ และเก็บรวมรวมข้อมูลปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในน้ำผึ้งในเขตภาคเหนือ โดยเฉพาะในเขตเชียงใหม่ เพื่อส่งเสริมการขายและการส่งออก

3. เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์และเก็บรวมรวมข้อมูลปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้าง เพื่อเป็นการเฝ้าระวัง ในเรื่องของการตกค้างของสารกลุ่มดังกล่าว

4. เพื่อศึกษาและสร้างองค์ความรู้ใหม่ ซึ่งยังสามารถนำไปถ่ายทอดความรู้ให้กับหน่วยงานต่างๆ ที่สนใจ และยังเป็นการพัฒนาการค้นคว้าวิจัย และส่งเสริมการเรียนการสอนในระดับอุดมศึกษาของมหาวิทยาลัยอีกด้วย

ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ในการวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คอลัมน์สำหรับการแยกที่บรรจุด้วยเฟสที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกสูงสุด ศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายในการชะที่เหมาะสม ศึกษาหาอัตราส่วนผสมของตัวทำละลายสำหรับการชะที่เหมาะสม ศึกษาหาอัตราการไหลของตัวทำละลายที่เหมาะสม และศึกษาหาระบบการตรวจวัดที่เหมาะสม

2. ศึกษาหาวิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction) โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ เลือกใช้ชนิดของแข็งบรรจุ ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด ชนิดของตัวทำละลาย และปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสม

3. นำวิธีการสกัดที่สภาวะเหมาะสมตรวจหาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้าง ในน้ำผึ้งจากเกสรดอกไม้ชนิดต่างๆ ในเขตภาคเหนือ โดยเฉพาะในเขตจังหวัดเชียงใหม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ภายหลังสิ้นสุดการวิจัย คาดว่าจะได้งานวิจัยที่ทำให้สามารถทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในกลุ่มของเตตราซัยคลิน ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้เครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งให้ความถูกต้อง แม่นยำสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับงานประจำ (routine operations) สำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมหรือช่วยลดระดับของยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน ที่ใช้ในฟาร์มเลี้ยงผึ้งของภาคเหนือไม่ให้เกินระดับที่จะเป็นอันตรายได้ สามารถถ่ายทอดความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้ โดยผ่านการนำเสนอผลการวิจัย ในรูปการประชุมสัมมนาทางวิชาการระดับท้องถิ่น ระดับชาติ หรือระดับนานาชาติ หรืออาจนำเสนอในรูปเอกสารทางวิชาการ โดยการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ ระดับชาติ ระดับนานาชาติ หรือตามความเหมาะสม

งานวิจัยดังกล่าว เป็นงานวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานในสาขาเคมีวิเคราะห์ด้านอาหารและสิ่งแวดล้อม ซึ่งเน้นการวิเคราะห์สารปนเปื้อนทางอาหารและสิ่งแวดล้อม ที่อาจปนเปื้อนขึ้นในกระบวนผลิต ดังนั้นการเผยแพร่ผลการศึกษาและความรู้จากการวิจัยด้านนี้แก่ เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งจะช่วยทำให้เกษตรกรกลุ่มดังกล่าวได้ทราบถึง ระดับของสารปฏิชีวนะที่ตกค้างในน้ำผึ้งของตนเอง และหันมาใส่ใจต่อการใช้สารปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน ให้ลดลงหรือเลิกใช้สารกลุ่มดังกล่าวเพื่อป้องกันการตกค้างของสารปฏิชีวนะในน้ำผึ้ง ผลจากโครงการนี้จะมีส่วนช่วยส่งเสริมการขายและการส่งออกของน้ำผึ้งในเขตภาคเหนือให้สามารถส่งน้ำผึ้งที่มีคุณภาพตรงตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อ ในส่วนของผู้บริโภคเองก็จะได้มีความเชื่อมั่นว่าจะไม่ได้รับผลกระทบจากสารปฏิชีวนะเมื่อบริโภคน้ำผึ้งและผลิตภัณฑ์จากน้ำผึ้งของภาคเหนือ และสามารถใช้เป็นดัชนีชี้บ่งถึงความปลอดภัย ที่มีต่อการปนเปื้อนของสารปฏิชีวนะในน้ำผึ้งและผลิตภัณฑ์ในเขตภาคเหนือได้ และอาจเป็นการส่งเสริมขีดความสามารถของสถานประกอบการที่สนใจจะนำไปใช้ในหน่วยงานของตนเองเพื่อเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์น้ำผึ้งของตนให้สามารถตรวจวิเคราะห์น้ำผึ้งให้มีมาตรฐานตรงตามเกณฑ์ของหน่วยงานที่ควบคุมต่างๆ ได้กำหนดไว้

นอกจากนี้ยังเป็นการเสริมสร้างประโยชน์จากการวิจัยของหน่วยงานด้านการวิเคราะห์ตัวอย่างทางอาหาร และสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะหน่วยงานที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการตรวจติดตามตรวจสอบมลพิษทางอาหารหรือสิ่งแวดล้อม การควบคุมมลพิษทางการเกษตร หรือแม้แต่โรงงานผู้ผลิตเองที่ต้องมีการควบคุมคุณภาพของน้ำผึ้งก่อนส่งจำหน่าย ซึ่งจะเป็นการขยายขอบเขตการใช้ประโยชน์ทางวิชาการ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

น้ำผึ้งและองค์ประกอบ

น้ำผึ้งเป็นสารให้ความหวานตามธรรมชาติที่ได้จากผึ้ง ลักษณะเป็นของเหลวค่อนข้างข้นสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล ผึ้งผลิตโดยใช้น้ำหวานจากดอกไม้ผ่านกระบวนการในตัวผึ้งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำหวานและทำให้เข้มขึ้นโดยดึงน้ำออกบางส่วน น้ำผึ้งจะเหลือน้ำไม่เกิน 20% น้ำผึ้งประกอบด้วยน้ำตาลเชิงเดี่ยว 2 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส นอกจากนี้น้ำผึ้งยังอุดมไปด้วยแร่ธาตุนานาชนิด เช่น ฟอสฟอรัส เหล็ก ทองแดง แมงกานีส แคลเซียม โพแทสเซียม โซเดียม และเกลือแร่อีกหลายชนิดที่สำคัญ ในน้ำผึ้งยังมีวิตามินบี1 บี2 บี3 บี5 บี6 วิตามินซี วิตามินอี วิตามินเค และแคโรทีน รวมทั้งโปรตีน กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย ส่วนเอ็นไซม์ และฮอร์โมนถึงแม้จะมีน้อยแต่ช่วยเสริมให้น้ำผึ้งมีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น (โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, 2545; บริษัทไทยลานนาฟาร์ม จำกัด, 2550)

ตาราง 1 องค์ประกอบของน้ำผึ้งทั่วไป

องค์ประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนัก
1. น้ำ	20
2. น้ำตาลชนิดต่าง ๆ (กลูโคส ฟรุกโทส กาแลกโตส เลวูโรส)	79
3. กรดชนิดต่าง ๆ	0.3
4. วิตามิน เอ็นไซม์ และแร่ธาตุ	0.5

ที่มา: พงษ์เทพ (2528)

น้ำผึ้งมีกลิ่นและลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับน้ำหวานจากดอกไม้ที่ผึ้งเก็บมาทำเป็นน้ำผึ้ง น้ำผึ้งตามธรรมชาติจะมีรสหวานจัด กลิ่นหอมมีสีเหลืองอ่อน ๆ จนถึงสีน้ำตาลเข้มขึ้นกันแหล่งหรือชนิดของพืชอาหารที่ได้มา หน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ทำการสำรวจและทำการวิเคราะห์หาค่าความหวานได้ค่าอยู่ในช่วง 75-81% ค่าพีเอช 4.5-5.9 น้ำตาล 66.39-71.2% และความชื้นอยู่ในช่วง 20.00–24.50% ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 สมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบของน้ำผึ้งชนิดต่างๆ

ชนิดของน้ำผึ้ง	ความหวาน (% Brix)	ความเป็นกรด (pH)	น้ำตาล (% Invert sugar)	สี (Colour)	ความชื้นในน้ำผึ้ง (% Moisture)
ทุเรียน	78.33	4.8	68.6	สีน้ำผึ้งอ่อน	21.67
นุ่น	80.13	4.5	68.69	สีน้ำผึ้งอ่อน	19.87
ลำไย	78.2	5.9	64.34	สีน้ำผึ้งเข้มมาก	21.8
มะม่วง	80	4.9	64.08	สีน้ำผึ้งเข้ม	20
สาบเสือ	81.4	4.5	67.99	สีน้ำผึ้งอ่อนมาก	18.6
สิ้นจี่	79.73	5.4	66.39	สีน้ำผึ้งปานกลาง	20.27
ยางพารา	76.4	4.7	67.34	สีน้ำผึ้งอ่อน	23.6
เงาะ	78.33	5.2	66.09	สีน้ำผึ้งปานกลาง	21.67
ส้ม	78.6	4.7	66.09	สีน้ำผึ้งอ่อน	21.4
น้ำผึ้งจากผึ้งโพรง	76.4	-	67.5	สีน้ำผึ้งเข้ม	23.6
น้ำผึ้งจากผึ้งหลวง	76.5	-	71.2	สีน้ำผึ้งปานกลาง	23.5
น้ำผึ้งจากผึ้งมิ้ม	75.5	-	68.1	สีน้ำผึ้งอ่อน	24.5

ที่มา: สิริวัฒน์ และ เพ็ญศรี (2529)

น้ำผึ้งสามารถแบ่งออกตามแหล่งกำเนิดได้สองประเภทคือ น้ำผึ้งจากดอกไม้ และน้ำผึ้งที่ได้จากใบพืชบางชนิด ส่วนใหญ่ได้มาจากสิ่งที่ถูกขับออกมาจากแหล่งแมลงที่ดูดกินพืช (*Hemiptera*) สำหรับน้ำผึ้งนั้นได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นทางการแพทย์ หรือการนำมาใช้เป็นอาหาร และนำมาเป็นส่วนผสมของยาสมุนไพรต่างๆ นอกจากนี้น้ำผึ้งยังมีคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากน้ำผึ้งมีความชื้นน้อย มีแรงดูดซึม (osmosis pressure) สูง สามารถดึงน้ำจากเซลล์จุลินทรีย์ไม่ให้สามารถเจริญเติบโตและตายได้ในที่สุดสำหรับคุณสมบัติของน้ำผึ้งที่มีผลต่อร่างกายนั้นพบว่า น้ำผึ้งไม่ก่อความระคายเคืองแก่เยื่อหุ้มทางเดินอาหาร ในผู้ที่เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย น้ำหนักลด คนชรา ถ้าได้ดื่มน้ำผึ้งจะช่วยทำให้ร่างกายสามารถฟื้นตัวได้อย่างรวดเร็ว และหายอ่อนเพลียได้ น้ำผึ้งมีคุณสมบัติเป็นยาระบายอ่อนๆ และช่วยระงับความกระวนกระวายของร่างกายและระบบประสาทได้ ทำให้ร่างกายสงบลง และในทางการแพทย์พบว่าสามารถใช้น้ำผึ้งเป็นยารักษาแผลสด เพื่อให้แผลสะอาดและหายเร็วขึ้น (สิริวัฒน์ และ เพ็ญศรี, 2529)

ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพหรือทำลายจุลชีพได้ ไม่เป็นพิษที่ความเข้มข้นหรือปริมาณที่ใช้ ถูกลำเลียงจากบริเวณให้ยาไปยังบริเวณติดเชื้อได้ดี มีความเฉพาะเจาะจงต่อจุลชีพ เพราะลักษณะของเซลล์จุลชีพกับเซลล์ของร่างกายต่างกัน เมื่อจุลชีพเจริญเติบโตและแบ่งตัวต้องอาศัยการสังเคราะห์หรือนำเอาชีวโมเลกุลของร่างกายชนิดต่างๆ เข้ามาในเซลล์ ยาต้านจุลชีพจะรบกวนกระบวนการเฉพาะต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวน โดยทั่วไปจำแนกยาต้านจุลชีพออกได้ตามกลไกการออกฤทธิ์ เช่น การขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียและรา ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มไซโทพลาซึม ส่งผลต่อการสร้างกรดนิวคลีอิกและโปรตีนและมีขั้นตอนเมแทบอลิซึมอื่นๆ ยาต้านจุลชีพอาจจะทำลายเซลล์จุลชีพ (bactericidal) หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ (bacteriostatic) ยาปฏิชีวนะมีประกอบด้วยหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเพนิซิลิน อีรีโทรมัยซิน เตตราซัยคลิน คลอแรมเฟนิคอล สเตรปโตมัยซิน นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะยังรวมถึงยาที่สังเคราะห์ขึ้นตามกระบวนการทางเคมี เช่น ยาประเภทซัลโฟนาไมด์ เป็นต้น (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะเภสัชศาสตร์, 2544; ระวีวรรณ, 2547)

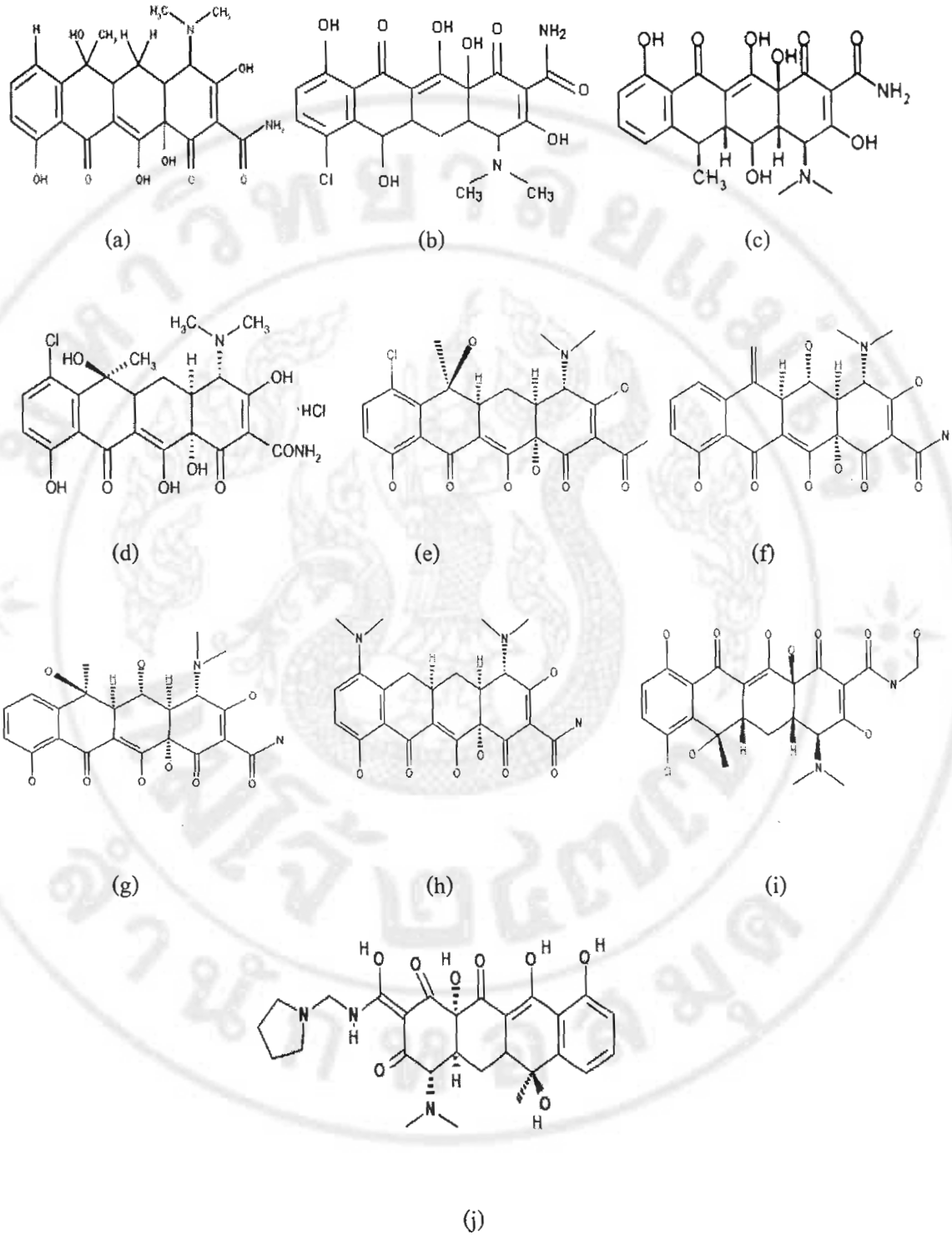
เตตราซัยคลิน (tetracyclines) เป็นกลุ่มยาที่สกัดได้จากราพวก streptomyces สามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อโรคได้หลายชนิด เตตราซัยคลินเป็นผลึกสีเหลือง มีรสขมเล็กน้อย ละลายน้ำได้น้อย เป็นสารประกอบแอมโฟเทอริก ทำปฏิกิริยาให้เกลือได้ทั้งกรดและเบส สารเหล่านี้อยู่ในรูป Zwitterion และละลายได้ดีในสารละลายกลุ่มแอลกอฮอล์ เช่น เมธานอล และเอทธานอล หรือในสารละลายอินทรีย์ ชนิดอื่น ๆ เช่น เอทิลอะซิเตต อะซิโตน และ อะซิโทไนไทรล์ เป็นต้น และจะไม่ละลายในสารละลายจำพวกไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว เช่น เฮกเซน เป็นต้น และมีค่าคงที่การแตกตัวได้หลายค่าดังแสดงในตาราง 3 เมื่ออยู่ในรูปสารละลายเตตราซัยคลินไม่ค่อยเสถียร ต้องไม่ถูกแสง น้ำ หรือความร้อน ถ้าเตรียมในรูปสารละลายต้องรีบใช้ทันที ถ้าเก็บไว้นานจะเปลี่ยนเป็นสารพิษซึ่งนอกจากจะไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพแล้วยังเป็นอันตรายต่อไต ทำให้คลื่นไส้อาเจียน มีโปรตีนออกมากับปัสสาวะ น้ำตาลและกรดอะมิโนในปัสสาวะสูง

ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลิน (tetracyclines) ได้แก่ ดีมีโดลซัยคลิน (demeclocycline) ด็อกซีซัยคลิน (doxycycline) คลอเตตราซัยคลิน (chlortetracycline) ไลมีซัยคลิน (lymecycline) มีตาซัยคลิน (methacycline) ออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline) มิโนซัยคลิน (minocycline) โรลิเตตราซัยคลิน (rolitetracycline) เตตราซัยคลิน (tetracycline) และ มีโดลซัยคลิน (meclocycline) โครงสร้างของยากลุ่มนี้แสดงดังภาพ 1

ตาราง 3 ค่าคงที่การแตกตัว (p*Ka*) ของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน

สาร	p*Ka1*	p*Ka2*	p*Ka3*
ออกซีเตตราซัยคลิน	3.2	7.5	8.9
ด็อกซีซัยคลิน	3	8	9.2
เตตราซัยคลิน	3.3	7.8	9.6
คลอเตตราซัยคลิน	3.3	7.6	9.3

ที่มา: Anderson, et al. (2005)



ภาพ 1 โครงสร้างของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน

หมายเหตุ (a) tetracycline (b) demeclocycline (c) doxycycline (d) chlortetracycline (e) lymecycline (f) methacycline (g) oxytetracycline (h) minocycline (i) meclocycline (j) rolitetracycline

มาตรฐานและข้อกำหนดของยาปฏิชีวนะในอาหาร

ด้วยเหตุที่ว่ายาปฏิชีวนะ เป็นสารแปลกปลอมเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดผลเสียและอันตรายต่อร่างกายได้หลายประการ คือ การแพ้ยา เป็นผลจากการตอบโต้ของภูมิต้านทานร่างกายต่อยาปฏิชีวนะอย่างเกินเหตุ มีอาการได้ตั้งแต่ขั้นเบาเช่น มีผื่นตามผิวหนัง เป็นไข้ ลมพิษ เป็นต้น จนถึงขั้นสาหัสซึ่งเป็นการแพ้อย่างฉับพลันรุนแรงที่เกิดขึ้นกับระบบต่างๆ ของร่างกาย จนทำให้เกิดสภาวะช็อกและเสียชีวิตได้ การดื้อยาเป็นภาวะที่เชื้อโรคสามารถทนทานต่อฤทธิ์ของยาซึ่งเคยใช้ได้ผลกับมันมาก่อน อาจเกิดขึ้นอย่างช้าๆ หรือรวดเร็วก็ได้ในระหว่างการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ใช้ยาติดต่อกันนานๆ ส่วนใหญ่การดื้อยาเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อโรคทำให้มันกลายพันธุ์เป็นชนิดที่สามารถทนทานต่อยาได้ และโดยทั่วไปเชื้อโรคซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะตัวใดตัวหนึ่งมักจะพลอยดื้อต่อยาปฏิชีวนะอื่นที่อยู่ในประเภทเดียวกันหรือมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน การติดเชื้อแทรกซ้อน เป็นสภาวะการติดเชื้อที่เกิดขึ้นเมื่อสมดุลของจุลินทรีย์ซึ่งมีอยู่ตามปกติในร่างกายถูกกระทบกระเทือนหรือทำลายไป ในสภาพปกติจุลินทรีย์เหล่านี้บางชนิดมีประโยชน์โดยทำหน้าที่ควบคุมจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ก่อให้เกิดโรค ดังนั้นในการใช้ยาปฏิชีวนะ นอกจากจะทำลายเชื้อต้นเหตุของโรคแล้วยังพลอยทำให้จุลินทรีย์ชนิดนี้ถูกทำลายไปด้วย ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ชนิดที่ทนทานต่อยาที่หลงเหลืออยู่มีโอกาสแบ่งตัวขยายพันธุ์มากขึ้น และก่อให้เกิดการติดเชื้อชนิดใหม่ การติดเชื้อแทรกซ้อน อาจสังเกตได้จากอาการของโรคที่เปลี่ยนไปจากลักษณะเดิมที่เคยเป็นอยู่แต่แรก สภาวะการติดเชื้อแทรกซ้อนนี้อาจเกิดได้ง่ายเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะที่มีขอบเขตทำลายเชื้อกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ใช้เป็นเวลานาน

สำหรับในวงการปศุสัตว์ เช่น ฟาร์มเลี้ยงไก่ หมู และฟาร์มเลี้ยงผึ้งได้มีการนำยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลินมาใช้เพื่อการรักษาและควบคุมโรค จึงทำให้มีการตกค้างของกลุ่มยาปฏิชีวนะในสินค้าเกษตร ดังนั้นทำให้มีการกำหนดปริมาณสารตกค้าง (MRL) ของยาปฏิชีวนะกลุ่มดังกล่าวในสินค้าเกษตร เช่น องค์การค้าโลก (FAO/WHO Food Standard) ได้กำหนดให้มีปริมาณสารตกค้างของกลุ่มเตตราซัยคลินในอาหาร ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ปริมาณกำหนดสารตกค้างของกลุ่มเตตราซัยคลินในอาหารประเภทต่างๆ

เนื้อ	ประเภท	กำหนดปริมาณสารตกค้าง (MRL), µg/kg
วัว	กล้ามเนื้อ	200
	ตับ	600
	ไต	1200
	น้ำนม	100
หมู	กล้ามเนื้อ	200
	ตับ	600
	ไต	1200
แกะ	กล้ามเนื้อ	200
	ตับ	600
	ไต	1200
	น้ำนม	100
เป็ด,ไก่	กล้ามเนื้อ	200
	ตับ	600
	ไต	1200
	ไข่	400
ปลา	กล้ามเนื้อ	200

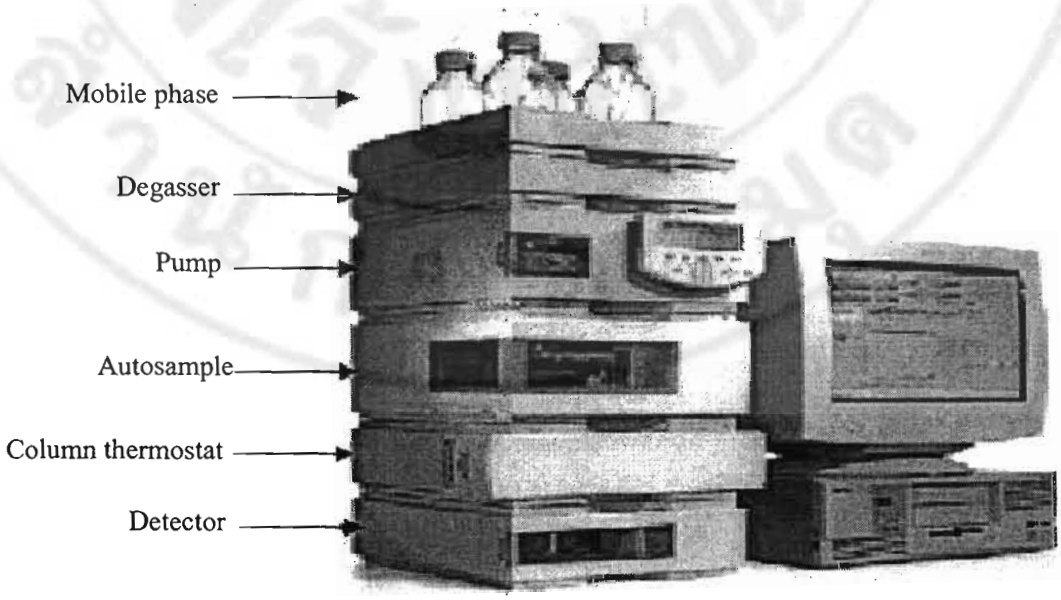
ที่มา: Codex alimentarius (2007)

ในส่วนของน้ำผึ้งนั้นสหภาพยุโรป ได้กำหนดให้มีสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ตกค้างได้ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Agricultural and Processed Food Products Export Development Authority, 2005; Michaud, 2005) ในส่วนของออสเตรเลียนั้นได้กำหนดให้มีสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ตกค้างได้ไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Australia New Zealand Food Authority, 2002; Marin, 2004)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

High performance liquid chromatography (HPLC) เป็น column liquid chromatography แบบใหม่ ซึ่งได้มีการพัฒนามาตั้งแต่ ค.ศ. 1969 โดยพัฒนาเกี่ยวกับคอลัมน์ คือ ลดขนาดอนุภาคของวัสดุบรรจุ (packing material) ลงเหลือประมาณ 3-10 μm ดังนั้นการที่จะให้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เคลื่อนที่ได้ต้องใช้เครื่องปั๊มที่มีแรงดันสูง (high pressure pump) ช่วย (เพ็ญพรรณ และ โอทอง, 2539)

HPLC มีข้อดีเหนือกว่า liquid chromatography ชนิดอื่น ๆ คือมีประสิทธิภาพสูงในการแยกสารให้ผลถูกต้อง เที่ยงตรง มีความไวสูง ใช้เวลาน้อย ง่ายต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ กลไกการแยกเหมือน liquid chromatography แบบเดิม แตกต่างที่เครื่องมือและเทคนิคการปฏิบัติเท่านั้น chromatography ชนิดนี้ถูกนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) ในงานหลายสาขา เช่น ทางอุตสาหกรรม ทางเกษตรกรรม ทางวิทยาศาสตร์ และทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ HPLC เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์แยกสารเกือบทุกชนิด เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีสภาพไว (sensitivity) สูง สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างรวดเร็วแม่นยำและมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะสารที่ไม่ระเหยและไม่คงตัวต่อความร้อน ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC แสดงในภาพ 2

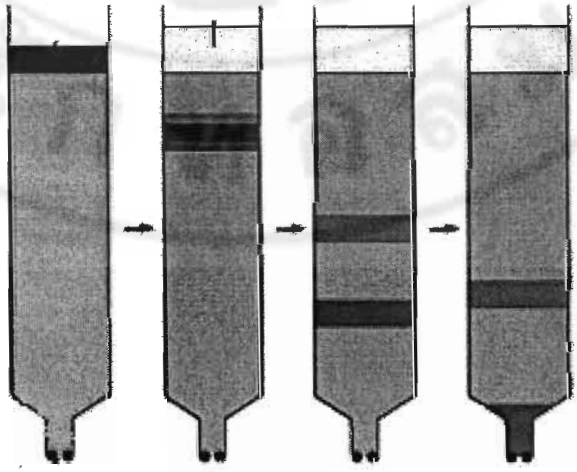


ภาพ 2 ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ 1906 โดย Michael Tswett โดยเทคนิคดังกล่าว สามารถใช้ในการแยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว (distribution of partition) ของสารตัวอย่าง (solute) ระหว่างสองเฟส คือ เฟสเคลื่อนที่ (moving or mobile phase) ซึ่งเป็นของเหลว กับอีกเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งเป็นของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง (inert supporting material) ที่บรรจุในคอลัมน์ เฟสอยู่กับที่ทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่ทำหน้าที่ในการพาสารตัวอย่างผ่านเฟสอยู่กับที่ องค์ประกอบหรือสารชนิดต่างๆ ในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกระหว่างเฟสทั้งสองหลายๆ ครั้ง หรือมีการหน่วงเหนี่ยว (retaintion) ไว้ในเฟสอยู่กับที่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีขององค์ประกอบหรือสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารตัวอย่างที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเฟสทั้งสอง จากความแตกต่างนี้ทำให้สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ในอัตราความเร็วที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยกเกิดขึ้น (Braithwaite and Smith, 1996)

หลักการพื้นฐานของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

หลักการขั้นพื้นฐานของโครมาโทกราฟีนั้น คือการแยกสารละลายผสมในคอลัมน์เปิด ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็กๆ ที่มีรูพรุนเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน ในหลอดยาวเล็กๆ เรียกว่า คอลัมน์ (แม้น และ อมร, 2534)



ภาพ 3 การแยกของสารผสมในคอลัมน์ปลายเปิด

จากภาพ 3 แสดงให้เห็นถึงกระบวนการแยกทางโครมาโทกราฟี สารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในส่วนของคอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารผ่านไปยังคอลัมน์ สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับและถูกทำให้หลุดออกไปจากการดูดซับ (desorption) บนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ผลที่ตามมาคือสารประกอบจะเคลื่อนไปตามคอลัมน์ได้ช้าลง และอัตราเร็วการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพ (affinity) ของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารประกอบ X มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เมื่อมันผ่านไปตามคอลัมน์ ดังสมการ 2.1

$$X_m \rightleftharpoons X_s$$

โดย

X_m ใน เฟสเคลื่อนที่

X_s ใน เฟสอยู่กับที่

ค่า distribution coefficient สำหรับสารประกอบที่สอดคล้องกับสมการข้างบนคือ

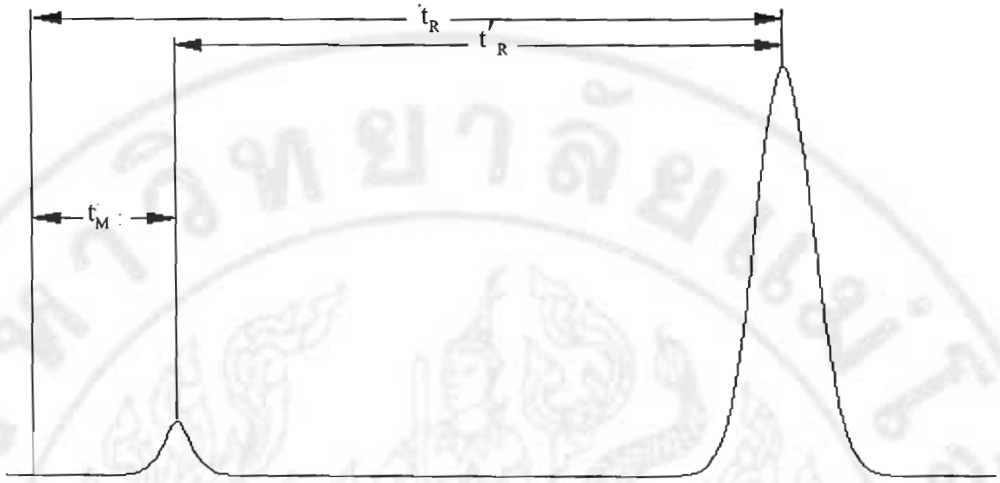
$$K_x = [X]_s / [X]_m = \text{ค่าคงที่} \qquad (2.1)$$

เมื่อ K_x = distribution coefficient

$[X]_s$ = ความเข้มข้นของสาร X ใน stationary phase

$[X]_m$ = ความเข้มข้นของสาร X ใน mobile phase

ถ้า K_x มีค่ามาก แสดงว่าสารประกอบชอบจะละลายในเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารประกอบดังกล่าวเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้า แต่ถ้าค่า K_x มีค่าน้อย แสดงว่าสารประกอบก็จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสอยู่กับที่และจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบจะมีผลทำให้เกิดการแยกสารประกอบนั้นในคอลัมน์ ใน elution chromatography สารประกอบซึ่งถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป และเมื่อทำการวัดความเข้มข้นของสารประกอบแต่ละชนิดที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ และนำค่าที่ได้ไปเขียนเป็นกราฟระหว่างปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ กราฟที่ได้คือโครมาโทแกรม ดังแสดงในภาพ 4



ภาพ 4 โครมาโทแกรมและค่าทางโครมาโทกราฟีของการแยกสารประกอบ

พารามิเตอร์พื้นฐานทางโครมาโทกราฟี

1. Retention time (t_R) เป็นเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาหรือชะล้างสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ คือเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนกระทั่งถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีกบนโครมาโทแกรมดังแสดงในภาพ 4

2. Corrected retention time (t'_R) คือ ระยะเวลาตั้งแต่ตำแหน่งจุดยอดพีกของ unretained compound ถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารตัวอย่างบนโครมาโทแกรม หรือระยะเวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในเฟสอยู่กับที่ ดังแสดงในภาพ 4 และสมการ 2.2

$$t'_R = t_R - t_M \qquad (2.2)$$

เมื่อ t'_R = เวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในเฟสอยู่กับที่

t_R = เวลาที่สารตัวอย่างเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่

t_M = เวลาที่ unretained compound เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่จะออกมาพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่

3. Capacity factor (k') เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ได้จากการคำนวณตามสมการ 2.3

เมื่อ $$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.3)$$

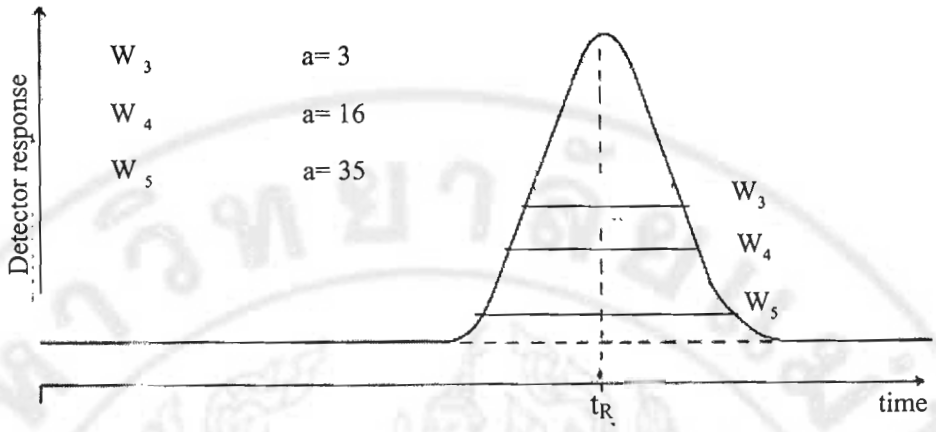
ค่า k' เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงลักษณะการทำงานของคอลัมน์ ปัจจัยที่มีผลต่อค่า k' คือองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง โดยทั่วไปค่า k' ของสารควรอยู่ระหว่าง 2-5

4. Selectivity factor (α) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันดีเพียงใด การแยกออกจากกันนี้ขึ้นอยู่กับค่า retention time หรือค่า k' เท่านั้น โดยไม่คำนึงถึงความกว้างของพีก แสดงดังสมการ 2.4

เมื่อ $$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (2.4)$$

ในการแยกสารค่า α จะต้องมีค่ามากกว่า 1 จึงจะมีการแยกเกิดขึ้น ถ้าค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าพีกทั้งสองทับกัน เนื่องจากพีกทั้งสองมีค่า retention time เท่ากัน ดังนั้นค่า α ที่เหมาะสมคืออยู่ในช่วง 1.5 – 4.0

5. Column efficiency คือประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากความกว้างของพีกที่ถูกชะออกมา ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี พีกแต่ละพีกที่ถูกชะออกมาจะต้องมีฐานที่แคบและแยกออกจากกันได้ ค่าที่ใช้วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวนเพลทของคอลัมน์ (number of theoretical plate, N) และความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ (height equivalent to a theoretical plate, H)



ภาพ 5 โครมาโทแกรมสำหรับการคำนวณค่า N

N เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพคอลัมน์ว่า คอลัมน์นั้นมีการบรรจุดีเพียงใด พิจารณาจากความกว้างขณะเคลื่อนผ่านคอลัมน์ โดยเปรียบเทียบความกว้างของพีกกับเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ (สมการ 2.5) คอลัมน์ใดที่มีค่า N สูง คอลัมน์นั้นจะมีประสิทธิภาพในการแยกดี

เมื่อ $N = a\left(\frac{t_R}{W}\right)^2$ (2.5)

N = number of theoretical plates

t_R = retention time ของสาร

W = ความกว้างของพีกที่ตำแหน่งความสูงที่กำหนด

a = ค่าคงที่ขึ้นกับวิธีการวัดความกว้างของพีกดังแสดงในภาพ 5

H เป็นระยะทางของคอลัมน์ หรือความสูงของเพลทที่เกิดการสมดุลของการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ (สมการ 2.6) จำนวน 1 ครั้ง ซึ่งค่า H นี้ ใช้เป็นพารามิเตอร์อีกตัวหนึ่งที่บอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยคอลัมน์จะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อค่า H ต่ำ

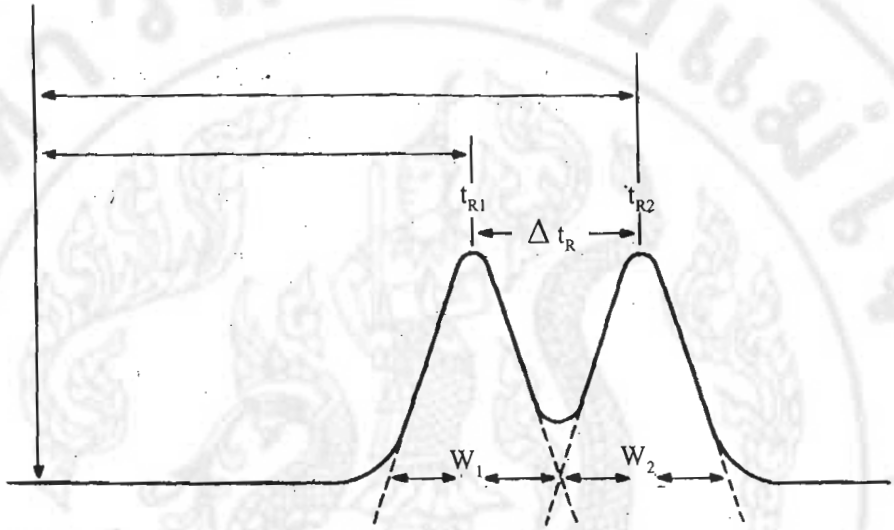
เมื่อ $H = \frac{L}{N}$ (2.6)

H = height equivalent of a theoretical plate

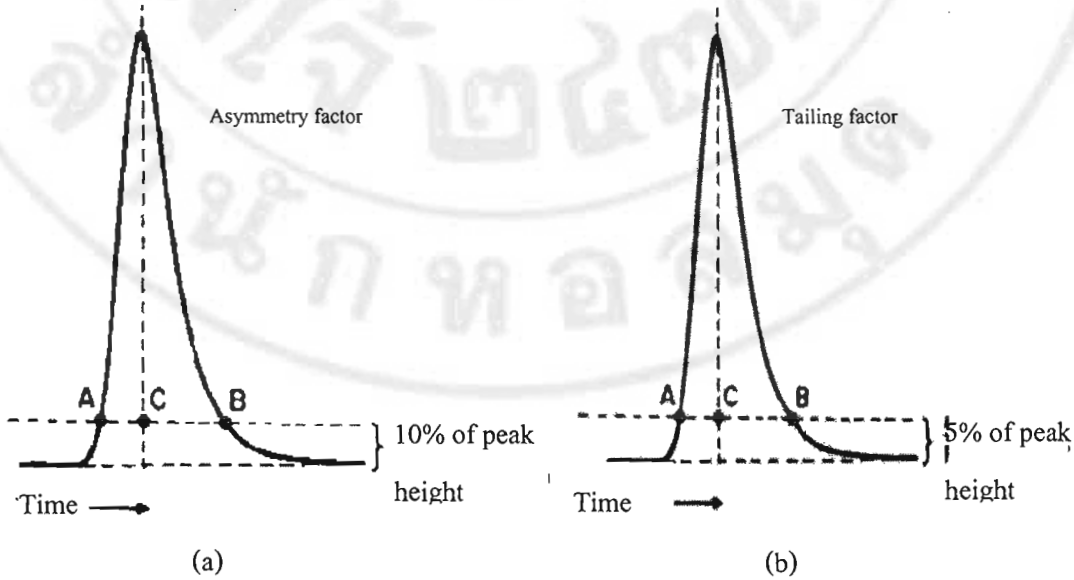
L = ความยาวของคอลัมน์

N = จำนวนเพลท

6. Resolution (R) เป็นค่าบ่งชี้ให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีกทั้งสอง คำนวณได้จากระยะห่างกันระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุดของพีกทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีกทั้งสองดังภาพ 6



ภาพ 6 โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่า R



ภาพ 7 โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่า asymmetry factor และ tailing factor

หมายเหตุ a = asymmetry factor และ b = tailing factor

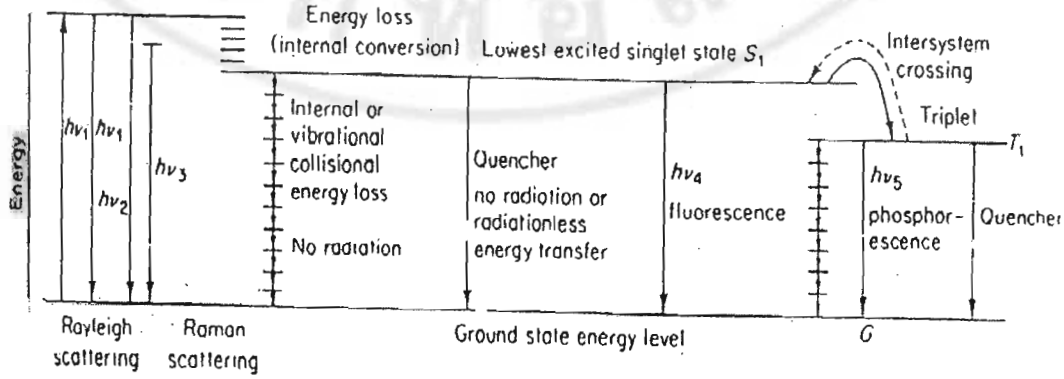
7. Peak asymmetry ความไม่สมมาตรของพีกเป็นค่าที่ใช้ในทางปฏิบัติในการบ่งชี้คุณภาพของคอลัมน์ คอลัมน์ที่มีอายุการใช้งานนาน ๆ เมื่อนำมาใช้ในการแยกจะทำให้พีกของสารที่แยกไม่สมมาตร อาจสังเกตเห็นว่าพีกมีหาง (tailing peak) พีกที่มีลักษณะเช่นนี้เป็นที่ไม่ต้องการเพราะจะทำให้หาพื้นที่ใต้พีกได้ไม่แน่นอน การวัดค่าความสมมาตรของพีกจะใช้อัตราส่วนความกว้างของพีกแต่ละส่วนที่แบ่งออกด้วยเส้นความสูงของพีก โดยใช้อัตราส่วนความกว้างพีกส่วนหน้าต่อส่วนหลัง ที่ระดับ 10 % ของความสูงพีกดังภาพ 7 การคำนวณแสดงดังสมการ 2.7 และ 2.8

เมื่อ asymmetry factor (ที่ระดับ 10 % ของความสูงพีก) = $\frac{BC}{AC}$ (2.7)

tailing factor (ที่ระดับ 5 % ของความสูงพีก) = $\frac{AC + BC}{2AC}$ (2.8)

ฟลูออเรสเซนซ์

เป็นผลที่เกิดขึ้นเนื่องจากโมเลกุลดูดกลืนพลังงานแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต แล้วโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นจะกลับสู่สถานะพื้น โดยการลดพลังงานในกระบวนการที่เรียกว่า การลดการกระตุ้น (deexciation) ซึ่งมีทั้งกระบวนการที่ไม่เกิดแสง (radiationless process) และกระบวนการที่เกิดแสง (radiation process) การกลับสู่สภาวะพื้นของอิเล็กตรอนจากชั้นพลังงานของการสั่นต่ำสุดของชั้นพลังงานกระตุ้นสถานะเดียว (singlet excited state) พร้อมคายพลังงานในรูปของแสง ซึ่งแสงดังกล่าวจะเกิดขึ้นเร็วมากใช้เวลาเพียง 10^{-7} ถึง 10^{-9} วินาที (Zolling, H., 1991; Willard, et al., 1998; Skoog, D. A. et al., 1998; Rouessac and Rouessac, 2000 ; ลาวัลย์, 2544; นิพนธ์ และคณิตา, 2547) กระบวนการเกิดฟลูออเรสเซนซ์แสดง ในภาพ 8



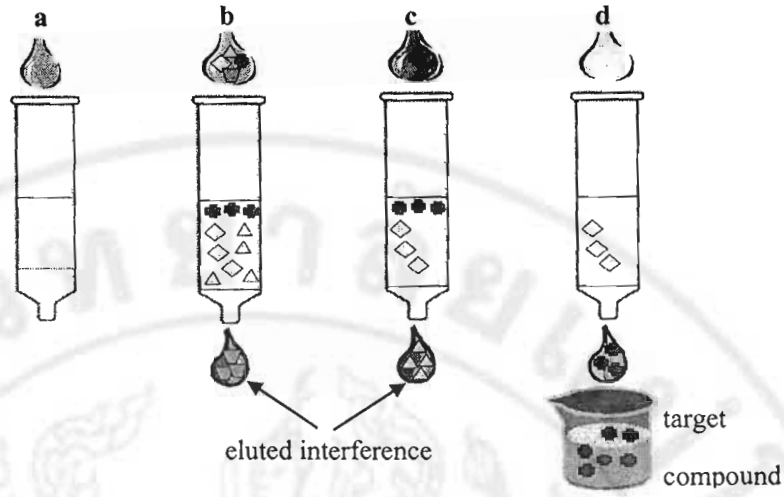
ภาพ 8 กระบวนการเกิดฟลูออเรสเซนซ์

ตั้งแต่ปี ค.ศ 1970 เป็นต้นมามีการพัฒนาเครื่องมือการวัดฟลูออเรสเซนซ์ชนิดต่างๆ อย่างรวดเร็ว เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางฟลูออโรเมตรีมีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี และมีการพัฒนาวิธีทางสเปกโทรโฟโตฟลูออโรเมตรีคู่ขนานไปกับการพัฒนาวิธีทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อใช้ร่วมกันในการเพิ่มความสามารถของการวิเคราะห์ (บุญส่ง, 2539)

การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE)

การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนหนึ่ง เนื่องจากสิ่งสกปรกในตัวอย่างสามารถทำให้คอลัมน์และระบบอุดตันได้ การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลามาก ประมาณได้เป็น 60 – 80 % ของเวลาทั้งหมดที่นักเคมีใช้ไปกับการวิเคราะห์ นอกเหนือจากเวลาที่เสียไปแล้วยังสูญเสียน้ำยาสารเคมีอีก ในการเตรียมตัวอย่างเทคนิคที่นิยมใช้กันมากคือ liquid – liquid extraction (LLE) โดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (Sithiporn Associates Co. Ltd, 2007)

Solid Phase extraction (SPE) เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้แทน LLE ได้โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก วิธีของ SPE มีหลักการคล้ายกับ LLE ตรงที่ใช้หลักการของ partition เหมือนกัน แต่ partition ไม่ได้เกิดระหว่างของเหลวกับของเหลว แต่เกิดจากระหว่างของแข็ง (absorption ที่อยู่ในแท่งของ SPE) กับของเหลว ข้อดีของ SPE คือ ลดปริมาณของน้ำยาเคมีที่ต้องใช้ ประหยัดเวลา ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้น้อยลงหรือเหลือขั้นตอนเดียว สามารถใช้กับระบบการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้ และสามารถเลือกใช้กับน้ำยาเคมีได้หลายชนิด ให้ความแม่นยำสูงเมื่อทำปริมาณวิเคราะห์ ไม่ทำให้เกิดปัญหาของการเกิดอิมัลชัน ดังนั้นจึงจะเห็นว่า SPE เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้สำหรับการทำความสะอาดตัวอย่างโดยการกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการออกไป หรือสำหรับการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากซับซ้อน และเหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ เป็นต้น (Christian, 1994; Mitra, 2003; Kellner et al., 2004; Biotage, 2008)



ภาพ 9 ขั้นตอนในการแยกด้วย SPE

หมายเหตุ a = condition, b = load , c = wash, d = elute

ขั้นตอนในการใช้ SPE มีขั้นตอนอยู่ 4 ขั้นตอนตามลำดับดังนี้คือ

1. การปรับสภาวะ (Condition) เป็นการเตรียม sorbent หรือ packing ที่บรรจุอยู่ในแท่ง SPE ให้พร้อมรองรับตัวอย่าง
2. การใส่ตัวอย่าง (Loading) เป็นการใส่ตัวอย่างลงไปเพื่อให้จับกับ sorbent
3. การล้าง (Washing) เป็นการขจัดเอาสารที่จับกับ sorbent ได้น้อยหรือจับกับอยู่ที่ผิวของ sorbent ออกไป
4. การชะ (Elution) เป็นการดึงเอาสารที่เราสนใจที่เกาะกับ sorbent ออก เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

ในการเลือกใช้ SPE นั้นขึ้นอยู่กับสารที่จะทำการวิเคราะห์ เช่น เป็นสารที่ละลายน้ำหรือไม่ละลายน้ำ (hydrophilic หรือ hydrophobic) ให้เลือก sorbent ที่มี polar ตรงกับสารจะทำการแยก ตัวอย่างเช่น ถ้าสารที่ละลายได้ดีในน้ำเป็นพวกที่มีประจุคือสามารถแตกตัวที่ค่า pH หนึ่ง ตัวอย่างนี้จะใช้ sorbent เป็น ion exchanger โดยใช้ anion เป็นต้น คุณสมบัติและการเลือกใช้ชนิดของ sorbent นั้นแสดงไว้ในตาราง 5

ตาราง 5 คุณสมบัติและการเลือกใช้ชนิดของแข็งดูดซับ

Sorbent หรือ Packing Material	**คุณสมบัติที่ผิว**	**ตัวอย่างการวิเคราะห์**
C_{18}	Hydrophobic bonded silica	แยกสาร hydrophobic ออกจากสารละลาย และ metabolite ของยา ในเลือด น้ำเหลืองและปัสสาวะ สารอินทรีย์ปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำ น้ำเสีย กรดอินทรีย์ ในพวกเครื่องดื่มและไวน์ Peptide ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย
C_8	Hydrophobic non polar bonded	แยกสาร hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous ใช้เมื่อต้องการให้สาร retain น้อยลงกว่าแบบ C18 Peptide ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย
Silica	Hydrophilic polar (Neutral)	แยกสารละลายที่มี polarity ต่ำ ถึงปานกลางออกจากสารละลาย non aqueous วิตามิน A D E K ยาฆ่าแมลง ไขมันชนิดต่าง ๆ สารสกัดจากธรรมชาติ pigment จากพืช สารอินทรีย์สังเคราะห์

ตาราง 5 (ต่อ)

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	ตัวอย่างการวิเคราะห์
Florisil	Hydrophilic polar (Slightly basic)	แยกสารละลายที่มี polarity ต่ำ ถึงปานกลางออกจากสารละลาย non aqueous ตัวอย่างที่มีไขมันสูง ยาฆ่าแมลง สาร polychlorinated biphenyls ใน transformer oil
Alumina A	Hydrophilic polar (Acidic)	แยกสาร hydrophilic ออกจากสารละลาย non aqueous มีสมบัติเป็น cation exchanger เล็กน้อย แยกน้ำตาล คาเฟอีน ในประเภทโคลา วิตามินในอาหารและอาหารสัตว์ สารผสมในอาหาร และอาหารสัตว์
Alumina N	Hydrophilic polar (Neutral)	แยกสาร hydrophilic ออกจากสารละลาย non aqueous ยาฆ่าแมลง ปิโตรเลียมและน้ำมัน สารผสมในอาหาร พวกอินทรีย์สังเคราะห์

ตาราง 5 (ต่อ)

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	ตัวอย่างการวิเคราะห์
Alumina B	Hydrophilic polar (Basic)	แยกสาร hydrophilic ออกจากสารละลาย non aqueous มีสมบัติเป็น cation exchange เล็กน้อย ยาฆ่าแมลง พวก steroid ต่าง ๆ
Aminopropyl NH_2	Hydrophilic moderately polar	ใช้เป็น weak anion exchanger ยาและ metabolite ของยา อุตสาหกรรมปิโตรเลียม สาร phenol และ pigment กลุ่ม phenolic
Diol (HLB)	Hydrophobic moderately non polar neutral phase	วิเคราะห์สารที่ละลายใน aqueous หรือ organic ยาปฏิชีวนะ

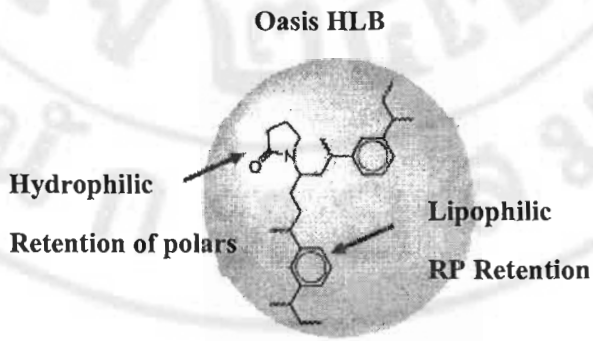
ที่มา: Sithiporn Associates Co. Ltd (2007)

เฟสของแข็งชนิด hydrophilic lipophilic (HLB)

HLB เป็นเฟสของแข็งชนิดหนึ่ง ลักษณะของตัว sorbent ประกอบด้วยส่วนที่มีประจุและไม่มีประจุรวมอยู่ด้วยกันเรียกโครงสร้างดังกล่าวว่า hydrophilic lipophilic ดังแสดงในภาพ 10 จึงทำให้มีความสามารถหน่วงจับกับสารทั้งที่มีโครงสร้างที่ไม่มีประจุและมีประจุได้ดี คุณสมบัติทั่วไปแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 คุณสมบัติทั่วไปของเฟสของแข็งชนิด HLB

คุณสมบัติ	ลักษณะ
1. ช่วงความเป็นกรดด่างที่ใช้งาน	0-14
2. ขนาดอนุภาค (particle size)	30 μm
3. ขนาดรูพรุน (pore size)	80 Å



ภาพ 10 โครงสร้างของเฟสของแข็งชนิด HLB Oasis

ที่มา: Water Corporation (2003)

สรุปสาระสำคัญจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ได้มีงานวิจัยหลายงาน ที่ได้ทำการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะของกลุ่มสารเตตราซัยคลิน ในตัวอย่างที่หลากหลายด้วยกัน เช่น ในตัวอย่างของอาหาร น้ำนม เนื้อสัตว์ต่างๆ ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านวัตถุดิบของยาปฏิชีวนะ รวมถึงในน้ำผึ้ง ดังสรุปไว้ในตาราง 7 ซึ่งเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์นั้นจะเป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดแบบต่างๆ เมื่อรวมกับวิธีการเตรียมตัวอย่างให้มีความเหมาะสมกับลักษณะของตัวอย่างนั้นๆ จะทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของกลุ่มสารเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันไป ดังเช่น Nakazawa et al. (1999) ได้ทำการตรวจหาปริมาณสารกลุ่มสารเตตราซัยคลินที่ตกค้างในอาหาร โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยการตรวจวัดแบบ API-LC-MS-MS ซึ่งหลังจากทำการสกัดสารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านสารละลายที่สกัดได้ลงในคอลัมน์ชนิด Bond Elute ENV ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินได้ในระดับต่ำสุดเท่ากับ 0.001 ถึง 0.004 พีพีเอ็ม

ในส่วนของน้ำนมนั้น Cinquina et al. (2003) ได้วิเคราะห์สารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน โดยทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านสารละลายตัวอย่างในบัฟเฟอร์ McIlvaine ผ่านลงในคอลัมน์ชนิด Hydrophilic – lipophilic balance Oasis แล้วทำการวิเคราะห์สารสกัดที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้เครื่องตรวจวัดเป็นโฟโตไดโอด อเรย์ ในช่วงความยาวคลื่นเท่ากับ 365 นาโนเมตร จากวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดได้ในช่วง 113.2 – 127.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Furasawa (2003) ได้นำตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำผ่านลงในคอลัมน์ชนิด C_8 หลังจากนั้นชะเอาสารกลุ่มเตตราซัยคลินออกมาจากคอลัมน์ด้วยน้ำ แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต จากวิธีดังกล่าวสามารถทำให้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินได้ในระดับต่ำสุดเท่ากับ 0.1ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วยให้ประหยัดการใช้สารเคมีได้มาก Spisso et al. (2007) ได้ทำการพัฒนาการวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยใช้เทคนิคของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากทำการสกัดตัวอย่างนมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine แล้วนำสารละลายที่ได้ให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแมกนีเซียมแล้วจึงทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยฟลูออเรสเซนซ์ จากวิธีการดังกล่าวสามารถทำให้ตรวจวัดสารกลุ่มดังกล่าวได้ในปริมาณต่ำสุดอยู่ในช่วง 5–35

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคของ On line SPE–FIA โดย ปริญญา (2550) ซึ่งวิธีการดังกล่าวทำให้ประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์

Senyuva et al. (2000) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกซีเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ โดยสกัดสารตกค้างด้วยสารละลายผสมของกรดซิตริก กรดไนตริก และ เมธานอล แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วย วิธีการตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่นเท่ากับ 360 นาโนเมตร จากวิธีดังกล่าว สามารถทำให้ตรวจวิเคราะห์สารออกซีเตตราซัยคลินได้ในระดับต่ำสุดเท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัม หรืออาจร่วมด้วยการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction) เพื่อให้สารมีความ บริสุทธิ์ขึ้น (purification) ดังเช่น Sokol and Matisova (1994) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ในเนื้อเยื่อสัตว์ โดยเมื่อทำการปั่นเหวี่ยง ตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์ McIlvaine–EDTA แล้วทำการสกัดด้วยสารละลายผสมของเฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน เมื่อนำสารละลายที่สกัดได้ผ่านลงในคอลัมน์ชนิด Separcol SI C_{18} หลังจากนั้นทำการ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบ อัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่นเท่ากับ 360 นาโนเมตร จากวิธีดังกล่าวสามารถทำให้ตรวจ วิเคราะห์สารออกซีเตตราซัยคลินได้ในระดับต่ำสุดเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับใน เนื้อไก่นั้น Schneider et al. (2007) ได้ทำการสกัดเอาสารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยสารละลายผสม ของอะซิโทไนไทรล์ สารละลายซิเตรต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 150 มิลิโมลาร์ (mM) แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้เครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำสุดได้ในช่วง 1-1.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของสารปฏิชีวนะที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมนั้น สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ (2005) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หา ปริมาณสารออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในน้ำโดยสารปฏิชีวนะดังกล่าวถูก สกัดด้วยสารดูดซับ C_{18} แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะ สูง ร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่นเท่ากับ 360 นาโนเมตร ในส่วนของดินนั้น Blackwell et al. (2004) ได้ทำการสกัดเอาสารปฏิชีวนะที่ตกค้างอยู่ โดยนำ ตัวอย่างดินที่อยู่ในสารละลายผสมของเมธานอลและสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine–EDTA ผ่าน การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonic) หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปสกัดด้วยสารดูดซับ Isolute SAX anion exchange แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง โดยใช้เครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ที่ระดับ

ความเข้มข้นต่ำเท่ากับ 18 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือหลังจากทำการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และผ่านการสกัดด้วยสารดูดซับของแข็ง (SPE) และทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยแมสสเปกโทรเมทรี (LC-MS-MS) ทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดได้ในช่วง 0.001–0.003 ไมโครกรัมต่อลิตร (Sung-Chul and Kenneth, 2007)

Lu et al. (2004) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ (potency) ของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วยการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งใช้ระบบของสารตัวพาเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ EDTA และแคลเซียมคลอไรด์ พีเอชเท่ากับ 8.10 และใช้เฟสคงที่เป็นคาร์บอน 18 จากสภาวะดังกล่าวทำให้สามารถตรวจวัดกลุ่มสารดังกล่าวได้ระดับต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 0.1–0.4 ไมโครกรัมต่อลิตร หรือใช้ระบบของสารตัวพาผสมของสารละลายบัฟเฟอร์ออกซาลิก pH เท่ากับ 2.0 กับ อะซิโทไนไทรล์ ร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ จะทำให้สามารถตรวจวัดกลุ่มสารดังกล่าวได้ระดับต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 0.25-50 นาโนกรัม (Pena et al., 1998) สำหรับเทคนิค FIA นั้น Couto et al. (1998) ได้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์กลุ่มสารเตตราซัยคลิน ร่วมด้วยการตรวจวัดแบบศักย์ไฟฟ้า (potentiometry) โดยใช้กระแสตัวพาเป็นสารละลายโปแทสเซียมไนเตรตเข้มข้น 0.1 โมลาร์และให้สารกลุ่มเตตราซัยคลินทำปฏิกิริยากับไอออนของคอปเปอร์ก่อนที่จะทำการวัดศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้น โดยวิธีการดังกล่าวทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินได้ในช่วงความเข้มข้น 4.8–51.5 $x10^3$ พีพีเอ็ม

ในน้ำผึ้งนั้นก็ได้มีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน โดยใช้การทดสอบเบื้องต้น (Salter, 2003; Alfredsson, et al., 2005; Weigel and Gaterman, 2005) จากวิธีดังกล่าวทำให้ลดระยะเวลาในการตรวจสอบลงได้และตรวจได้ในระดับ 10–25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีดังเช่น Vinas et al. (2004) ทำการตรวจสอบ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน มิโนซัยคลิน เมตาซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน โดยสกัดสารกลุ่มดังกล่าวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine–EDTA นำสารลาย ที่สกัดได้ผ่านลงในคอลัมน์ชนิด Discovery DSC-phenyl หลังจากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต จากวิธีดังกล่าวสามารถทำให้ตรวจวิเคราะห์กลุ่มสารดังกล่าวได้ในระดับต่ำสุดในช่วง 15–30ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือ Wan et al. (2005) ทำการตรวจสอบออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และเมตาซัยคลิน โดยสกัดสารกลุ่มดังกล่าวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 2 เปอร์เซ็นต์กรดซิตริก และสารละลายฟอสเฟต

นำสารลายที่สกัดได้ผ่านลงในคอลัมน์ชนิด XAD-2 หลังจากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบเคมิลูมิเนสเซนต์จากวิธีดังกล่าวสามารถทำให้ตรวจวิเคราะห์กลุ่มสารดังกล่าวได้ในระดับต่ำสุดเท่ากับ 5.0 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับ Pena et al. (2005) ทำการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยใช้เทคนิคของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมด้วยวิธีการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยหลังจากสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine–EDTA แล้วนำสารสกัดที่ได้ผ่านลงในเฟสของแข็ง ก่อนที่จะนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในปริมาณต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 20–45 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือหลังจากทำการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และผ่านการสกัดด้วยสารดูดซับของแข็ง (SPE) และทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยแมส สเปกโทรเมตรี (LC-MS-MS) ทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดได้ในช่วง 5-10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Li et al., 2008) หรือใช้การตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วย LC-ESI-MS-MS ทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดได้น้อยกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Wang et al., 2008) หรือทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคของโฟลอินเจคชันโดยให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน กับ N-bromosuccinimide จากวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในปริมาณต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 0.05-0.3 ไมโครกรัม (Halvatzis et al., 1993)

ตาราง 7 สรุปวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเตตร้าซัยคลิน

วิธีการที่	ประเภทตัวอย่าง	ชนิดสารที่วิเคราะห์	วิธีการเตรียมตัวอย่าง		เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้	เอกสารอ้างอิง
			สกัดด้วย	ชนิดของ SPE			
1	อาหาร	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine	Bond elute ENV	API-LC-MS-MS	0.001-0.004 ppm	Nawazawa et at. (1999)
2	น้ำนม	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine	HLB	HPLC-DAD	113.2-127.2 µg/kg	Cinquina et at. (2003)
3	น้ำนม	กลุ่มเตตราซัยคลิน	เจือจางด้วยน้ำ DI	C_8	HPLC-DAD	0.1 µg/mL	Furusawa (2003)
4	น้ำนม	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine	-	HPLC-FLD	5-35 µg/kg	Spisso et al. (2007)
5	น้ำนม	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine	C_{18}	On line SPE-FIA	0.078-0.105 mg/L	ปริญญา (2550)
6	เนื้อสัตว์	ออกซีเตตราซัยคลิน	สารละลายผสมของกรดไนตริก กรดซิตริก และเมธานอล	-	HPLC-DAD	8 µg/kg	Senyuva et al. (2000)
7	เนื้อสัตว์	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine-EDTA	Separcol SI C_{18}	HPLC-DAD	50 µg/kg	Sokol et al. (1994)
8	เนื้อไก่	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายผสม อะซิโทไนไทรล์ ซิเตรท และแมกเซียมคลอไรด์	-	HPLC-FLD	1-1.5 µg/kg	Schneider et al. (2007)
9	น้ำ	กลุ่มเตตราซัยคลิน	-	C_{18}	HPLC-DAD	-	สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูถัมภ์ (2550)
10	ดิน	ออกซีเตตราซัยคลิน	สารละลายผสม เมธานอลและ McIlvaine –EDTA	Isolute SAX anion exchange	HPLC-FLD	18 µg/kg	Blackwell et al., 2004
11	น้ำ	เตตราซัยคลิน	สารละลายผสม McIlvaine กับ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	-	LC-MS-MS	0.001-0.003 µg/L	Sung-Chul and Kenneth (2007)

ตาราง 7 (ต่อ)

วิธีการที่	ประเภทตัวอย่าง	ชนิดสารที่วิเคราะห์	วิธีการเตรียมตัวอย่าง		เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้	เอกสารอ้างอิง
			สกัดด้วย	ชนิดของ SPE			
12	ยา	กลุ่มเตตราซัยคลิน	-	-	HPLC-FLD	0.1-0.4 µg/L	Lu et al. (2004)
13	ยา	กลุ่มเตตราซัยคลิน	-	-	HPLC-FLD	0.25-50 ng	Pena et al. (1998)
14	ยา	กลุ่มเตตราซัยคลิน	-	-	FIA	4.8 -51.5 x 10^3 ppm	Couto et al. (1998)
15	น้ำผึ้ง	กลุ่มเตตราซัยคลิน	-	-	Test kit	10-25 µg/kg	Alfredsson et al. (2005)
16	น้ำผึ้ง	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine-EDTA	Discovery DSC-phenyl	HPLC-DAD	15-30 µg/kg	Vinas et al. (2004)
17	น้ำผึ้ง	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายผสม กรดซิตริก และฟอสเฟต	XAD-2	HPLC-CL	5 µg/L	Wan et al. (2005)
18	น้ำผึ้ง	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine-EDTA	HLB and bond elute LRC-PRS	HPLC-FLD	20 – 45 µg/kg	Pena et al. (2005)
19	น้ำผึ้ง	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายผสมเมตาฟอสฟอริกเอซิกและเมธานอล	HLB,C_{18}	LC-MS-MS	5-10 µg/kg	Li et al. (2008)
20	น้ำผึ้ง	กลุ่มเตตราซัยคลิน	สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine-EDTA	-	LC-ESI-MS-MS	0.1 µg/kg	Wang (1998)
21	น้ำผึ้ง	กลุ่มเตตราซัยคลิน	-	-	FIA-CL	0.05-0.3 µg	Halvatzis et al. (1993)

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณของ ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในน้ำผึ้ง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสมที่ให้ความถูกต้อง แม่นยำสูง รวมถึงใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่น้อยลง ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวประกอบไปด้วย การหาสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE) และการหาความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) ปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ของสารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง หลังจากนั้นจึงนำวิธีการทดสอบวิเคราะห์ที่ได้มาทดสอบหาปริมาณของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในตัวอย่างของน้ำผึ้ง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างของน้ำผึ้งที่วางขายในจังหวัดเชียงใหม่ มีรายละเอียดดังนี้

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงในตาราง 8 และ 9 ตามลำดับ

ตาราง 8 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ/อุปกรณ์	รุ่น	ยี่ห้อ	ประเทศ
1. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	HP-1100	Agilent	สหรัฐอเมริกา
2. เครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence detector)	HP-1100	Agilent	สหรัฐอเมริกา
3. Luminescence Spectrometer	LS50B	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
4. คอลัมน์ชนิดคาร์บอน 8 (4.6 x 250 mm) ชนิด Eclipse XDB-C8	-	Agilent	สหรัฐอเมริกา
5. คอลัมน์ชนิดคาร์บอน 18 (4.6 x 150 mm) ชนิด Luna C_{18}	-	Phenomenex	สหรัฐอเมริกา
6. คอลัมน์ชนิดคาร์บอน 18 (4.6 x 250 mm) ชนิด Lichrosphere	-	Agilent	สหรัฐอเมริกา

ตาราง 8 (ต่อ)

อุปกรณ์	รุ่น	ยี่ห้อ	ประเทศ
7. เฟสของแข็ง (solid phase extraction) ชนิด Sep-pak (C18), 1000 mg/6 cm^3	-	Water	สหรัฐอเมริกา
8. เฟสของแข็ง (solid phase extraction) ชนิด Water oasis (HLB), 200 mg/6 cm^3	-	Water	สหรัฐอเมริกา
9. เฟสของแข็ง (solid phase extraction) ชนิด แคทไอออน, 500 mg/10 mL	-	Vetipak™ SCX-2	สหรัฐอเมริกา
10. ตู้อบความร้อน (oven)	UE 400	Memmert	เยอรมัน
11. Refractometer	RFM-830	Bellingham	สหรัฐอเมริกา
12. Spectrometer	8453 UV-Visible	Agilent	สหรัฐอเมริกา
13. pH-meter	Seveneasy	Mettler Toledo	สวิตเซอร์แลนด์
14. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-S	Mettler Toledo	สวิตเซอร์แลนด์

ตาราง 9 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	เกรด	ความบริสุทธิ์	บริษัท	ประเทศ
1. Ammonia solution	GR for analysis	25%	Merck	เยอรมัน
2. Acetic acid	for synthesis	99%	BDH	อังกฤษ
3. Calcium chloride	reagent	99%	Merck	เยอรมัน
4. Chlortetracycline hydrochloride	HPLC	> 80%	Sigma	สหรัฐอเมริกา
5. Citric acid monohydrate	reagent	99.5%	Fisher	อังกฤษ
6. Disodium ethylenediaminetetraacetate	USP	99%	Sigma	สหรัฐอเมริกา
7. Disodium hydrogen phosphate	reagent	99%	Merck	เยอรมัน
8. Doxycycline dehydrate	HPLC	98%	Fulka	สวิตเซอร์แลนด์
9. Methanol	HPLC	99.9	Merck	เยอรมัน

ตาราง 9 (ต่อ)

สารเคมี	เกรด	ความบริสุทธิ์	บริษัท	ประเทศ
10. Oxytetracycline dehydrate	HPLC	> 97%	Sigma	สหรัฐอเมริกา
11. Phosphoric acid	extra pure	85%	Merck	เยอรมัน
12. Sodium acetate	reagent	99%	Merck	เยอรมัน
13. Tetracycline hydrochloride	HPLC	> 95%	Sigma	สหรัฐอเมริกา
14. น้ำปราศจากไอออน	18 mΩ	-	-	-

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 สารละลายสำหรับเจือจางสารมาตรฐาน

1.1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ A pH 8.1

ชั่งโซเดียม อะซิเตต 1.02 กรัม EDTA 1.86 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 1.10 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่เตรียมได้ไปปรับ pH ให้เท่ากับ 8.1 ด้วยสารละลายแอมโมเนีย เติมเมธานอลปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

1.1.2 สารละลายบัฟเฟอร์ B pH 8.1

ชั่งโซเดียม อะซิเตต 0.41 กรัม EDTA 0.74 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่เตรียมได้ไปปรับ pH ให้เท่ากับ 8.1 ด้วยสารละลายแอมโมเนีย เติมเมธานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

1.2 เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

1.2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ C (10 mM $CaCl_2$) pH 8.1

เตรียมเหมือนกับสารละลายบัฟเฟอร์ B pH 8.1 ข้อ 1.1.2 แต่เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.44 กรัม

1.2.2 สารละลายบัฟเฟอร์ D (25 mM $CaCl_2$) pH 8.1

เตรียมเหมือนกับสารละลายบัฟเฟอร์ A pH 8.1 ข้อ 1.1.1

1.3 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดที่พีเอชต่างๆ

1.3.1 สารสกัดบัฟเฟอร์ (0.1 M Na_2EDTA – McIlvaine pH 3.0)

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 14.2 กรัม และ กรดซิตริกโมโนไฮเดรต 10.51 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 3.0 ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก แล้วเติม EDTA ลงไป 30.24 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

1.3.2 สารสกัดบัฟเฟอร์ (0.1 M Na_2EDTA–McIlvaine pH 4.0)

เตรียมเหมือนกับสารสกัดบัฟเฟอร์ (0.1 M Na_2EDTA-McIlvaine pH 3.0) แต่ปรับพีเอชเป็น 4.0

1.3.3 สารสกัดบัฟเฟอร์ (0.1 M Na_2EDTA – McIlvalene pH 6.0)

เตรียมเหมือนกับสารสกัดบัฟเฟอร์ (0.1 M Na_2EDTA–McIlvaine pH 3.0) แต่ปรับพีเอชเป็น 6.0

2. การเตรียมสารมาตรฐาน

2.1 สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน อย่างละ 100 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยเมธานอล ในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน จากข้อ 2.1 มาอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A จากข้อ 1.1.1 ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.3 สารละลายมาตรฐานผสม ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางด้วยสารละลายต่างๆ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน แต่ละชนิด จากข้อ 2.1 มา 0.1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B จากข้อ 1.1.2 แล้วเตรียมทำนองเดียวกันอีก 1 ขวด แต่เจือจางด้วยเมธานอล

3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยศึกษาตัวแปรทางกายภาพและทางเคมี

เมื่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลิน เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียมในสภาวะด่างจะทำให้สามารถเรืองแสงได้ดีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นของยูวี –วิสิเบิล (Lu et al., 2004) ดังนั้นจึงใช้คุณสมบัติดังกล่าวในการตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลินร่วมด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยจะทำการเปรียบเทียบและเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้สามารถแยกวิเคราะห์สารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ซึ่งพิจารณาจากชนิดของคอลัมน์ (stationary phase) สำหรับการแยกที่บรรจุด้วยเฟสที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยก ชนิดของตัวพา (mobile phase) ในการชะที่เหมาะสม อัตราส่วนผสมของตัวพา (mobile phase) สำหรับการชะที่เหมาะสมและอัตราการไหลของตัวพาที่เหมาะสม ที่ทำให้สามารถแยกวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินได้

3.1 การหาค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (excitation wavelength, Ex) และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสง (emission wavelength, Em) ที่เหมาะสมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินและความเสถียรของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลิน

นำสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินจากข้อ 2.2 ไปสแกนหาค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสง ด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ดังนี้

3.1.1 ตั้งค่า excitation ชั่วคราวที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร แล้วสแกนหา emission spectrum ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ emission ชั่วคราว

3.1.2 ตั้งค่า emission ชั่วคราวที่ได้จากข้อ 1 แล้วสแกนหา excitation spectrum ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ excitation ที่ถูกต้อง

3.1.3 ตั้งค่า excitation ที่ได้จากข้อ 2 แล้วสแกนหา emission spectrum ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้ได้ emission ที่ถูกต้อง

3.2 การศึกษาความเสถียรของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+})

นำสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน จากข้อ 2.2 ไปวัดหาค่า intensity ที่ ณ เวลาต่างๆ โดยใช้ค่าของ excitation และemission ที่สแกน ได้จากข้อ 3.1 ที่เวลา 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที

3.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์

นำสารละลายมาตรฐานจากข้อ 2.3 ที่เจือจางด้วยเมธานอล มาทดลองทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ด้วยสภาวะที่แสดงในตาราง 10

ตาราง 10 สภาวะที่ใช้ในการฉีดวิเคราะห์สาร ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Parameter	สภาวะที่ 1			
1. Column	Phenomenex C_{18} , 4.6 mm x 5 µm x 150 mm			
2. Mobile phase	สารละลายบัฟเฟอร์ A (บัฟเฟอร์ C 10 mM $CaCl_2$, pH 8.1และสารละลายบัฟเฟอร์ B (บัฟเฟอร์ D 25 mM $CaCl_2$, pH 8.1)			
3. Column temperature (°C)	30 °C			
4. Flow rate	1.0 mL/min			
5. Gradient elution	**บัฟเฟอร์ A**	**บัฟเฟอร์ B**	**Gradient**	
			Time (min)	**%B**
	บัฟเฟอร์ C	บัฟเฟอร์ D	0	50
	10 mM $CaCl_2$, pH 8.1	25 mM $CaCl_2$, pH 8.1	5	100
			20	100
6. Injection volume	20 µL			
7. FLD detector	Ex = 393, Em = 518 nm			

หมายเหตุ สภาวะที่ 2 3 และ 4 เหมือนกับสภาวะที่ 1 แต่ใช้คอลัมน์ Lichrosphere C_{18}, 4.6 mm x 5 µm x 250 mm, Phenomenex C_{18}, 4.6 mm x 5 µm x 150 mm และ Eclipse C_8, 4.6 mm x 5 µm x 150 mm ตามลำดับ ส่วนอัตราการไหลที่สภาวะที่ 2 3 และ 4 เท่ากับ 1.0 0.5 และ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

3.4 การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายสารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลิน

นำสารละลายมาตรฐานจากข้อ 2.3 ที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B และเมธานอล ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยสภาวะที่ทดลองได้จากข้อ 3.3 นำผลการฉีดวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบโดยทำการเปรียบเทียบจากพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ พื้นที่ใต้พีก (peak area) ความสูงของพีกที่ได้ (peak height), (k), tailing, symmetry, resolution, ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (%RSD) ของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการฉีดวิเคราะห์ซ้ำ (คำนวณดังสมการ 3.1 และ 3.2)

โดย

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (3.1)$$

$$\%\,RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \qquad (3.2)$$

เมื่อ x_i = ค่าของพื้นที่ใต้พีกของการฉีดแต่ละครั้ง

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีก

n = จำนวนครั้งของการฉีด

3.5 การสร้างกราฟมาตรฐานสารกลุ่มเตตราซัยคลิน

ทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานผสมของสารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลินจากข้อ 2.1 ให้อยู่ในช่วงของความเข้มข้น 0.5 ถึง 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B ข้อ 1.1.2 นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไปฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยสภาวะที่ทดลองได้จากข้อ 3.3 นำผลการทดลองที่ฉีดวิเคราะห์ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีกที่ได้และหาความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ได้ จากสมการ 3.3

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}} \qquad (3.3)$$

4. การศึกษาหาวิธีการสกัดกลุ่มสารเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง

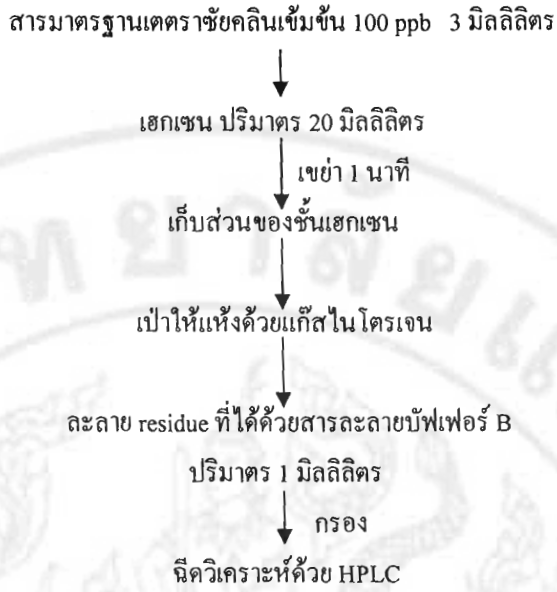
ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถแยกวิเคราะห์สาร ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ในตัวอย่างน้ำผึ้ง แล้วทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยพิจารณาจากการเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัด การเลือกใช้ชนิดเฟสของแข็ง (SPE packing) ที่เหมาะสม การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม และการเลือกใช้ปริมาณตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยมีรายละเอียดในการทดลองดังต่อไปนี้

4.1 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดระหว่าง LLE และ การสกัดแบบเฟสของแข็งชนิด C_{18} และ HLB

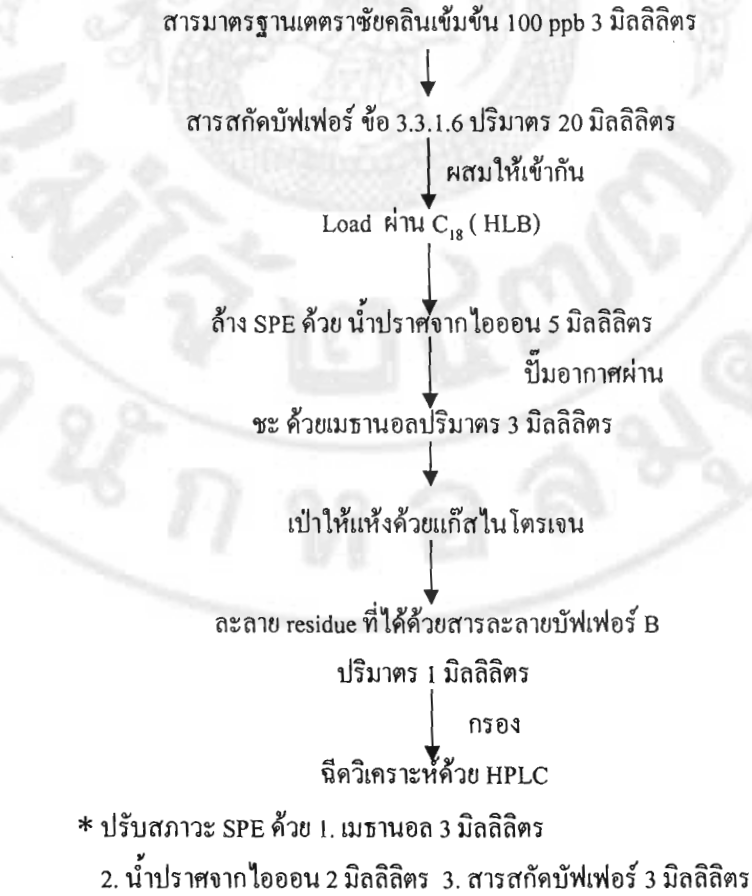
ทำการสกัดตัวอย่างโดยใช้น้ำปราศจากไอออน 3 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารมาตรฐานผสม ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/mL แล้วทำการสกัดแบบ liquid liquid extraction ด้วยเฮกเซน แสดงดังภาพ 11 และการสกัดโดยเฟสของแข็งสองชนิดคือ แบบ HLB และ C_{18} วิธีการสกัดนั้นแสดงไว้ดังภาพ 12 หลังจากนั้นนำสารที่สกัดได้มาฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยสภาวะที่ทดลองได้จากข้อ 3.3 นำผลการฉีดวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบโดยพิจารณาจากร้อยละของการกลับคืน (%recovery) จากสมการ 3.4

โดย

$$(\%\text{recovery}) = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นที่เติมลงไป}} \times 100 \qquad (3.4)$$



ภาพ 11 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างแบบ liquid liquid extraction



* ปรับสภาวะ SPE ด้วย 1. เมธานอล 3 มิลลิลิตร

2. น้ำปราศจากไอออน 2 มิลลิลิตร 3. สารสกัดบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร

ภาพ 12 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างด้วยเฟสของแข็ง

4.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) การสกัดด้วย SPE packing ชนิด HLB

ทำการศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่ใช้ในการสกัด ชนิดของสารละลายที่ใช้ในการล้างเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารกลุ่มเตตราซัยคลินออกจากเฟสของแข็ง โดยวิธีออกแบบการทดลอง (experimental design) แบบ 2level full factorial design พารามิเตอร์ศึกษาแสดงตาราง 11 ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม Unscrambler 9.7 (Camo, Norway) software ออกแบบวิธีการทดลอง และรายละเอียดของการทดลองแสดงในตาราง 12 วิธีการสกัดน้ำปราศจากไอออน 3 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารมาตรฐานผสมออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/mL โดยนำตัวอย่างสกัดตามขั้นตอนและสภาวะของการสกัดที่ได้ออกแบบดังตาราง 3.5 หลังจากนั้นนำสารที่สกัดได้ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยสภาวะที่ทดลองได้จากข้อ 3.3 นำผลการฉีดวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบโดยพิจารณาจากร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ดังสมการ 3.4

ตาราง 11 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัด SPE โดยวิธีออกแบบการทดลองแบบ 3 factor 2 level factorial design

Parameter	**Studied ranges**		
	Low value	**High value**	**Reference (Pena et al., 2005)**
pH	3	6	4
wash	5 % MeOH	5 % ACN	H_2O
eluent	MeOH	DMF: IPA (80:20)	MeOH

ตาราง 12 สภาวะที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างน้ำปราศจากไอออน ด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB

No.	label	Parameter		
		pH of buffer	Washing solvent	elute
1	C1a	3	H_2O	MeOH
2	C1b	3	H_2O	MeOH
3	C2a	3	5% MeOH	MeOH
4	C2b	3	5% MeOH	MeOH
5	C3a	3	5% ACN	MeOH
6	C3b	3	5% ACN	MeOH
7	C4a	3	H_2O	DMF:IPA (80:20)
8	C4b	3	H_2O	DMF:IPA (80:20)
9	C5a	3	5% MeOH	DMF:IPA (80:20)
10	C5b	3	5% MeOH	DMF:IPA (80:20)
11	C6a	3	5% ACN	DMF:IPA (80:20)
12	C6b	3	5% ACN	DMF:IPA (80:20)
13	C7a	6	H_2O	MeOH
14	C7b	6	H_2O	MeOH
15	C8a	6	5% MeOH	MeOH
16	C8b	6	5% MeOH	MeOH
17	C9a	6	5% ACN	MeOH
18	C9b	6	5% ACN	MeOH
19	C10a	6	H_2O	DMF:IPA (80:20)
20	C10b	6	H_2O	DMF:IPA (80:20)
21	C11a	6	5% MeOH	DMF:IPA (80:20)
22	C11b	6	5% MeOH	DMF:IPA (80:20)
23	C12a	6	5% ACN	DMF:IPA (80:20)
24	C12b	6	5% ACN	DMF:IPA (80:20)
25	Reference 1	4	H_2O	MeOH
26	Reference 1	4	H_2O	MeOH
27	Reference 1	4	H_2O	MeOH

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation of metohd) ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผ่านการเติมสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สามระดับ นำมาสกัดตามวิธีที่ได้จากการทดลองที่ 4.2 นำสารสกัดที่ได้ไปฉีดวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์

5.1 ศึกษาหาความถูกต้อง ความแม่นยำ ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง

เติมสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลินให้มีระดับความเข้มข้น 50 100 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่างน้ำผึ้ง 3.0 กรัม นำน้ำผึ้งที่ผ่านการเติมสารมาตรฐานลงไปสกัดตามขั้นตอนดังภาพ 13 นำสารที่สกัดได้ไปฉีดวิเคราะห์เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกประมวลผล โดยพิจารณาจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ความถูกต้อง ความแม่นยำ ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ ตามสมการ 3.5 และ 3.6

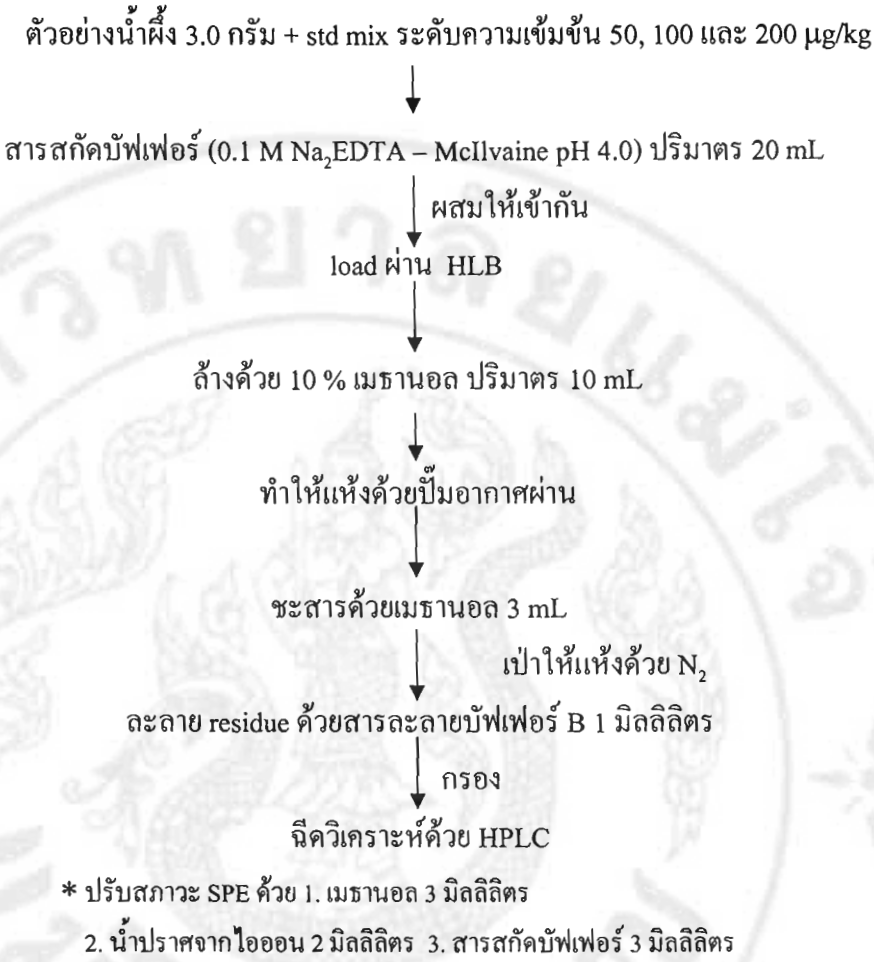
โดย

$$LOD = 3\ SD_0 \quad (3.5)$$

$$LOQ = 10\ SD_0 \quad (3.6)$$

เมื่อ SD_0 = จุดตัดแกน Y ที่ได้จากการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงไป กับค่า SD ที่ได้ของแต่ละความเข้มข้น

โดยเกณฑ์มาตรฐานของ Eurachem (Eurachem Guide, 1998) และ Codex (Codex alimentarius, 2003) กำหนดให้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-0.1 mg/kg มีความแม่นยำโดยให้ % RSD ที่ได้ไม่เกิน 20 % ส่วนความถูกต้องนั้น ค่าร้อยละของการกลับคืนต้องเท่ากับ 70-120 % และที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-1mg/kg มีความแม่นยำโดยให้ % RSD ที่ได้ไม่เกิน 15 % ส่วนความถูกต้องนั้น ค่าร้อยละของการกลับคืนต้องเท่ากับ 70-110 %



ภาพ 13 ขั้นตอนการสกัดหาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง

6 . การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างของน้ำผึ้งที่วางขายในเขตจังหวัดเชียงใหม่ แล้วนำมาทำการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพได้แก่ ความชื้น ความหวาน ค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) ความเป็นกรด-เบส และ ปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลิน แล้วนำผลที่ได้มาแปลผล

6.1 การสุ่มตัวอย่างน้ำผึ้งและการเก็บรักษาตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำผึ้งที่วางขายในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง จาก 5 ยี่ห้อ และ แยกเป็นชนิดของน้ำผึ้งที่ได้จากแหล่งน้ำหวาน ได้แก่ น้ำผึ้งจากดอกลำไย น้ำผึ้งจากดอกสาบเสือ น้ำผึ้งจากดอกทานตะวัน น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างน้ำผึ้งที่อุณหภูมิประมาณ 5°C และเก็บให้พ้นแสง

6.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างน้ำผึ้ง

6.2.1 การหาค่าความชื้น (AOAC 969.38, 2000)

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีมวล (m_1) ไปอบที่อุณหภูมิ 130°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักและนำค่าน้ำหนักที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณความชื้นจากสมการ 3.7

$$\text{ค่าความชื้น (g/100g)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \qquad (3.7)$$

เมื่อ m_1 = น้ำหนักน้ำผึ้งก่อนอบ

m_2 = น้ำหนักน้ำผึ้งหลังอบ

6.2.2 การหาค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล, HMF (มอก.470-2526)

การหาค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) ทำการทดสอบโดยให้ตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสารละลาย barbituric acid ที่ละลายในน้ำกลั่น และสารละลาย *p*-toludine ที่ละลายใน iso-propanol หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ด้วยสเปกโทรโฟโตเมตรีที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 550 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล ตามสมการ 3.8

$$\text{HMF (mg/kg)} = 192A \qquad (3.8)$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm

6.2.3 การหาค่าความเป็นกรดด่าง

เจือจางตัวอย่างน้ำผึ้งลง 10 เท่า หลังจากนั้นนำไปอ่านค่าความเป็นกรด-เบสด้วย pH meter

6.2.4 การหาค่าความหวาน

หยดตัวอย่างน้ำผึ้งลงไปบนเครื่อง refractometer เพื่ออ่านค่าของความหวาน

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินของตัวอย่างน้ำผึ้ง

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่สุ่มเก็บมาทำการสกัดดังภาพ 13 แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ นำผลที่วิเคราะห์ได้มาประมวลผล

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

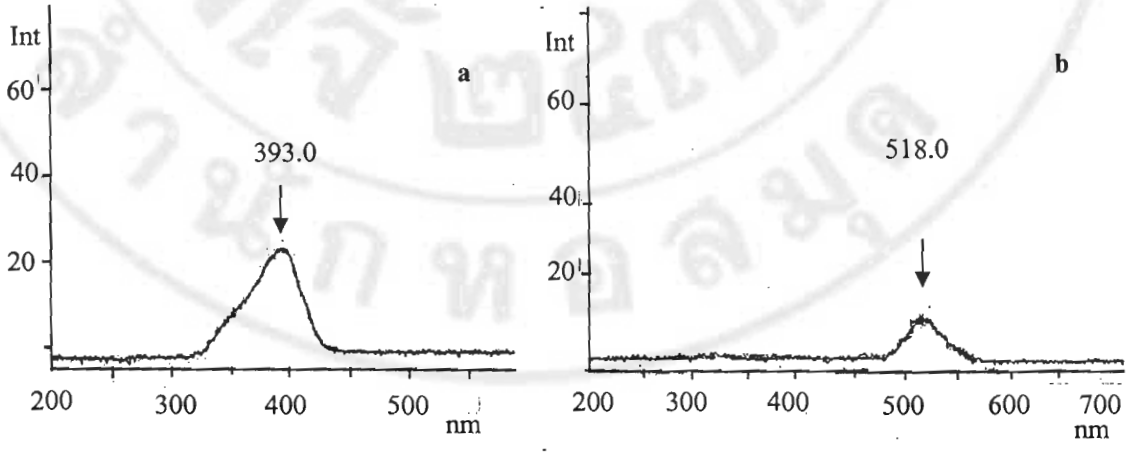
การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลินที่ตกค้างในน้ำผึ้ง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสมที่ให้ความถูกต้อง แม่นยำสูง รวมถึงใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่น้อยลง ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวประกอบไปด้วย การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกและตรวจวัด การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE) และการหาความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) ปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ของสารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง หลังจากนั้นจึงนำวิธีการวิเคราะห์นี้มาทดสอบหาปริมาณของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลินที่ตกค้างในตัวอย่างของน้ำผึ้ง โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างของน้ำผึ้งที่การวางขายในจังหวัดเชียงใหม่ โดยผลการทดลองดังนี้

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยศึกษาตัวแปรทางกายภาพและทางเคมี

เมื่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ เตตราซัยคลิน เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียมในสภาวะด่าง (pH = 8.1) จะทำให้สามารถเรืองแสงได้ดีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นยูวี–วิสิเบิล (Lu et al., 2004) เมื่อใช้คุณสมบัติดังกล่าวในการตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลิน โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนนี้จะต้องทำการศึกษาหาค่าของความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสง ของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน และความเสถียรของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลินเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Ca^{2+} และทำการเปรียบเทียบเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้สามารถแยกวิเคราะห์สาร ออกซีเตตราซัยคลิน (OTC) เตตราซัยคลิน (TC) คลอเตตราซัยคลิน (CTC) และด็อกซีซัยคลิน (DC) ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยพิจารณาจากคอลัมน์สำหรับการแยกที่บรรจุด้วยเฟสที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกสูงสุด ชนิดของตัวทำละลายในการชะที่เหมาะสม อัตราส่วนผสมของตัวทำละลายสำหรับการชะที่เหมาะสม และอัตราการไหลของตัวทำลายที่เหมาะสม โดยผลการทดลองมีดังนี้

1. การศึกษาหาค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสงของสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน

เนื่องจากโครงสร้างของสารกลุ่มเตตราซัยคลินมีลักษณะที่เป็น conjugated multiple double bonds ดังแสดงในภาพ 1 จึงทำให้สามารถเรืองแสงออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นของยูวี–วิสิเบิล เรียกแสงนี้ว่า ฟลูออเรสเซนซ์ และจากงานวิจัยของ Lu et al. (2004) พบว่าเมื่อสารกลุ่มสารเตตราซัยคลินเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียมในสภาวะด่าง (pH = 8.1) จะทำให้สามารถเรืองแสงได้ในปริมาณที่เข้ม เมื่อเทียบกับสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ไม่ได้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียมและที่สภาวะด่าง ทั้งนี้เนื่องจากไอออนของแคลเซียมเมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสารกลุ่มเตตราซัยคลินนั้นจะทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะช่วยทำให้ฟลูออเรสเซนซ์เกิดได้ดีขึ้นและได้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มมากขึ้น และที่สภาวะด่าง (pH = 8.1) เมื่อสารกลุ่มเตตราซัยคลินเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียม จะทำให้โครงสร้างของสารกลุ่มดังกล่าวมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น และแสงฟลูออเรสเซนซ์มีความเสถียรมากเรียกคุณสมบัติดังกล่าวว่า hyperchromic effect และเมื่อเทียบกับในสภาวะที่มี pH ต่ำ ๆ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่คายออกมาจะมีปริมาณต่ำเนื่องจากเกิดการ quenching ดังนั้นจึงได้เลือกใช้สภาวะของการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน

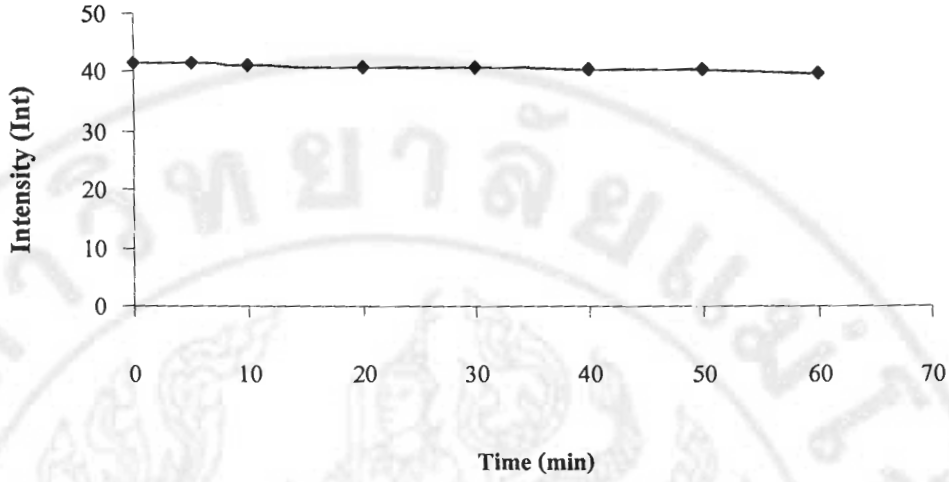


ภาพ 14 สเปกตรัมแสดงค่า (a) excitation (Ex), (b) emission (Em) ของสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน

จากการทดลองพบว่าเมื่อสารมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียม ที่ pH เท่ากับ 8.1 ค่าของความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสงของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่เหมาะสมที่ทำให้ความเข้มของแสงสูงสุด นั้นมีค่าเท่ากับ 393 nm และ 518 nm ตามลำดับ โดยสเปกตรัมที่สแกนได้แสดงดังภาพ 14 ค่าของความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสงของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Lu et al. (2004) ซึ่งค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสงของสารกลุ่มเตตราซัยคลินจากงานวิจัยดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 380 nm และ 532 nm ตามลำดับ

2. การศึกษาความเสถียรของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+})

จากการทดลองเมื่อให้สารมาตรฐานเตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียม ที่ pH เท่ากับ 8.1 แล้วนำไปวัดค่าของความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่คายออกมานั้น โดยใช้เครื่อง luminescence spectrometer ในการวัด โดยเลือกใช้ค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสงเท่ากับ 393 nm และ 518 nm ตามลำดับ พบว่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่คายออกมานั้นมีค่าค่อยๆ ลดลง คิดเป็น 3.81% ในเวลา 60 นาที แสดงดังตาราง 13 และแสดงดังภาพ 15 ปัญหาดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อการตรวจวัดได้ เมื่อฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ เพราะเนื่องจากในการฉีดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวจะต้องใช้ระยะเวลาหนึ่งก่อนที่สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารมาตรฐานเตตราซัยคลินกับไอออนของแคลเซียมจะถูกตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวนั้นเกิดจาก เมื่อสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ฉีดวิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ซึ่งทำหน้าที่ในการแยก หากใช้คอลัมน์ในการวิเคราะห์ที่มีความยาวมาก การหน่วงเหนี่ยวสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ก็อาจจะถูกหน่วงไว้นาน ส่งผลให้ระยะเวลาที่สารกลุ่มเตตราซัยคลินถูกเครื่องตรวจวัดก็จะใช้เวลาเพิ่มมากยิ่งขึ้น จึงอาจทำให้ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดมีความผิดพลาดได้



ภาพ 15 แสดงค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เวลาต่าง ๆ

ตาราง 13 ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เวลาต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Time (min)	Intensity (Int)	Decreased intensity (%)
0	41.55	0
5	41.54	0.03
10	41.31	0.58
20	40.94	1.46
30	40.82	1.75
40	40.59	2.30
50	40.37	2.83
60	39.96	3.81

ดังนั้นจึงจะเห็นว่าเมื่อสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียม ที่ pH เท่ากับ 8.1 เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ค่าความเข้มของแสงค่อยๆ ลดลงไปเรื่อยๆ ซึ่งอาจเกิดจากความแข็งแรงของโครงสร้างไม่เสถียรและส่งผลทำให้ แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่คายออกมาลดลงเรื่อยๆ ซึ่งหลังจากที่สารมาตรฐานเตตราซัยคลินเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียม ที่ pH เท่ากับ 8.1 เรียบร้อยแล้ว ควรจะทำการตรวจวัดให้เสร็จสิ้นภายในเวลาอันรวดเร็วไม่ควรทิ้งไว้หรือใช้เวลานานก่อนที่จะทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์

ปัญหาดังกล่าวจะส่งผลต่อการฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซ็นต์ ดังนั้นในการแก้ไขนั้นอาจจะต้องให้สารกลุ่มเตตราซัยคลินละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นด่าง และควรปราศจากไอออนของแคลเซียม หรืออาจใช้สารละลายอินทรีย์ เช่น เมธานอล ก่อนที่จะทำการนำสารไปฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อช่วยให้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่มเตตราซัยคลินกับไอออนของแคลเซียมก่อนที่จะถูกตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ได้ลดลง

3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์

เมื่อทำการเปรียบเทียบเพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้สามารถแยกวิเคราะห์สาร ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยพิจารณาจากคอลัมน์สำหรับการแยกที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยก ชนิดของตัวทำละลายในการชะที่เหมาะสม อัตราส่วนผสมของตัวทำละลายสำหรับการชะที่เหมาะสม อัตราการไหลของตัวทำลายที่เหมาะสม

จากงานวิจัยของ Lu et al. (2004) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน ในตัวอย่างยาปฏิชีวนะ ซึ่งใช้สารละลายบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ pH 8.1 และเมธานอล เป็นตัวพา เมื่อให้คาร์บอน 18 เป็นเฟสคงที่ และทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้สามารถทำการแยกวิเคราะห์ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน ได้ดี และสามารถลดขั้นตอนของการเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ ก่อนเข้าสู่เครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งแตกต่างกับวิจัยหลายงาน ซึ่งจะใช้วิธีการทำ post column ด้วยไอออนของแมกนีเซียม (Spisso et al., 2007) เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้สนใจและเลือกใช้สภาวะดังกล่าวในการ

แยกวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยใช้คอลัมน์ Phenomenex C_{18}, 4.6 mm x 5 μm x 150 mm เฟสเคลื่อนเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ A (บัฟเฟอร์ C) และสารละลายบัฟเฟอร์ B (บัฟเฟอร์ D) โดยที่เวลา 0 นาที สารละลายบัฟเฟอร์ B (บัฟเฟอร์ D) เป็น 0% ที่เวลา 3 นาที สารละลายบัฟเฟอร์ B (บัฟเฟอร์ D) เป็น 35% ที่เวลา 6 นาทีสารละลายบัฟเฟอร์ B (บัฟเฟอร์ D) เป็น 100% จากการทดลองพบว่า ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน มี retention time (t_R) ที่ค่อนข้างนาน และค่า k' ของเตตราซัยคลิน และ คลอเตตราซัยคลิน มีค่ามากกว่า 6 จึงทำให้สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงวิธีการฉีดวิเคราะห์ แสดงดังตาราง 10 สภาวะที่ 1 คือใช้ คอลัมน์ Phenomenex C_{18}, 4.6 mm x 5 μm x 150 mm จากผลการทดลองพบว่าที่สภาวะดังกล่าว ออกซีเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน มี retention time (t_R) ที่ค่อนข้างต่ำ แสดงดังตาราง 14 และแสดงดังภาพ 16(a) ซึ่งอาจจะส่งผลทำให้เมื่อนำสภาวะดังกล่าวไปฉีดวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้ง การรบกวนจากสิ่งปนเปื้อนจะทำให้การประมวลผลมีความผิดพลาดได้

ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงสภาวะของการฉีดวิเคราะห์แสดงดังตาราง 10 เป็นสภาวะที่ 2 3 และ 4 ตามลำดับเพื่อให้สามารถฉีดวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ได้ดี จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 2 คือใช้คอลัมน์ Lichrosphere C_{18}, 4.6 mm x 5 μm x 250 mm ซึ่งมีความยาวเพิ่มมากขึ้น แต่มีพื้นที่ผิวเท่ากับ 350 m^2/g ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเทียบกับคอลัมน์ Phenomenex C_{18}, 4.6 mm x 5 μm x 150 mm ดังแสดงในตาราง 15 ส่งผลให้ผลการฉีดวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างจากสภาวะที่ 1 และยังส่งผลทำให้ค่า tailing ของออกซีเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน มีค่าเพิ่มจากเดิม ในส่วนของความสมมาตรของพีก ของออกซีเตตราซัยคลิน ด็อกซีซัยคลิน และเตตราซัยคลิน กลับมีค่าลดลงน้อยกว่า 1.0 แสดงดังภาพ 16(b) และแสดงดังตาราง 14 ดังนั้นสภาวะดังกล่าวยังมีความไม่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่ม เตตราซัยคลิน จึงเปลี่ยนทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 3 คือใช้คอลัมน์ Phenomenex C_{18}, 4.6 mm x 5 μm x 150 mm แต่เปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากการทดลองพบว่า สามารถแยกวิเคราะห์ สารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลินได้ และค่า retention time (t_R) ของออกซีเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน เพิ่มขึ้น แสดงดังภาพ 16(c) และแสดงดังตาราง 14 แต่พบว่าค่าของ k' ของ เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน มีค่ามากกว่า 6.0 และพีกที่ได้มีไหล่ (shoulder) ที่ค่อนข้างสูง จึงทำให้สภาวะดังกล่าวยังไม่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน เมื่อทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 4 คือ ใช้ คอลัมน์ Eclipse C_8, 4.6 mm x 5 μm x 150 mm อัตราส่วนของเฟสเคลื่อน แสดงดังตารางที่ 16 และอัตราการไหลของ

เฟสเคลื่อนที่เป็น 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสามารถแยกวิเคราะห์ สารออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลินได้ และค่า retention time (t_R) ของออกซีเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ที่เพิ่มขึ้น แสดงดังภาพ 16(d) และแสดงดังตาราง 14 แต่พบว่าค่าของ tailing ของสารกลุ่มเตตราซัยคลินมีค่าเพิ่มมากกว่า 1.0 และค่าของความสมมาตรของพีก ของออกซีเตตราซัยคลิน ด็อกซีซัยคลิน และเตตราซัยคลิน มีค่าใกล้เคียงกับการฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 2 เมื่อพิจารณาในส่วนของ tailing ถึงแม้จะพบว่ามีค่ามากกว่า 1.0 และค่าความสมมาตร มีค่าน้อยกว่า 1.0 แต่ก็ไม่ส่งผลต่อการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินมากนัก พารามิเตอร์ที่ทำการพิจารณาเป็นพิเศษ เมื่อทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 4 คือทำให้ค่า retention time (t_R) ของออกซีเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน เพิ่มขึ้น ปัญหาที่เกิดจากการรบกวนจากสิ่งปนเปื้อนจากตัวอย่างอาจจะไม่ส่งผลได้ และความสูงของพีก ของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน มีค่าเพิ่มขึ้น แสดงดังตาราง 14 จึงทำให้ sensitivity ที่ได้มีค่าที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกทำการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยสภาวะที่ 4 ดังแสดงในตาราง 16 จากสภาวะที่ได้เมื่อเทียบกับสภาวะของ Lu et al. (2004) พบว่าสามารถแยกวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินได้ดีและมีความเหมาะสมกว่า เพราะเนื่องจากทำให้ ค่า retention time (t_R) ของออกซีเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ที่เพิ่มขึ้น และ sensitivity ที่ได้จะมีค่าที่สูงขึ้น

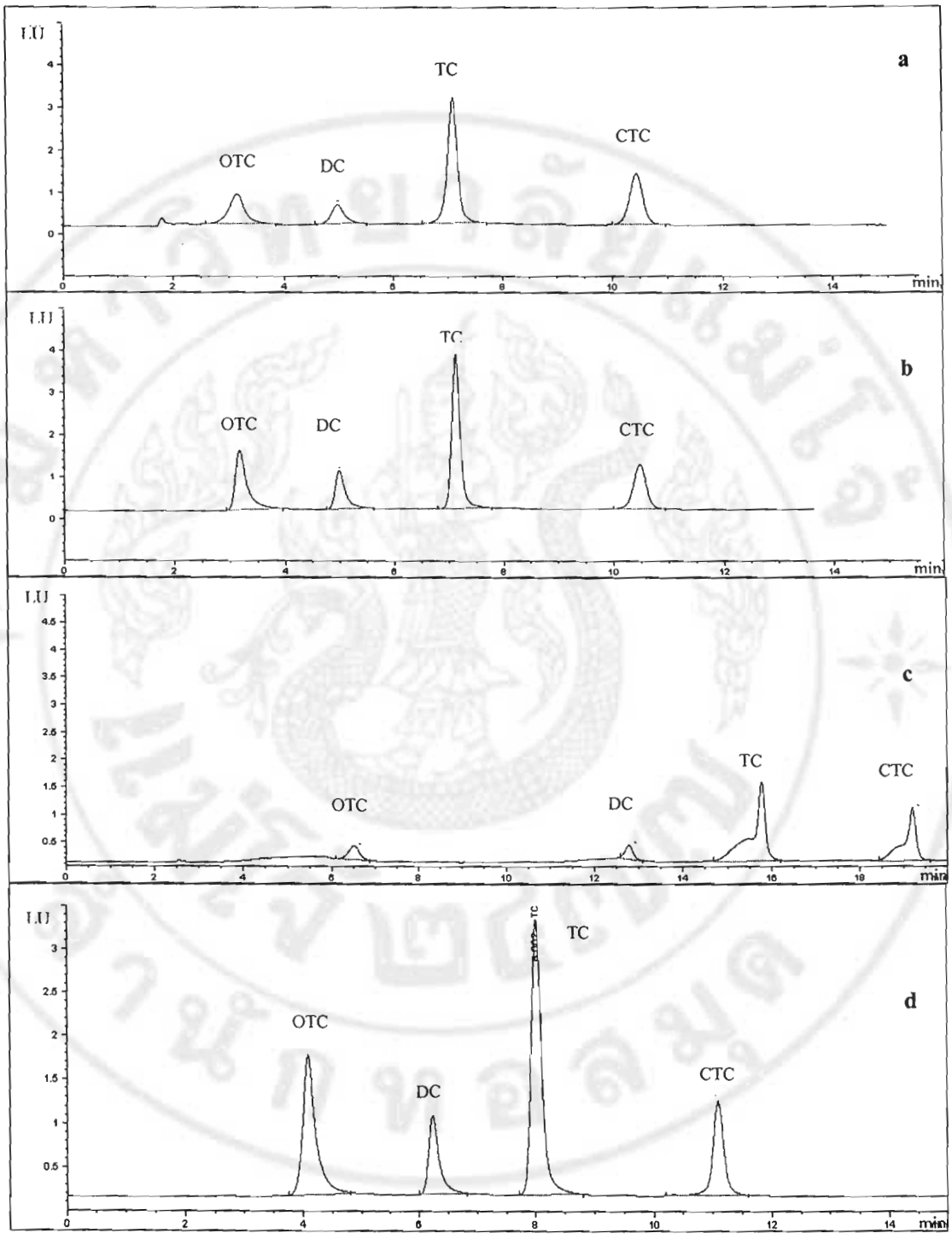
ตาราง 14 ผลการฉีดวิเคราะห์ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด๊อกซีซัยคลิน ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

	สภาวะที่ 1				สภาวะที่ 2				สภาวะที่ 3				สภาวะที่ 4			
Parameter	**OTC**	**DC**	**TC**	**CTC**	**OTC**	**DC**	**TC**	**CTC**	**OTC**	**DC**	**TC**	**CTC**	**OTC**	**DC**	**TC**	**CTC**
RT (min)	3.15	4.97	7.09	10.43	3.17	4.98	7.12	10.47	6.51	12.77	15.77	19.19	4.17	6.39	8.09	11.2
k′	0.86	1.93	3.18	5.15	0.87	1.94	3.2	5.18	2.84	6.53	8.31	10.32	0.23	0.89	1.39	2.3
Tailing	1.05	1.45	0.98	0.63	2.31	2.16	1.25	0.96	0.82	1.03	0.63	0.66	1.86	1.54	1.29	1.05
symmetry	1.01	0.78	1.04	1.04	0.55	0.65	0.76	1.06	1.16	0.93	2.66	2.25	0.56	0.72	0.74	0.78
resolution	-	3.78	5.41	8.47	-	5.33	7.02	9.45	-	15.08	8.6	9.45	-	6.35	4.31	6.82
Peak hight (Lu)	0.73	0.47	3.01	1.23	1.43	0.93	3.72	1.08	0.25	0.26	1.46	0.97	9.20	3.39	13.09	2.29

หมายเหตุ สภาวะที่ 1 2 3 แสดงในตาราง 10 และสภาวะที่ 4 แสดงในตาราง 16

ตาราง 15 รายละเอียดของคอลัมน์ที่ใช้ในการทดลอง

Column	Particle Size (μm)	Length (mm)	Surface Area (m^2/g)	carbon load (%)	Encapped	Pore Size (Å)
1. Phenomenex C_{18}	5	150	440	19	yes	100
2. Lichrosphere C_{18}	5	250	350	21.6	no	100
3. Eclipse C_8	5	150	180	7.6	yes	80



ภาพ 16 โครมาโทแกรมของสารออกซีเตตราซัยคลิน (OTC), เตตราซัยคลิน (TC) คลอเตตราซัยคลิน (CTC) และ ด็อกซีซัยคลิน (DC)

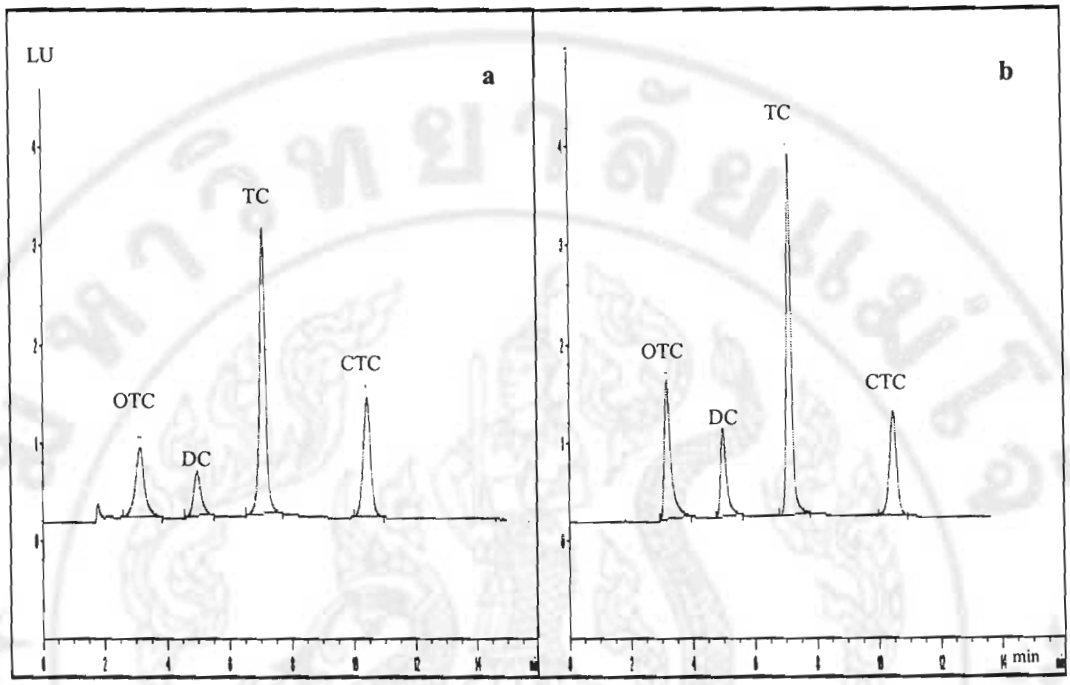
หมายเหตุ a = ฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 1 b= ฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 2 c= ฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 3 และ d= ฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ 4

ตาราง 16 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Parameter	สภาวะที่ 4			
1. Column	คอลัมน์ Eclipse C_8, 4.6mm x 5 μm x 150 mm			
2. Mobile phase (gradient)	สารละลายบัฟเฟอร์ A (บัฟเฟอร์ C 10 mM $CaCl_2$, pH 8.1) และสารละลายบัฟเฟอร์ B (บัฟเฟอร์ D 25 mM $CaCl_2$, pH 8.1)			
3. Column temperature (°C)	30 °C			
4. Flow rate	0.5 mL/min			
5. Gradient elution	**บัฟเฟอร์ A**	**บัฟเฟอร์ B**	**Gradient**	
			Time (min)	**%B**
	บัฟเฟอร์ C	บัฟเฟอร์ D	0	50
	10 mM $CaCl_2$, pH 8.1	25 mM $CaCl_2$, pH 8.1	5	100
			20	100
6. Injection volume	20 μL			
7. FLD detector	Ex = 393, Em = 518 nm			

4. การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายสารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลิน

จากการทดลองเมื่อนำสารละลายมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในเมธานอล และในสารละลายบัฟเฟอร์ B นำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่ได้จากการทดลองข้างต้น พบว่า ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น k', tailing, symmetry และ resolution มีค่าไม่แตกต่างกันมาก แต่จะพบว่าความสูงของพีกที่ได้นั้นมีค่าที่แตกต่างกันคือ เมื่อทำการละลายสารมาตรฐานด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B จะได้ค่าความสูงของพีกสูงกว่าเมื่อทำการละลายสารมาตรฐานด้วยเมธานอล ดังแสดงในภาพ 17 ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ช่วยส่งเสริมให้ปริมาณแสงของฟลูออเรสเซนซ์ที่คายออกมาสูงกว่าเมื่อเทียบกับเมธานอล ดังแสดงในตาราง 17 ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Lu et al. (2004) เนื่องจากเจือจางสารมาตรฐานด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมีองค์ประกอบเหมือนกับเฟสเคลื่อนที่



ภาพ 17 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ a = ที่เจือจางด้วยเมธานอล และ b = เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ B

ตาราง 17 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของสารมาตรฐาน ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางในเมธานอล และในสารละลายบัฟเฟอร์ B

	เจือจางด้วยเมธานอล				เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ B			
Parameter	**OTC**	**DC**	**TC**	**CTC**	**OTC**	**DC**	**TC**	**CTC**
k'	0.85	1.93	3.17	5.14	0.87	1.94	3.20	5.17
tailing	1.10	1.30	1.00	0.97	1.81	1.65	1.21	0.95
symmetry	0.97	0.81	1.06	1.05	0.60	0.67	0.86	1.04
resolution	-	3.96	5.48	8.51	-	5.39	7.01	9.42
peak height (LU)	0.69	0.44	2.94	1.20	1.27	0.80	3.48	1.18

สาเหตุที่การศึกษาครั้งนี้เจือจางสารมาตรฐานด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B ที่มีองค์ประกอบคล้ายกับเฟสเคลื่อนที่ต่างกันตรงที่ไม่มีไอออนของแคลเซียมเป็นองค์ประกอบสืบเนื่องจากการศึกษาความเสถียรของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) พบว่าเมื่อสารกลุ่มเตตราซัยคลินเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของแคลเซียม ที่ pH เท่ากับ 8.1 เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ค่าความเข้มของแสงค่อยๆ ลดลงไปเรื่อยๆ ดังนั้นในการหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว จึงได้ทำการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH เท่ากับ 8.1 แทน และจากการทดลองพบว่าเมื่อเจือจางสารมาตรฐานด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH เท่ากับ 8.1 จะทำให้ sensitivity ที่ได้มีค่าที่สูงขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH เท่ากับ 8.1 และไม่มีไอออนของแคลเซียมเป็นองค์ประกอบเพื่อใช้เจือจางสารมาตรฐานและสารสกัดตัวอย่างก่อนที่จะทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานผสมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ ไปฉีดวิเคราะห์ 7 ซ้ำ พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) มีค่าน้อยกว่า 0.5 แสดงดังตาราง 18

ตาราง 18 ค่า SD, %RSD ของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการฉีดวิเคราะห์ 7 ซ้ำ ของสารละลายมาตรฐานผสมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ B

	Peak area (LU*s)			
No.	**OTC**	**DC**	**TC**	**CTC**
1	13.2317	7.6892	39.0607	20.6043
2	13.7216	7.7990	39.5197	20.6688
3	13.7455	7.9072	39.5545	20.5415
4	13.9292	7.8711	39.0428	20.5026
5	13.3643	7.7418	39.1973	20.5616
6	13.5954	7.8071	38.7661	20.4460
7	13.5205	7.8123	38.6938	20.4219
Average	**13.5869**	**7.8039**	**39.1193**	**20.5352**
SD	**0.24**	**0.07**	**0.33**	**0.09**
%RSD	**1.75**	**0.94**	**0.85**	**0.42**

5. การสร้างกราฟมาตรฐานสารกลุ่มเตตราซัยคลิน

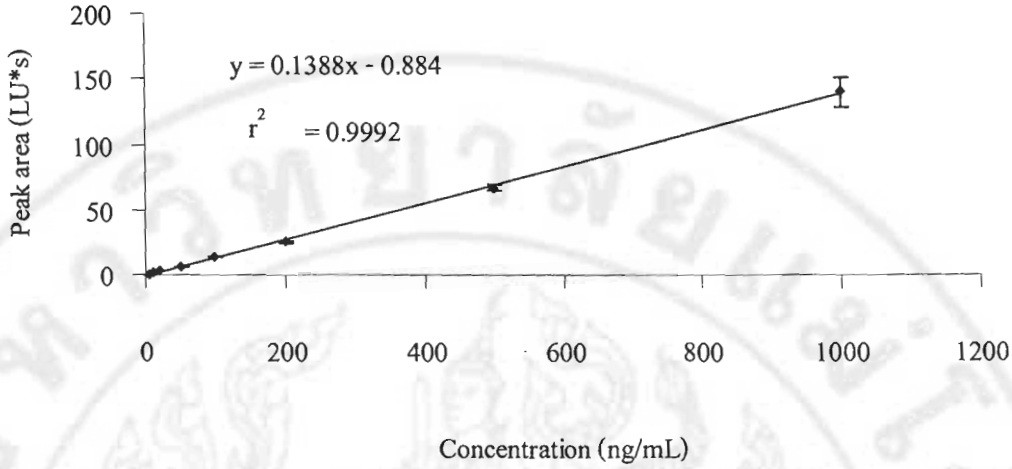
เมื่อทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานผสมของสารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลิน ให้อยู่ในช่วงของความเข้มข้น 0.5 ถึง 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าเมื่อทำการฉีดวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลินที่ปริมาตรเท่ากับ 20 ไมโครลิตร เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ สามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่ที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นต้น และเมื่อทำการเพิ่มปริมาตรในการฉีดเป็น 50 ไมโครลิตร พบว่าไม่มีการเกิด over load ของการฉีดในปริมาตรดังกล่าว และทำให้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ สามารถวัดได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลงถึงที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เลือกสร้างกราฟมาตรฐานสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 5-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองเมื่อนำเอาพื้นที่ใต้กราฟแสดงดังตาราง 19 มาพล็อตสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยพล็อตระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟ พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.995 แสดงดังตาราง 20 และกราฟมาตรฐานที่ได้แสดงดังภาพ 18 19 20 และ 21 ตามลำดับ

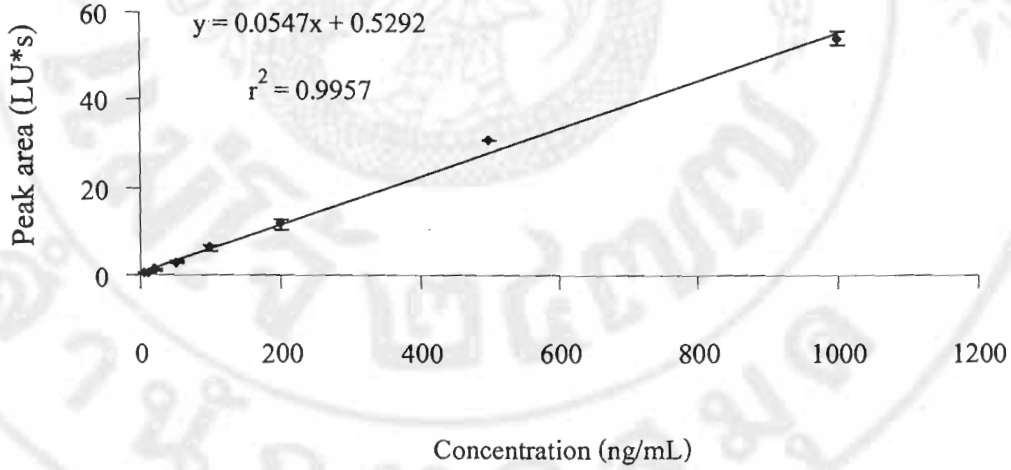
ตาราง 19 ผลการฉีดวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 5–1000 ng/mL

ความเข้มข้น (ng/mL)	Average peak area (LU*s)			
	OTC	DC	TC	CTC
5	0.5766	0.3026	0.9714	0.3579
10	1.2356	0.5402	1.9205	0.6471
20	2.5517	1.1770	4.0715	1.2079
50	6.2353	2.9226	9.9090	2.8847
100	13.4448	6.2536	21.3287	6.3170
200	24.8886	11.6437	39.4088	12.4964
500	66.2771	30.7449	103.0759	26.9817
1000	139.3517	53.7954	221.5523	52.4525

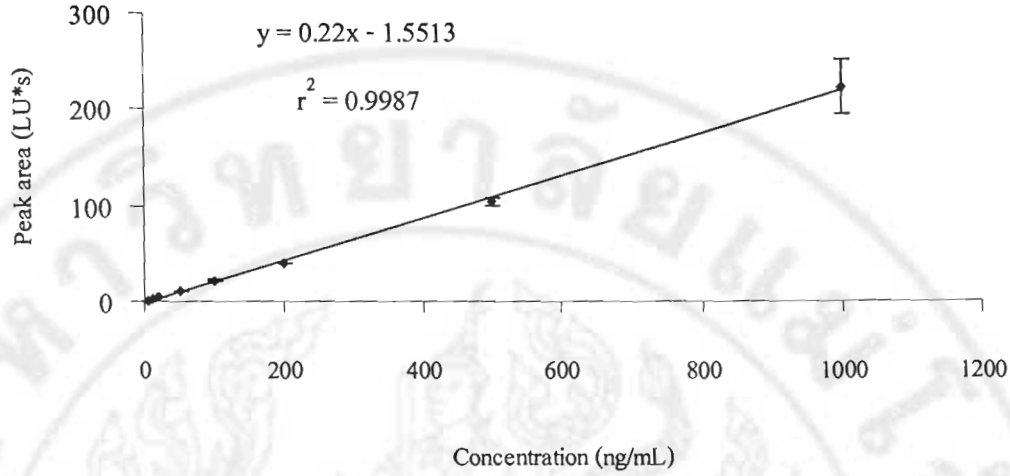
หมายเหตุ n = 3



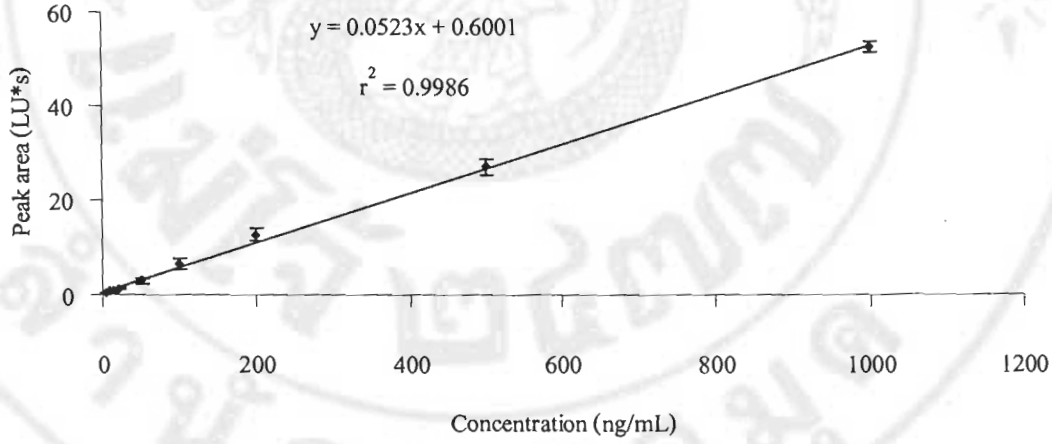
ภาพ 18 กราฟมาตรฐานของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน



ภาพ 19 กราฟมาตรฐานของสารละลายด็อกซีซัยคลิน



ภาพ 20 กราฟมาตรฐานของสารละลายเตตราซัยคลิน



ภาพ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลายคลอเตตราซัยคลิน

ตาราง 20 ข้อมูลจากกราฟมาตรฐาน

สาร	สมการเส้นตรง	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2)	ช่วงความเป็นเส้นตรง (ng/mL)
OTC	0.1388x - 0.8840	0.9992	5 – 1000
DC	0.0547x + 0.5292	0.9957	5 – 1000
TC	0.2000x – 1.5513	0.9987	5 – 1000
CTC	0.0523x + 0.6001	0.9986	5 – 1000

จากผลการทดลองเมื่อทำการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ทำการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ คอลัมน์ Eclipse C_8, 150 x 4.6 mm, 5 μm และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น excitation (Ex) และ emission (Em) เท่ากับ 393 nm และ 518 nm ตามลำดับ โดยใช้ตัวพาเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ A (บัฟเฟอร์ C 10 mM $CaCl_2$, pH 8.1) และสารละลายบัฟเฟอร์ B (บัฟเฟอร์ D 25 mM $CaCl_2$, pH 8.1 ดังสภาวะในตาราง 16 ทำให้สามารถแยกวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ได้ดีและมีความเหมาะสม โดยมีค่า resolution มากกว่า 3.9 ดังแสดงในตาราง 17

จากสภาวะดังกล่าวสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน เข้มข้นตั้งแต่ 5 – 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995 เมื่อฉีดวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งหมด 7 ซ้ำ พบว่ามีความแม่นยำ โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) น้อยกว่า 0.5 ดังแสกดงในตาราง 18

การศึกษาหาวิธีการสกัดกลุ่มสารเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ได้ทำการเปรียบเทียบเลือกหาวิธีการในการสกัดที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้สามารถแยกวิเคราะห์สาร ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ในตัวอย่างน้ำผึ้ง แล้วฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยพิจารณาจากการเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัด การเลือกใช้ชนิด SPE packing ที่เหมาะสม การเลือกปริมาณของตัวอย่างที่เหมาะสม การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม และการเลือกใช้ปริมาณตัวทำละลายที่เหมาะสม

สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย (Sokol and Matisova, 1994; Cinquina, et al., 2003; Vinas et al., 2004) ในการสกัดสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ซึ่งได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine pH 4.0 ที่มี EDTA เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกใช้สารสกัดดังกล่าวในการสกัดสารเตตราซัยคลิน โดยมีผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดระหว่าง LLE การสกัดแบบเฟสของแข็งชนิด C_{18} และ HLB

เมื่อทำการสกัดน้ำปราศจากไอออน 3 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารมาตรฐานผสมออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลินเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการสกัดแบบ liquid-liquid extraction ด้วยเฮกเซน และการสกัดโดยเฟสของแข็งสองชนิดคือ แบบ HLB และคาร์บอน 18 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine pH 4.0 โดยทำการผ่านสารละลายดังกล่าวลงในเฟสของแข็ง ชนิด คาร์บอน 18 และ HLB แล้วทำการสกัดดังแสดงในภาพ 12 ทำการพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดระหว่างการสกัดแบบ liquid-liquid extraction และการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB และคาร์บอน 18 ซึ่งประสิทธิภาพของการสกัดจะพิจารณาและเปรียบเทียบจากค่าร้อยละของการกลับคืน ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตาราง 20

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อทำการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB จะได้ค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) มากกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเฟสของแข็งที่เป็นคาร์บอน 18 และการสกัดแบบ liquid-liquid extraction ดังแสดงในตาราง 21

ตาราง 21 ผลการสกัดด้วย liquid liquid extraction และเฟสของแข็ง

No.	% Recovery											
	HLB				C18				LLE			
	OTC	DC	TC	CTC	OTC	DC	TC	CTC	OTC	DC	TC	CTC
blank	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1	62.39	57.2	40.09	31.8	11.2	nd	3.24	nd	nd	nd	nd	nd
2	52.09	47.92	24.95	28.76	21.47	nd	14.59	9.4	nd	nd	nd	nd
3	128.09	122.56	77.73	69.74	nd	nd	2.42	nd	nd	nd	nd	nd

หมายเหตุ nd = not detected

เมื่อทำการสกัดแบบ liquid-liquid extraction พบว่ามีค่าร้อยละของการกลับคืนต่ำจนไม่สามารถตรวจวัดได้ สาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถทำการสกัดสารกลุ่มเตตราซัยคลินได้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารกลุ่มเตตราซัยคลินต่ำเกินไป และสภาวะที่ใช้ในการสกัดอาจไม่เหมาะสม จนไม่สามารถทำการสกัดออกมาด้วยวิธีการดังกล่าว และเมื่อใช้สารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine pH 4.0 ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสภาวะที่เป็นกรด และมีค่าสูงกว่าค่าของ p*Ka1* ของสารกลุ่มเตตราซัยคลินดังแสดงไว้ในตาราง 3 จึงทำให้โครงสร้างของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน บางส่วนสามารถแตกตัวและมีประจุได้ เมื่อนำสารละลายดังกล่าวผ่านลงในเฟสของแข็งชนิดคาร์บอน 18 และเฟสของแข็งชนิด HLB พบว่าเมื่อสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB ได้ค่าร้อยละของการกลับคืนสูงกว่า เฟสของแข็งชนิดคาร์บอน 18 แสดงดังตาราง 21

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของเฟสของแข็งชนิด HLB จะพบว่าเป็นโครงสร้างที่มีทั้งประจุและไม่มีประจุรวมอยู่ด้วยกันเรียกโครงสร้างดังกล่าวว่า hydrophilic lipophilic ดังแสดงในภาพ 10 จึงทำให้สามารถหน่วงสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่มีสภาวะที่มีประจุได้ดีกว่า ดังนั้นเมื่อชะสารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยเมธานอลในขั้นตอนของ elute จึงทำได้ สารเตตราซัยคลินออกมามากและได้ร้อยละของการกลับคืนสูงกว่าเฟสของแข็งชนิดคาร์บอน 18 ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB ในการศึกษาครั้งนี้

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) การสกัดด้วย SPE packing ชนิด HLB

เมื่อทำการสกัดน้ำปราศจากไอออน ที่มีการเติมสารมาตรฐานผสม ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน เข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังภาพ 12 ซึ่งใช้เฟสของแข็งชนิด HLB ทำการศึกษาพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการสกัด ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน โดยทำการศึกษาค่าสภาวะกรดด่างของบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่ใช้ในการสกัด ชนิดของสารละลายที่ใช้ในการล้างเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน และ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารกลุ่มเตตราซัยคลินออกจากเฟสของแข็ง ผลการทดลองแสดงค่าร้อยละของการกลับคืน แสดงดังตาราง 22 จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาประมวลผลโดยใช้โปรแกรม Unscrambler 9.7 (Camo, Norway) software โดยศึกษาความแปรปรวน ค่า *p*-value แสดงดังตาราง 23 ซึ่งค่า *p*-value ที่น้อยกว่า 0.01 แสดงถึงพารามิเตอร์ที่ส่งผลต่อการสกัด

จากการประมวลผลของโปรแกรม Unscrambler 9.7 (Camo, Norway) software พบว่า เมื่อเลือกใช้สารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่มีความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 3 และ 6 ในการสกัดสารกลุ่มเตตราซัยคลิน จากผลการทดลองพบว่าความเป็นกรดด่างของสารสกัดจะส่งผลต่อร้อยละของการกลับคืน (%recovery) เฉพาะ ออกซีเตตราซัยคลินอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ดังแสดงในตาราง 23 กล่าวคือ เมื่อเลือกใช้สารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่ ความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 3 จะทำให้ร้อยละของการกลับคืน (%recovery) มีค่ามากกว่าเมื่อใช้สารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ดังแสดงผลในตาราง 22 และภาพ 22 ในขณะที่เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ด็อกซีซัยคลิน เมื่อเลือกใช้สารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 หรือ 6 จะไม่ส่งผลต่อร้อยละของการกลับคืน เพราะเนื่องจากมีค่า *p*-value มากกว่า 0.01 ดังนั้นควรเลือกใช้ เลือกใช้สารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่มีความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 3 ซึ่งจะทำให้ได้ประสิทธิภาพได้ดีสุด แต่ก็ยังทำให้ค่าร้อยละของการกลับคืนมีค่ามากกว่า 100% แสดงดังตาราง 22

ตาราง 22 ค่าร้อยละผลผลิตที่ได้จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/mL

No.	Label	Parameter			%recovery			
		pH of buffer	wash	elute	OTC	DC	TC	CTC
1	C1a	3	H_2O	MeOH	141.55	143.96	108.10	118.47
2	C1b	3	H_2O	MeOH	153.24	146.59	116.64	117.82
3	C2a	3	5% MeOH	MeOH	148.72	149.62	112.66	104.97
4	C2b	3	5% MeOH	MeOH	90.36	98.50	63.80	61.71
5	C3a	3	5% ACN	MeOH	140.71	129.33	104.47	104.03
6	C3b	3	5% ACN	MeOH	139.63	143.30	105.25	109.3
7	C4a	3	H_2O	DMF: IPA(80:20)	87.53	141.93	111.36	120.77
8	C4b	3	H_2O	DMF: IPA(80:20)	50.80	143.48	107.91	119.49
9	C5a	3	5% MeOH	DMF: IPA(80:20)	115.7	140.9	113.19	112.27
10	C5b	3	5% MeOH	DMF: IPA(80:20)	97.45	111.78	77.86	77.14
11	C6a	3	5% ACN	DMF: IPA(80:20)	63.07	68.37	52.17	54.56
12	C6b	3	5% ACN	DMF: IPA(80:20)	107.81	136.77	105.15	104.03
13	C7a	6	H_2O	MeOH	144.77	121.67	116.08	80.54

ตาราง 22 (ต่อ)

No.	Label	Parameter			%recovery			
		pH of buffer	wash	elute	OTC	DC	TC	CTC
14	C7b	6	H_2O	MeOH	124.15	126.78	111.16	80.11
15	C8a	6	5 % MeOH	MeOH	116.80	125.06	108.78	73.01
16	C8b	6	5 % MeOH	MeOH	125.41	130.99	114.95	74.57
17	C9a	6	5% ACN	MeOH	113.96	116.25	104.43	64.26
18	C9b	6	5% ACN	MeOH	128.59	131.19	118.68	65.49
19	C10a	6	H_2O	DMF: IPA(80:20)	34.78	74.47	40.86	9.46
20	C10b	6	H_2O	DMF: IPA(80:20)	29.24	71.19	38.61	18.67
21	C11a	6	5 % MeOH	DMF: IPA(80:20)	34.22	76.61	41.62	24.13
22	C11b	6	5 % MeOH	DMF: IPA(80:20)	9.27	15.36	8.83	nd
23	C12a	6	5% ACN	DMF: IPA(80:20)	43.07	90.87	48.75	20.27
24	C12b	6	5% ACN	DMF: IPA(80:20)	17.13	65.08	23.63	60.56
25	Reference 1	4	H_2O	MeOH	114.4	113.46	103.47	101.27
26	Reference I	4	H_2O	MeOH	97.71	95.32	79.72	58.24

หมายเหตุ nd = not detected

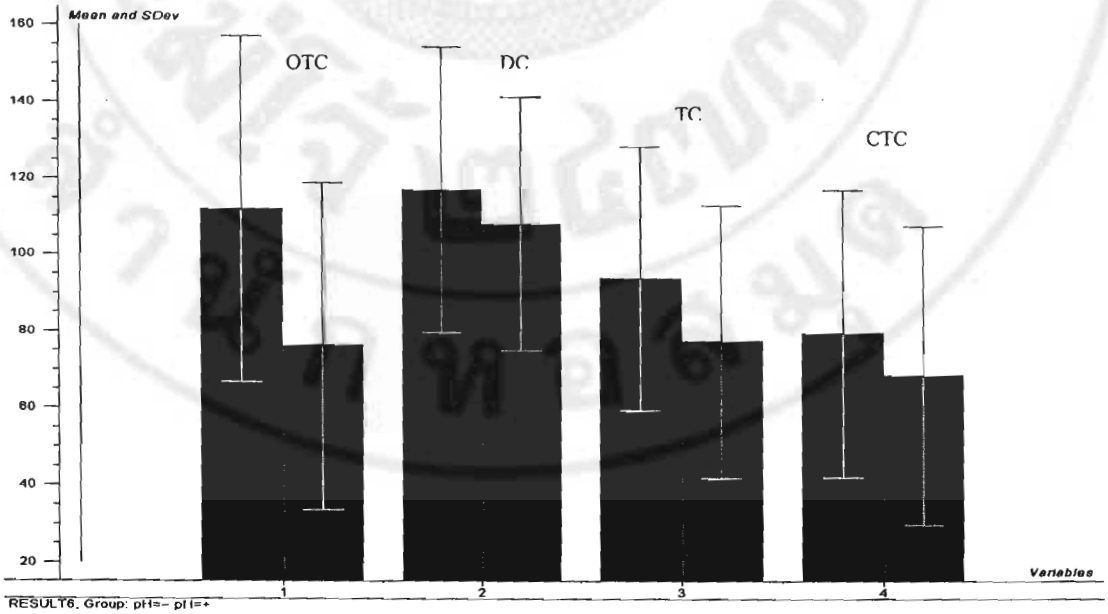
เมื่อใช้สารละลาย 5% เมธานอล และ 5% อะซิโทไนไทรล์ ใช้ในการล้างเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน จากผลการทดลองพบว่าสารละลาย 5% เมธานอล และ 5% อะซิโทไนไทรล์จะส่งผลต่อร้อยละของการกลับคืน ของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เนื่องจากมี *p*-value น้อยกว่า 0.01 แสดงดังตาราง 23 ดังนั้นเมื่อเลือกใช้สารละลาย 5% เมธานอล ในการล้างจะทำให้ร้อยละของการกลับคืน ของสารกลุ่มเตตราซัยคลินมีค่ามากกว่า 90% และสูงกว่า การใช้ 5% อะซิโทไนไทรล์ แสดงดังตารางที่ 22 และภาพ 23 ในส่วนของการเลือกใช้สารที่ใช้ในการชะพบว่า ทั้ง เมธานอล และ DMF : IPA (80 :20) จะส่งผลต่อร้อยละของการกลับคืน ของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เนื่องจากมี *p*-value น้อยกว่า 0.01 แสดงดังตาราง 23 ดังนั้นเมื่อเลือกใช้เมธานอลในการชะจะทำให้ร้อยละของการกลับคืนของสารกลุ่มเตตราซัยคลินมีค่ามากกว่า 90% และมีค่าสูงกว่า เมื่อใช้ DMF : IPA (80 :20) แสดงดังตาราง 22 และภาพ 24

ตาราง 23 ผลการศึกษาความแปรปรวน (ANOVA)

Variable	p-value			
	OTC	DC	TC	CTC
pH (A)	0.0008	0.3658	0.0532	0.1642
Washing solvent (B)	0	0.0097	0.0009	0.0125
Elute (C)	0.001	0.0038	0.0066	0
AB	0.0064	0.545	0.2908	0.2855
AC	0.6027	0.6881	0.5778	0.8642
BC	0.0198	0.1898	0.0103	0.043
ABC	0.4836	0.08	0.0282	0.0237

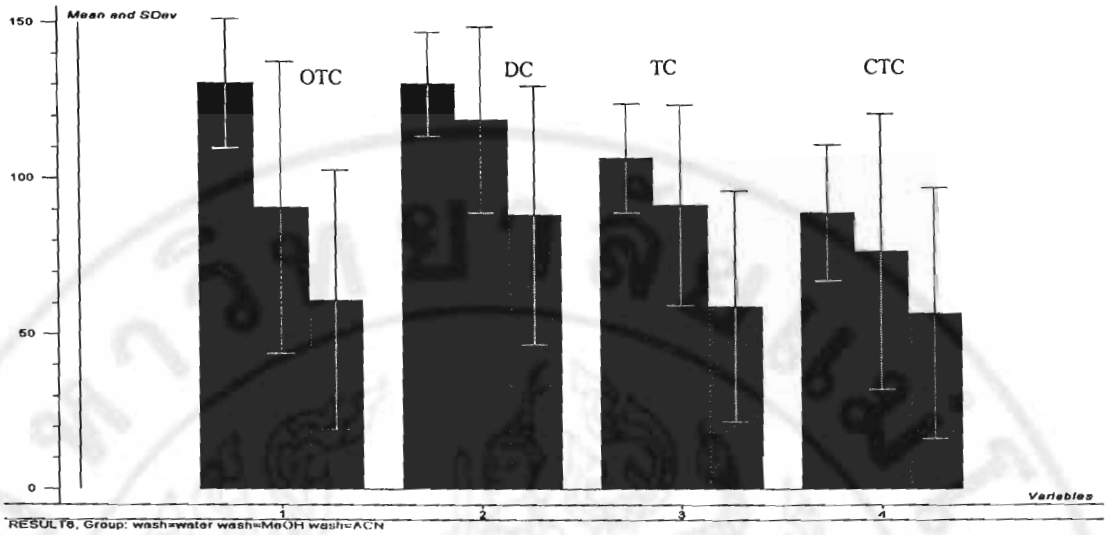
เมื่อทำการพิจารณาถึงผลที่เกิดจากสองพารามิเตอร์ร่วมกัน ไม่ว่าจะเป็น ค่าพีเอช ของสารสกัดต่อชนิดของสารที่ใช้ในการล้าง (AB) ค่าพีเอชของสารสกัดต่อชนิดของสารที่ใช้ในการชะ (AC) หรือ ชนิดของสารที่ใช้ในการชะต่อชนิดของสารที่ใช้ในการล้าง (BC) จากการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของสารสกัด ต่อ ชนิดของสารที่ใช้ในการล้างมี interaction ซึ่งกันและกัน ต่อออกซีเตตราซัยคลินเท่านั้น ส่วนผลของการล้างและชนิดของสารที่ชะ มีผลร่วมกันเฉพาะ ออกซีเตตราซัยคลิน และ เตตราซัยคลินเท่านั้น เมื่อทำการพิจารณาถึงผลของระหว่างสามพารามิเตอร์ร่วมกันจะไม่พบผลที่ส่งผลกระทบต่อค่าร้อยละของการกลับคืนของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน

ดังนั้นในศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้การสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB โดยเลือกใช้สารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่พีเอชเท่ากับ 4 สาเหตุที่ไม่เลือกความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 3 ถึงแม้จะทำให้การสกัดได้ผลที่ดี แต่ก็ทำให้ค่าร้อยละของการกลับคืนมีค่ามากเกิน 100% เมื่อเทียบกับการสารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่พีเอชเท่ากับ 4 ซึ่งเป็นจุดอ้างอิง จะทำให้ค่าร้อยละของการกลับคืนได้ดีกว่า แสดงดังตาราง 22 และเลือกใช้สารละลาย 5% เมธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตรทำการล้างเฟสของแข็งชนิด HLB หลังจากนั้นชะด้วยเมธานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้การสกัดสารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB ได้ผลที่ดีที่สุด



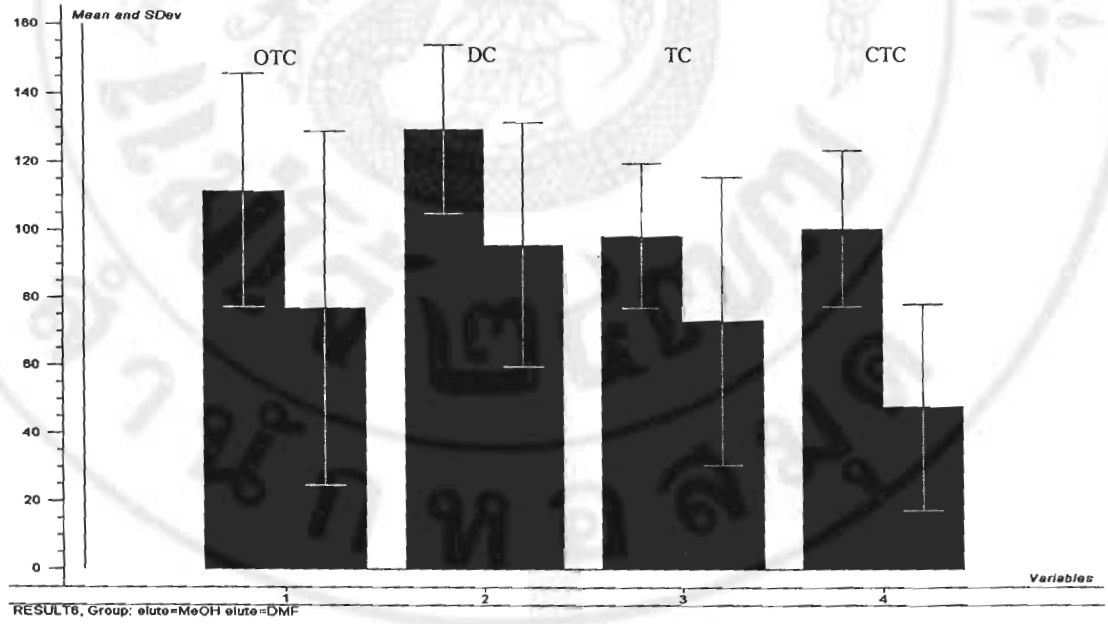
ภาพ 22 ผลของ pH ของสารสกัดบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่ส่งผลต่อค่า %recovery

หมายเหตุ pH 3 = ■ pH 6 = ■ 1 = OTC 2 = DC 3 = TC และ 4 = CTC



ภาพ 23 ผลของชนิดสารละลายที่ใช้ในการล้าง HLB ที่ส่งผลต่อค่า %recovery

หมายเหตุ น้ำ= 5% MeOH = 5% ACN= 1 = OTC 2 = DC 3 = TC และ 4 = CTC



ภาพ 24 ผลกระทบของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ ที่ส่งผลต่อค่า %recovery

หมายเหตุ เมธานอล = DMF : IPA (80 :20) = 1 = OTC 2 = DC 3 = TC และ 4 = CTC

เมื่อนำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผ่านการเติมสารมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่พีเอช เท่ากับ 4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวที่ได้มาโหลดผ่านลงในเฟสของแข็งชนิด HLB แล้วทำการล้างด้วยสารละลาย 5% เมธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการชะเอาสารกลุ่มเตตราซัยคลินออกจากเฟสของแข็งด้วยเมธานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำ residue ที่ได้มาละลายด้วยสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชท่ากับ 8.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปฉีดวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าโครมาโทแกรมที่ได้นั้นถูกรบกวนด้วยสิ่งปนเปื้อนแสดงดังภาพ 25(a) ซึ่งก็คือสารหอมระเหย (natural product) ที่ติดมาดอกไม้หรือแหล่งของน้ำหวานที่ผึ้งไปเก็บมา ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pena et al. (2005) จึงทำให้เป็นอุปสรรคในการประมวลผลและทำให้ค่าร้อยละของการกลับคืนของ ออกซีเตตราซัยคลินต่ำกว่า 60% ส่วนด็อกซีซัยคลินไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจากถูกสิ่งปนเปื้อนบดบัง ในส่วนของ เตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลิน มากกว่า 80% แสดงดังตาราง 24

จึงได้ทดลองโดยเปลี่ยนสารที่ใช้ในการล้างเป็นสารละลาย 10% เมธานอล ปริมาตร 5 และ 10 มิลลิลิตร ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้สารละลาย 10% เมธานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะช่วยทำให้สิ่งปนเปื้อนต่างๆ ลดลงบ้าง แต่ก็ไม่สามารถประมวลผลด็อกซีซัยคลินได้เหมือนเดิม ในส่วนของออกซีเตตราซัยคลินค่าร้อยละของการกลับคืน มีค่าสูงเพิ่มขึ้นเป็น 80% แสดงดังตาราง 24 และแสดงดังภาพ 25(b) เพราะฉะนั้นการสกัดด้วยเฟสของแข็งเพียงขั้นตอนเดียวอาจจะไม่เพียงพอในการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ถึงแม้จะทำการเพิ่มปริมาตรของสารละลาย 10% เมธานอล เป็น 10 มิลลิลิตร แต่ก็ช่วยทำให้ให้สิ่งปนเปื้อนลดลงไปเพียงเล็กน้อย การประมวลผลของด็อกซีซัยคลิน ก็ยังมีปัญหาเหมือนเดิม และจากการทดลองเมื่อทำการปรับสภาวะของการฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ก็ยังไม่สามารถทำให้การประมวลผลได้ดีขึ้นเท่าที่ควร ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกทำการสกัดด้วยด้วยเฟสของแข็งชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก เพิ่มอีกขั้นตอนหนึ่งหลังจากที่ได้ทำการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด HLB จากการทดลองเมื่อทำการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวกเพิ่มอีกขั้นตอนหนึ่ง โดยหลังจากที่ชะเอาสารกลุ่มเตตราซัยคลินออกมาจากเฟสของแข็งชนิด HLB ด้วยเมธานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าวโหลดผ่านเฟสของแข็งชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก แล้วทำการชะเอาสารกลุ่มเตตราซัยคลินออกจากเฟสของแข็งด้วยกรดออกซาลิก เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ต่อ อะซิโทไนไทรล์ (80 : 20) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งแล้วนำ residue สุดท้ายละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 8.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนที่จะทำ

การฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ โครมาโทแกรมที่ได้นั้นพบว่าสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ลดลง แสดงดังภาพ 25(c) แต่ค่าร้อยละของการกลับคืนของ ออกซีเตตราซัยคลิน ด็อกซีซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ลดลงตามไปด้วย แสดงดังตาราง 24

ปัญหาที่พบเมื่อทำการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก พบว่าในขั้นตอนของการชะนั้นจะต้องทำการชะเอาสารกลุ่มเตตราซัยคลินออกจากเฟสของแข็งด้วยสารละลายที่มีค่าเป็นกรด ซึ่งก็คือ กรดออกซาลิก เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ต่อ อะซิโทไนไทรล์ (80 : 20) แต่พบว่าสารตัวชะดังกล่าวมีสภาวะเป็นกรดซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อโครงสร้างของสารกลุ่มเตตราซัยคลินและส่งผลทำให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่คายออกมาจะมีปริมาณต่ำมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้เพราะเนื่องจากเกิดการ quenching ที่ pH ต่ำๆ ดังนั้นการแก้ไขปัญหาดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงต้องทำการปรับค่าพีเอช ของสารที่ถูกชะออกมาได้ให้เป็นสภาพที่เป็นด่างก่อน โดยการปรับด้วยสารละลายแอมโมเนีย ก่อนที่จะนำสารละลายดังกล่าวไประเหยแห้ง แต่จากผลทดลองพบว่าเมื่อทำการปรับสารละลายดังกล่าวให้มีสภาพเป็นด่างด้วยสารละลายแอมโมเนียนั้นจะทำให้ กรดออกซาลิกเกิดการตกผลึก และจะไปรบกวนขั้นตอนของการกรองก่อนการนำไปฉีดวิเคราะห์ และทำให้การปรับปริมาตรสุดท้ายมีปริมาตรที่ไม่แน่นอนส่งผลให้ค่าร้อยละของการกลับคืน ของออกซีเตตราซัยคลิน ด็อกซีซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ลดลง และถึงแม้จะทดลองเปลี่ยนสารที่ใช้ในการชะเป็นสารละลายตัวอื่นๆ เช่น ammonia : methanol (5:95) (Anderson et al., 2005) หรือ 2% formic acid ใน methanol (Aranda, et al., 2006) แต่ผลการทดลองที่ได้ก็ยังพบว่าค่าร้อยละของการกลับคืนยังไม่เพิ่มขึ้นแสดงดังตาราง 24

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกทำการสกัดแบบขั้นตอนเดียวดังเดิมคือทำการสกัดโดยใช้เฟสของแข็งเป็นแบบ HLB และ ทำการล้างด้วยสารละลาย 10% เมธานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเหมาะสมกับการศึกษาสารกลุ่มเตตราซัยคลินเพียงสามตัวเท่านั้น คือ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน เพราะเนื่องจากสิ่งปนเปื้อนที่ไม่สามารถกำจัดได้ไม่ได้สร้างปัญหาให้กับสารทั้งสามแต่ไปรบกวนเฉพาะด็อกซีซัยคลินเท่านั้น

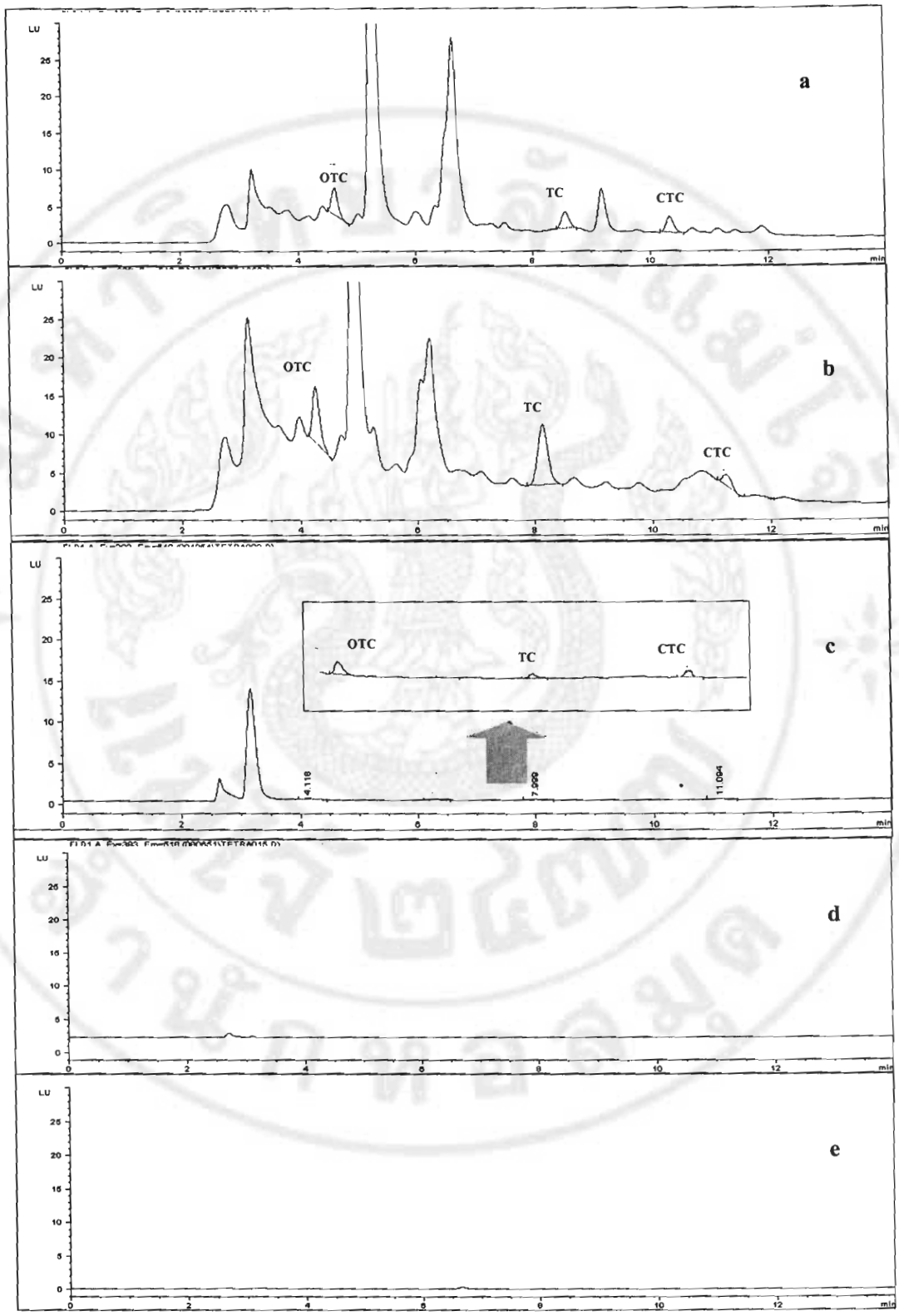
ตาราง 24 ค่าร้อยละของการกลับคืนของสารกลุ่มเตตราซัยคลินเมื่อทำการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งที่เติมสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมด้วยสภาวะต่าง ๆ

สภาวะที่	วิธีการสกัด			ร้อยละของการกลับคืน (%)			
	เฟสคงที่	การล้าง	การชะ	OTC	DC	TC	CTC
1	HLB	5% MeOH, 5 mL	MeOH	52.12	nd	87.83	104.06
2	HLB	10% MeOH, 10 mL	MeOH	97.25	nd	86.03	81.52
3	HLB+ IEC*	-	1.0 M oxalic : ACN (80:20)	18.56	20.93	6.89	32.38
4	HLB+ IEC*	-	2% formic ใน MeOH	nd	nd	nd	nd
5	HLB+ IEC*	-	NH_3 : MeOH (5:95)	nd	nd	nd	nd

หมายเหตุ nd = not detected

IEC = Ion Exchange Chromatography

* = ISOLUTE SCX-2 strong cation exchange sorbents



ภาพ 25 โครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดสารเตตราซัยคลินวิธีต่างๆ

หมายเหตุ a = สกัดแบบ 1 b = สกัดแบบ 2 c = สกัดแบบ 3 d = สกัดแบบ 4 และ e = สกัดแบบ 5

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation of method) ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์

ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation of method) สารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ จะศึกษาพารามิเตอร์ ต่างๆ ได้แก่ ความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ร่วมด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีเติมสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลินให้มีระดับความเข้มข้น 50 100 และ200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่พีเอชเท่ากับ 4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวที่ได้มาโหลดผ่านลงในเฟสของแข็งชนิด HLB แล้วทำการล้างด้วยสารละลาย 10% เมธานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการชะเอาสารกลุ่ม เตตราซัยคลินออกจากเฟสของแข็งด้วยเมธานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำ residue ที่ได้มาละลายด้วยสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 8.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปฉีดวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ จากวิธีการดังกล่าวสามารถทำการทดสอบสารกลุ่มเตตราซัยคลินได้เพียงสามตัวเท่านั้น คือ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ส่วนด็อกซีซัยคลินไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวได้เพราะเนื่องจากไม่สามารถกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไปรบกวนการประมวลผลของสารดังกล่าวได้

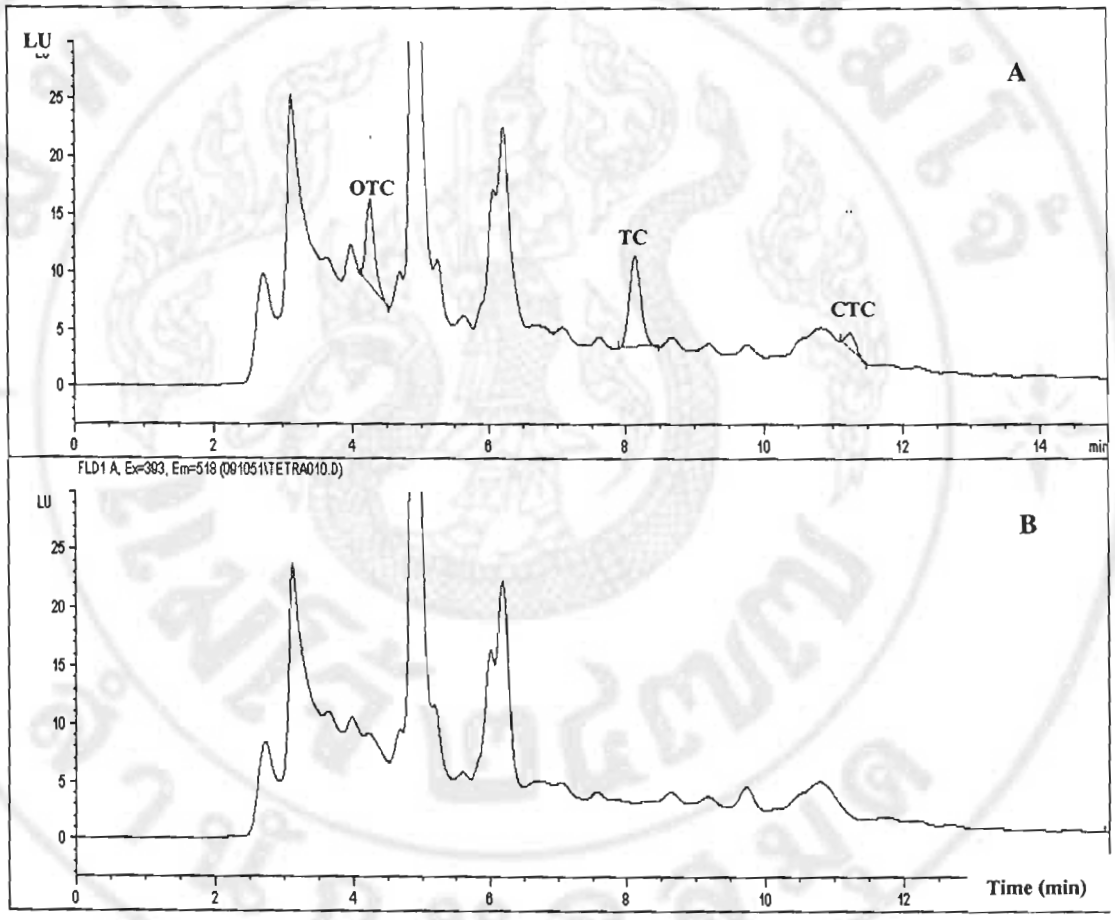
1. การศึกษาหาความถูกต้อง ความแม่นยำ ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง

เมื่อนำตัวอย่างน้ำผึ้งดอกลำไยที่เติมสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลินให้มีระดับความเข้มข้น 50 100 และ200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ทำการสกัดภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดลองพบว่า นำสารที่สกัดได้ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ทั้งสามระดับความเข้มข้น ได้ร้อยละของการกลับคืนมากกว่า 80% และ ค่า % RSD น้อยกว่า 10% แสดงดังตาราง 25 และแสดงดังภาพ 26 จากผลการทดลองสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตรา

ซัยคลินในน้ำผึ้งดังกล่าวมีความมีความแม่นยำ และความถูกต้องมากกว่า 80% มีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับในการตรวจสารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งได้ เมื่อนำค่า SD ที่ได้จากการคำนวณของปริมาณที่ตรวจวัดมาพล็อตกับค่าของแต่ละความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ เพื่อหาค่า จุดตัดแกน Y (SD_0) แสดงดังภาพ 27 28 และ 29 แล้วนำค่า SD_0 มาคำนวณหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ดังสรุปไว้ในตาราง 26 จากผลการทดลองพบว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งสามารถตรวจได้ในปริมาณต่ำสุดของการตรวจ ของออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และ คลอเตตราซัยคลิน เท่ากับ 3.39 0.30 และ 4.68 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนปริมาณต่ำสุดของการตรวจวิเคราะห์ ของสารออกซีเตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตราซัยคลินในน้ำผึ้ง เท่ากับ 11.30 1.00 และ 15.60 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ จากปริมาณต่ำสุดของการตรวจ และปริมาณต่ำสุดของการตรวจวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และ คลอเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในน้ำผึ้งในระดับที่ต่ำกว่ามาตรฐานของประเทศญี่ปุ่นและประเทศเบลเยียมได้ โดยทั้งสองประเทศได้กำหนดให้มีสารกลุ่มเตตราซัยคลินตกค้างได้ไม่เกิน 0.1 mg/kg (Dinkov, et al., 2005) และ 50 µg/kg (Reybroeck, 2003) ตามลำดับ ส่วนมาตรฐานของยุโรปกำหนดให้ตกค้างไม่เกิน 10 µg/kg (Agricultural and Processed Food Products Export Development Authority, 2005) ดังนั้นอาจใช้ตรวจวิเคราะห์ได้เฉพาะ เตตราซัยคลิน เท่านั้น เพราะเนื่องปริมาณต่ำสุดของการตรวจวิเคราะห์ มีค่าต่ำกว่า 10 µg/kg

ดังนั้นจากการทดลองจึงพบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ สารออกซีเตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และ คลอเตราซัยคลิน ที่ตกค้างในน้ำผึ้ง โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ตามมาตรฐานของ Euracham (Eurachem guide, 1998) และ Codex (Codex alimentarius , 2003) และจากวิธีการตรวจสอบดังกล่าวปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด ของ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และ คลอเตตราซัยคลิน เท่ากับ 3.39 0.30 และ 4.68 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจวิเคราะห์ปริมาณต่ำสุด ของสารออกซีเตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตราซัยคลินในน้ำผึ้ง เท่ากับ 11.30 1.00 และ 15.60 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ และมีความเหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์ สารออกซีเตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และ คลอเตราซัยคลิน ที่ตกค้างในน้ำผึ้งที่ระดับต่ำกว่า 16 µg/kg วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวมีข้อแตกต่างจากงานวิจัยของ Pena et al. (2005) ซึ่งงานวิจัยดังกล่าววิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินได้เพียงสองชนิดคือ ออกซีเตตราซัยคลิน และ เตตราซัยคลิน เท่านั้น และต้องทำการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอนก่อนที่จะทำการฉีดวิเคราะห์ รวมถึงต้องมีการทำ post column เพื่อทำให้ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลินอยู่ในรูปอนุพันธ์ก่อนทำ

การฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งงานวิจัยนี้ไม่ต้องเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ จึงทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในการซื้อเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำขั้นตอนของ post column ส่งผลให้ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมืออุปกรณ์ดังกล่าวไม่ต้องจัดซื้อเครื่องมือเพิ่มเติม ก็สามารถทำการวิเคราะห์สารกลุ่ม เตตราซัยคลิน รวมถึงสามารถลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ลงได้



ภาพ 26 โครมาโทแกรมของน้ำผึ้งที่มีการเติมสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน

หมายเหตุ A: น้ำผึ้งดอกลำไยที่มีการเติมสารมาตรฐาน ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน B : น้ำผึ้งดอกลำไยที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน

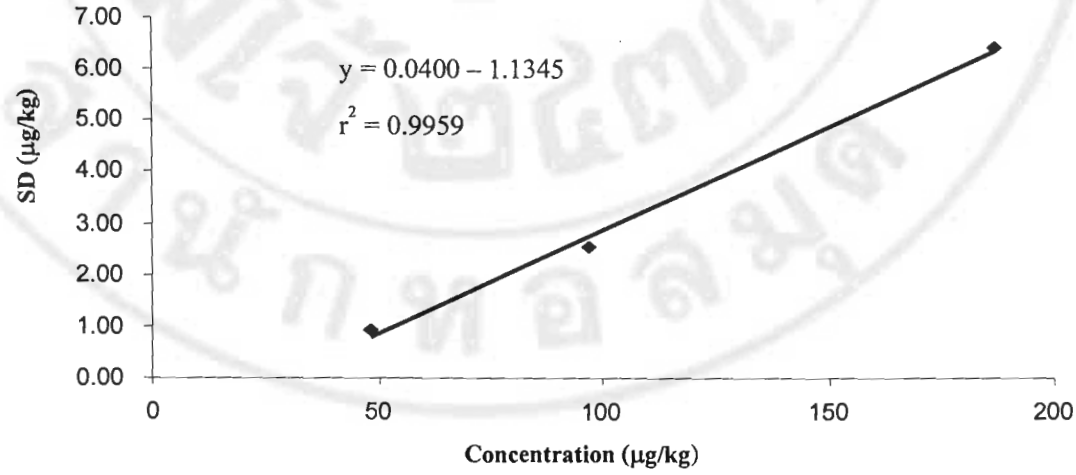
ตาราง 25 ความแม่นยำ (precision)ความถูกต้อง (accuracy)

No	OTC		TC		CTC	
	Found (µg/kg)	%Recovery	Found (µg/kg)	%Recovery	Found (µg/kg)	%Recovery
	Spiked level 50 µg/kg					
1	49.11	98.23	46.96	93.93	44.00	88.01
2	46.82	93.63	48.29	96.57	49.35	98.69
3	48.71	97.42	48.39	96.79	43.85	87.71
4	48.95	97.91	48.17	96.33	43.63	87.26
5	48.70	97.40	48.39	96.79	47.34	94.68
mean	48.46	96.92	48.04	96.08	45.63	91.27
SD	0.93	1.87	0.61	1.22	2.58	5.15
% RSD	1.93	1.93	1.27	1.27	5.64	5.64
No	Spiked level 100 µg/kg					
1	94.89	94.89	83.85	83.85	81.59	81.59
2	100.13	100.13	85.39	85.39	80.63	80.63
3	94.91	94.91	89.16	89.16	86.53	86.53
4	99.73	99.73	86.88	86.88	78.05	78.05
5	96.55	96.55	84.88	84.88	80.81	80.81
mean	97.25	97.25	86.03	86.03	81.52	81.52
SD	2.55	2.55	2.06	2.06	3.10	3.10
% RSD	2.62	2.62	2.40	2.40	3.80	3.80

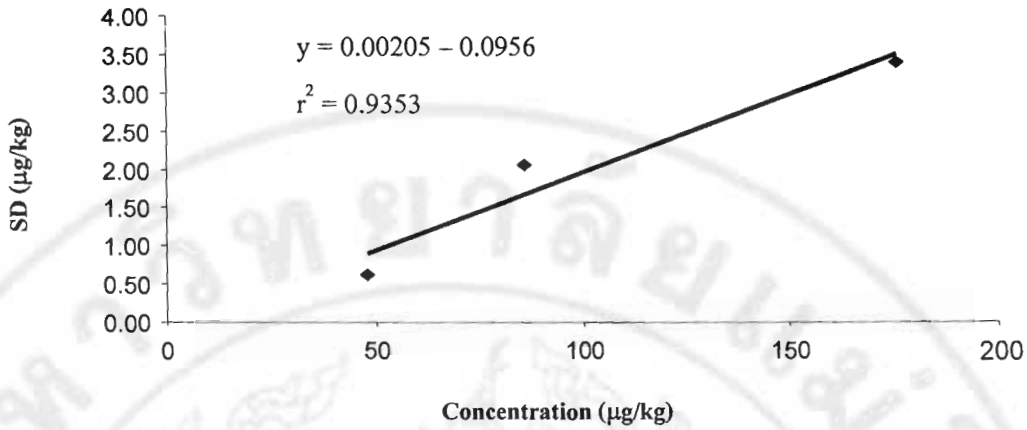
ตาราง 25 (ต่อ)

No	OTC		TC		CTC	
	Found (µg/kg)	%Recovery	Found (µg/kg)	%Recovery	Found (µg/kg)	%Recovery
	Spiked level 200 µg/kg					
1	178.10	89.05	176.69	88.34	186.58	93.29
2	184.04	92.02	174.59	87.29	182.37	91.19
3	193.00	96.50	171.35	85.68	173.72	86.86
4	185.17	92.59	174.50	87.25	186.67	93.34
5	193.12	96.56	180.52	90.26	181.27	90.64
mean	186.69	93.34	175.53	87.77	182.12	91.06
SD	6.41	3.20	3.38	1.69	5.29	5.29
% RSD	3.43	3.43	1.92	1.92	2.91	5.81

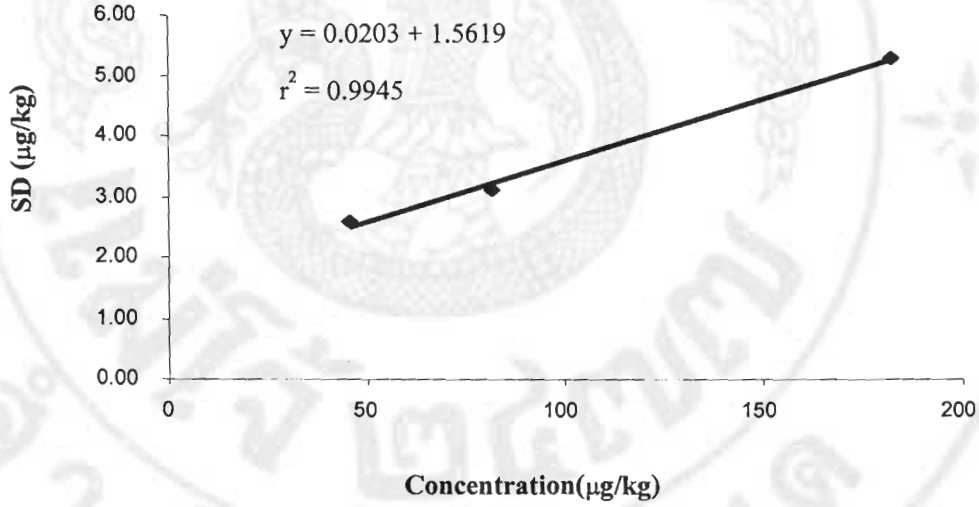
หมายเหตุ n = 5



ภาพ 27 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง SD กับความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ตรวจวิเคราะห์ได้



ภาพ 28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง SD กับความเข้มข้นของเตตราซัยคลินที่ตรวจวิเคราะห์ได้



ภาพ 29 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง SD กับความเข้มข้นของคลอเตตราซัยคลินที่ตรวจวิเคราะห์ได้

ตาราง 26 สรุปค่าปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลิน

สาร	SD_0	LOD (µg/kg) = $3SD_0$	LOQ (µg/kg) = $10SD_0$
Oxytetracycline	1.13	3.39	11.30
Tetracycline	0.10	0.30	1.00
Chlortetracycline	1.56	4.68	15.60

วิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำผึ้งที่วางขายในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง จาก 5 ยี่ห้อ และแยกเป็นชนิดของน้ำผึ้งที่ได้จากแหล่งน้ำหวาน ได้แก่ น้ำผึ้งจากดอกลำไย น้ำผึ้งจากดอกสาบเสือ น้ำผึ้งจากดอกทานตะวัน น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ และน้ำผึ้งจากดอกไม้ป่า หลังจากนั้นนำตัวอย่างมากำหนดรหัสเพื่อเป็นการชี้บ่งและรายละเอียดของตัวอย่างนั้นๆ ระหว่างรอทำการตรวจวิเคราะห์จะเก็บรักษาตัวอย่างน้ำผึ้งที่อุณหภูมิประมาณ 5 °C และเก็บให้พ้นแสง โดยรายละเอียดของตัวอย่างแสดงดังตาราง 27 เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการสุ่มเก็บมาได้ทำการวิเคราะห์ทั้งทางด้านเคมีและยาปฏิชีวนะที่ตกค้าง ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 28

ตาราง 27 รายละเอียดของตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีการเก็บตัวอย่าง

ยี่ห้อ	รหัสตัวอย่าง	ชนิดน้ำผึ้ง	แหล่งที่มา	วันเดือนปีที่ผลิต
1	1LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย	จังหวัดลำพูน	9/6/51
	1SUH	น้ำผึ้งจากดอกทานตะวัน	จังหวัดน่าน	6/8/51
	1FRH	น้ำผึ้งจากดอกไม้ป่า	จังหวัดน่าน	5/8/51
2	2LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย	จังหวัดลำพูน	8/6/51
	2WFH	น้ำผึ้งจากสาบเสือ	จังหวัดเชียงราย	7/2/51
3	3LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย	จังหวัดลำพูน	16/7/51
	3FRH	น้ำผึ้งจากดอกไม้ป่า	จังหวัดลำพูน	26/9/51
	3SUH	น้ำผึ้งจากทานตะวัน	จังหวัดน่าน	22/8/51
	3LYH	น้ำผึ้งลิ้นจี่	จังหวัดเชียงใหม่	6/8/51
4	4LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย	จังหวัดลำพูน	10/8/51
	4FRH	น้ำผึ้งจากดอกไม้ป่า	จังหวัดลำพูน	21/8/51
	4LYH	น้ำผึ้งลิ้นจี่	จังหวัดเชียงใหม่	15/8/51
5	5LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย	เชียงใหม่	12/6/51

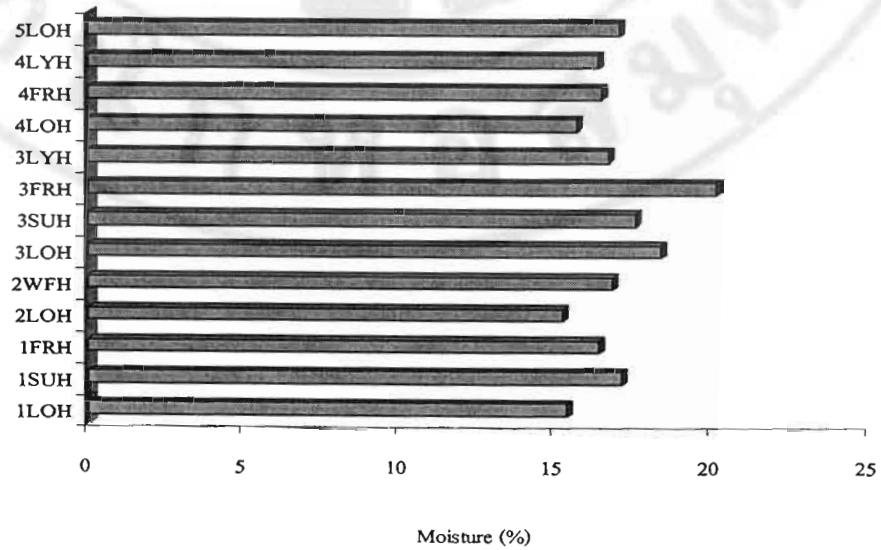
หมายเหตุ 1 = ยี่ห้อที่ 1 2 = ยี่ห้อที่ 2 3 = ยี่ห้อที่ 3 4 = ยี่ห้อที่ 4 5 = ยี่ห้อที่ 5 LOH = น้ำผึ้งดอกลำไย SUH = น้ำผึ้งดอกทานตะวัน WFH= น้ำผึ้งสาบเสือ LYH = น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ FRH = น้ำผึ้งดอกไม้ป่

ตาราง 28 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินและคุณสมบัติทางเคมี ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่วางขายตามตลาดในจังหวัดเชียงใหม่

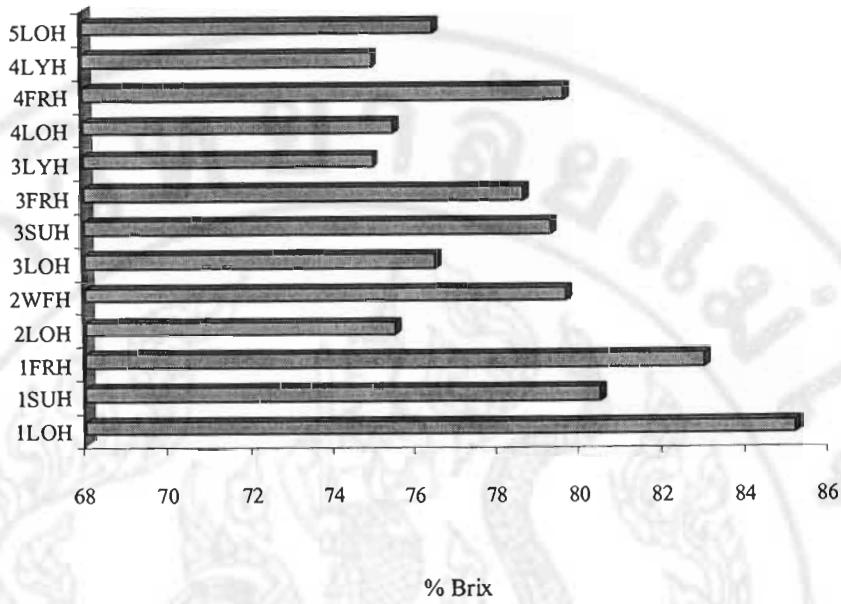
รหัสตัวอย่าง	แหล่งของน้ำผึ้ง	ความหวาน (% Brix)[a]	pH[a]	HMF(mg/kg)[a]	Moisture (%)[a]	สารกลุ่มเตตราซัยคลิน (µg/kg)[b]			
						OTC	TC	CTC	Total
1LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย 1	85.17	4.24	12.31	15.4	60.61	nd	nd	60.61
1SUH	น้ำผึ้งจากทานตะวัน 1	80.5	3.71	13.95	17.16	75.67	nd	nd	75.67
1FRH	น้ำผึ้งจากดอกไม้ป่า 1	83	4.05	15.57	16.39	nd	32.77	44.7	77.47
2LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย 2	75.5	4.42	5.2	15.24	nd	nd	nd	nd
2WFH	น้ำผึ้งจากสาบเสือ 2	79.67	3.87	27.2	16.84	161.42	nd	26.46	187.88
3LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย 3	76.5	4.42	0.25	18.38	32.35	nd	nd	32.35
3SUH	น้ำผึ้งจากทานตะวัน 3	79.33	3.6	12.96	17.59	nd	nd	nd	nd
3FRH	น้ำผึ้งจากดอกไม้ป่า 3	78.67	3.59	79.35	20.18	nd	nd	nd	nd
3LYH	น้ำผึ้งลิ้นจี่ 3	75	4.03	1.26	16.72	60.15	7.18	nd	67.33
4LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย 4	75.5	4.58	12.31	15.74	32.72	105.85	nd	138.57
4FRH	น้ำผึ้งจากดอกไม้ป่า 4	79.67	3.87	15.57	16.51	nd	12.87	nd	12.87
4LYH	น้ำผึ้งลิ้นจี่ 4	75	4.03	1.45	16.39	106.88	14.06	nd	120.94
5LOH	น้ำผึ้งจากดอกลำไย 5	76.5	4.58	12.31	17.07	nd	nd	nd	nd

หมายเหตุ [a] คือการตรวจวิเคราะห์ n = 3, [b] คือการตรวจวิเคราะห์ n = 2, nd หมายถึง ตรวจไม่พบสารออกซีเตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 3.39, 0.30 และ 4.68 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

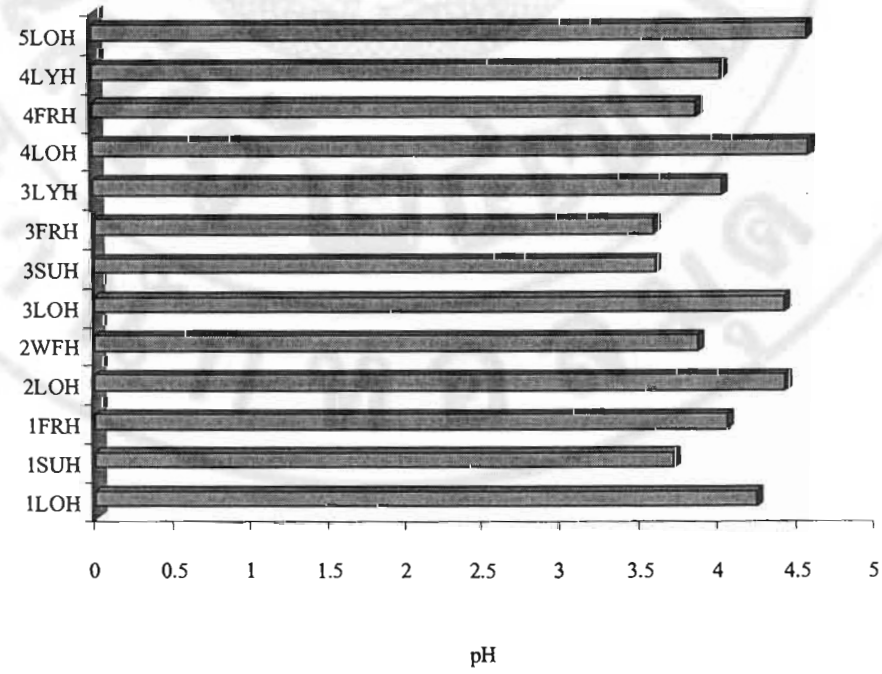
จากการทดลองเมื่อนำตัวอย่างน้ำผึ้งที่วางขายในจังหวัดเชียงใหม่ 13 ตัวอย่าง โดยมีการผลิตภายในปี 2551 และเมื่อตรวจคุณสมบัติทางเคมีพบว่ามีค่าความชื้นอยู่ในช่วง 15.24–20.18 กรัมต่อ 100 กรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 16.89±1.31 กรัมต่อ 100 กรัม และน้ำผึ้งจากดอกไม้ป่ายี่ห้อที่ 3 มีค่าความชื้นมากที่สุด แสดงดังตาราง 28 และแสดงดังภาพ 30 สำหรับความหวานของน้ำผึ้งจะมีค่าความหวานอยู่ในช่วง 75.00–85.17%brix มีค่าเฉลี่ย 78.46±3.2%brix พบว่าน้ำผึ้งจากดอกลำไยยี่ห้อที่ 1 มีความหวานมากที่สุดเท่ากับ 85.17% brix แสดงดังภาพ 31 ค่าพีเอชของน้ำผึ้งจะอยู่ในช่วง 3.59–4.58 โดยมีค่าเฉลี่ย 4.09±0.36 น้ำผึ้งจากดอกลำไย ยี่ห้อที่ 5 และ 4 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.58 แสดงดังตาราง 28 และแสดงดังภาพ 32 ในส่วนของค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) จะอยู่ในช่วง 0.25 – 79.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 16.13±20.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจะพบว่ายี่ห้อที่ 3 น้ำผึ้งชนิดดอกสาบเสือมีค่าของค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) ค่อนข้างสูง แสดงดังภาพ 33 เนื่องจากมีสีที่ค่อนข้างเข้มจึงทำให้ค่าของไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) มีค่าสูงถึง79.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากมาตรฐานของกระทรวงธารณสุข (กระทรวงสาธารณสุข, 2543) ได้กำหนดให้ค่าของ ไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) ห้ามเกิน 80 mg/kg เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบกับการวิจัยของหน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สิริวัฒน์ และ เพ็ญศรี, 2529) มีค่าที่สอดคล้องกันและผลการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีพบว่า ตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 13 ตัวอย่าง มีค่าความชื้น ค่าพีเอช และค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) มีคุณภาพตามมาตรฐานกระทรวงธารณสุข (กระทรวงสาธารณสุข, 2543)



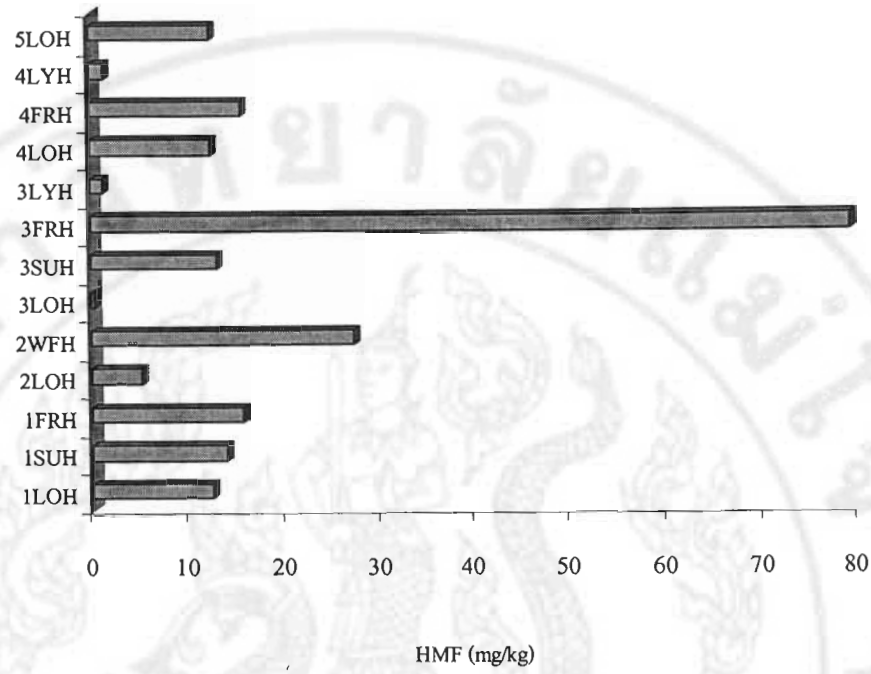
ภาพ 30 กราฟแสดงปริมาณความชื้นในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ



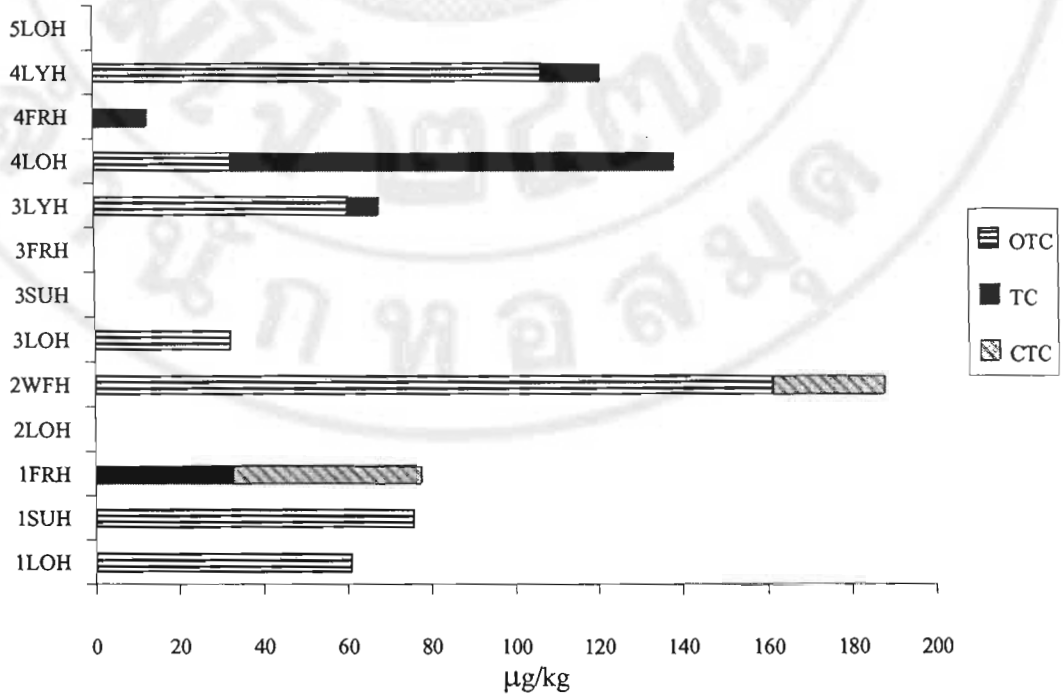
ภาพ 31 กราฟแสดงปริมาณความหวานในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ



ภาพ 32 กราฟแสดงค่าพีเอชในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ



ภาพ 33 กราฟแสดงค่า HMF ในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ



ภาพ 34 กราฟแสดงค่าปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจ

สำหรับยาปฏิชีวนะสารกลุ่มเตตราซัยคลินนั้นเมื่อทำการตรวจวัดโดยวิธีที่ได้จากการทดลอง พบสารออกซีเตราซัยคลิน 7 ตัวอย่าง (50.84%) จากตัวอย่างทั้งหมด 13 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 32.35–161.42 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 40.75±50.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจพบเตตราซัยคลิน 5 ตัวอย่าง (29.44%) มีค่าอยู่ในช่วง 7.18–105.85 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 13.29±29.44 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจพบคลอเตตราซัยคลิน 2 ตัวอย่าง (13.87%) มีค่าอยู่ในช่วง 26.46–44.70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 5.47±13.87 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าน้ำผึ้งจากดอกสาบเสือยี่ห้อที่ 2 ตรวจพบปริมาณรวมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินสูงที่สุด คือเท่ากับ 187.86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งแหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำผึ้งดังกล่าวมาจากจังหวัดเชียงราย แสดงดังภาพ 34 รองลงมาคือน้ำผึ้งจากดอกลำไยยี่ห้อที่ 4 ตรวจพบปริมาณรวมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินเท่ากับ 138.57 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำผึ้งดังกล่าวมาจากจังหวัดลำพูน และน้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ ยี่ห้อที่ 4 ตรวจพบปริมาณรวมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินเท่ากับ 120.94 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำผึ้งดังกล่าวมาจากจังหวัดลำพูนในส่วนที่เหลือตรวจพบปริมาณรวมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินอยู่ในช่วง 0–77.47 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

จากการทดลองพบว่าถึงแม้ตัวอย่างน้ำผึ้งจะผ่านการผลิตมาประมาณ 2-3 เดือน แต่ก็สามารถตรวจเจอสารกลุ่มเตตราซัยคลิน แสดงว่าสารกลุ่มเตตราซัยคลินมีความคงตัวได้ดีเมื่ออยู่ในน้ำผึ้ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Landerkin and Katznelson (1957) และพบว่าเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดใกล้เคียงยังคงมีการใช้สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ส่งผลให้ตัวอย่างที่สุ่มตรวจ ตรวจพบสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ประเทศยุโรปกำหนด โดยกำหนดให้มีสารกลุ่ม เตตราซัยคลินตกค้างไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Agricultural and Processed Food Products Export Development Authority, 2005) ดังนั้นตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผลิตในปี 2551 ที่วางขายในเขตจังหวัดเชียงใหม่ มีปริมาณการตกค้างของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานยุโรปกำหนดอย่างมาก หากมีการส่งออกน้ำผึ้งจากเขตเชียงใหม่ไปยังประเภทยุโรปจะส่งผลกระทบต่อการส่งออกอย่างเป็นที่แน่นอน

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณของ ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ เตตราซัยคลินที่ตกค้างในน้ำผึ้ง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสมที่ให้ความถูกต้อง แม่นยำสูง รวมถึงใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่น้อยลง ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวประกอบไปด้วย การหาสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE) และการหาความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) ปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ของสารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำผึ้ง หลังจากนั้นจึงนำวิธีการทดสอบวิเคราะห์นี้มาทดสอบหาปริมาณของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราซัยคลิน ที่ตกค้างในตัวอย่างของน้ำผึ้ง โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างของน้ำผึ้งที่การวางขายในจังหวัดเชียงใหม่ โดยสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ได้แก่ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์นั้น โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ pH 8.1 และเมธานอล เป็นตัวพา และคาร์บอน 8 เป็นเฟสคงที่ (column Eclipse C_8, 4.6 mm x 5 μm x 150 mm) ที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสง เท่ากับ 393 nm และ 518 nm ตามลำดับ และเมื่อทำการฉีดวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ในช่วงความเข้มข้น 5–1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 8.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.995

เมื่อทำการสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine พีเอชเท่ากับ 4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวที่ได้มาโหลดผ่านลงในเฟสของแข็งชนิด HLB แล้วทำการล้างด้วย 10 % เมธานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการชะเอาสารกลุ่มเตตราซัยคลินออกจากเฟสของแข็งด้วยเมธานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วทำให้แห้ง นำ residue ที่ได้มาละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 8.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปฉีดวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมด้วยตัวตรวจวัดแบบ

ฟลูออเรสเซนซ์ จากวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ได้แก่ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ในส่วนของ ด็อกซีซัยคลินนั้นยังคงมีปัญหาของการบดบังจากสิ่งปนเปื้อนจากสารหอมระเหย (natural product) ที่ติดมาดอกไม้หรือแหล่งของน้ำหวานที่ผึ้งไปเก็บมา จึงทำให้ไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์สารตัวดังกล่าวได้ และที่วิธีการดังกล่าวทำให้สามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) ของ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ในน้ำผึ้งเท่ากับ 3.39 0.30 และ 4.68 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ของ ออกซีเตตราซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน เท่ากับ 11.30 1.00 และ 15.60 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และเมื่อได้ทำการเติมสารมาตรฐาน ออกซีเตตร้าซัยคลิน เตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างน้ำผึ้ง พบว่าทั้งสามระดับความเข้มข้นได้ค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) สูงกว่า 80% เมื่อนำตัวอย่างน้ำผึ้งที่วางขายในจังหวัดเชียงใหม่ 13 ตัวอย่าง ตรวจคุณสมบัติทางเคมีพบว่า มีค่าความชื้นอยู่ในช่วง 15.24–20.18 กรัมต่อ 100 กรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 16.89±1.31 กรัมต่อ 100 กรัม ความหวานของน้ำผึ้งจะอยู่ในช่วง 75.00–85.17% brix โดยมีค่าเฉลี่ย 78.46±3.2% brix ค่าพีเอชจะอยู่ในช่วง 3.59–4.58 โดยมีค่าเฉลี่ย 4.09±0.36 ในส่วนของค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) จะอยู่ในช่วง 0.25 – 79.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 16.13±20.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจะพบว่ายี่ห้อที่ 3 น้ำผึ้งชนิดดอกสาบเสือจะมีค่าของค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) ค่อนข้างสูงเนื่องจากมีสีที่ค่อนข้างเข้มจึงทำให้ค่าของไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) มีค่าสูงถึง 79.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการตรวจวิเคราะห์พบว่าน้ำผึ้งที่สุ่มมาตรวจทั้ง 13 ตัวอย่าง มีค่าความชื้น ค่าพีเอช และ ค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (HMF) ตรงตามคุณภาพตามกระทรวงธารณสุขกำหนด (กระทรวงสาธารณสุข, 2543)

สำหรับยาปฏิชีวนะสารกลุ่มเตตราซัยคลินนั้นเมื่อทำการตรวจวัดโดยวิธีที่ได้จากการทดลอง พบสารออกซีเตราซัยคลิน 7 ตัวอย่าง (50.84%) จากตัวอย่างทั้งหมด 13 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 32.35 – 161.42 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 40.75±50.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจพบเตตราซัยคลิน 5 ตัวอย่าง (29.44%) มีค่าอยู่ในช่วง 7.18–105.85 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 13.29±29.44 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจพบคลอเตราซัยคลิน 2 ตัวอย่าง (13.87%) มีค่าอยู่ในช่วง 26.46–44.70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ย 5.47±13.87 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการตรวจพบว่าน้ำผึ้งจากดอกสาบเสือยี่ห้อที่ 2 ตรวจพบปริมาณรวมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินสูงที่สุด คือเท่ากับ 187.86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งแหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำผึ้งดังกล่าวมาจากจังหวัดเชียงราย และพะเยา รองลงมาคือน้ำผึ้งจากดอกลำไยยี่ห้อที่

4 ตรวจพบปริมาณรวมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินเท่ากับ 138.57 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำผึ้งดังกล่าวมาจากจังหวัดลำพูน และน้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ ยี่ห้อที่ 4 ตรวจพบปริมาณรวมของสารกลุ่มเตตราซัยคลินเท่ากับ 120.94 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำผึ้งดังกล่าวมาจากจังหวัดลำพูน ในส่วนที่เหลือตรวจพบปริมาณรวมของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน อยู่ในช่วง 0 – 77.47 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากผลที่ได้พบว่าเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่และใกล้เคียงยังคงมีการใช้สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ส่งผลให้ตัวอย่างที่สุ่มตรวจ ตรวจพบสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่สูงกว่าเกณฑ์ที่ประเทศยุโรปกำหนดมาตรฐานของสหภาพยุโรป โดยกำหนดให้มีสารกลุ่มเตตราซัยคลินตกค้างไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Agricultural and Processed Food Products Export Development Authority, 2005) ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีการตรวจสอบและเร่งให้การประชาสัมพันธ์ให้กับเกษตรกรได้ตระหนักถึงอันตรายเกี่ยวกับสารกลุ่มดังกล่าวเพื่อความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค และช่วยให้การส่งออกน้ำผึ้ง

ข้อเสนอแนะ

1. วิธีการดังกล่าวยังไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ ด็อกซีซัยคลิน ได้ ดังนั้นจึงควรปรับปรุงวิธีการทดลอง โดยอาจจะต้องทำการปรับสภาวะในการฉีดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อที่จะสามารถฉีดแยกวิเคราะห์ ด็อกซีซัยคลินออกจากสิ่งปนเปื้อนได้ หรือทำการปรับปรุงในส่วนของวิธีการสกัดเพื่อที่จะสามารถกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ลงไปได้

2. ควรทำการศึกษา พัฒนา และปรับปรุงวิธีการทดลองเพื่อสามารถตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ ได้พร้อมๆ กัน ซึ่งจะทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ลงได้ในแต่ละครั้ง

3. กรมวิชาการเกษตร กรมส่งออก หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีการตรวจสอบและเร่งให้การประชาสัมพันธ์ให้กับเกษตรกรได้ตระหนักถึงอันตรายเกี่ยวกับสารกลุ่มดังกล่าวเพื่อความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2543. **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 เรื่อง น้ำผึ้ง.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.qmaker.com/fda/new/images/cms/top_upload/1143286392_ntf211-2543.pdf. (19 พฤษภาคม2550).

โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. 2545. **น้ำผึ้ง.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www. dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp_12_2545_hunny.pdf. (19 พฤษภาคม2550).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะเภสัชศาสตร์. 2544. **ยาปฏิชีวนะคืออะไร.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.pharm.chula. ac.th / Surachai/academic/CNS-Drgs/radio07.htm. (19 พฤษภาคม 2550).

นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์ และ คณิตา ตังคณานุรักษ์. 2547. **สเปกโทรสโคปีด้านการวิเคราะห์.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาเกษตรศาสตร์. 550 น.

บริษัทไทยลานนาฟาร์ม จำกัด. 2550. **เกี่ยวกับน้ำผึ้ง.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www. thailanna.co.th/index.phd?. (19 พฤษภาคม 2550).

บุญส่ง วิญญา. 2539. **Spectroscopy**. เชียงใหม่ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 100 น.

ปริญญา มาสวัสดิ์. 2550. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนมโดยวิธี On–line SPE-FIA. **LAB. TODAY**. 6(42): 41-44.

พงษ์เทพ อัครธนกุล. 2528. **น้ำผึ้งและผลิตภัณฑ์จากรังผึ้ง**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. 250 น.

เพ็ญพรรณ อัศวกุล และ โอทอง สวัสดีมงคล. 2539. **Liquid Chromatography ในงานวิเคราะห์.** กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 250 น.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2534. **หลักและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพ ฯ: ชวน พิมพ์. 886 น.

ระวีวรรณ สิทธิ์โอสถ. 2547. **เคมีเภสัช.** กรุงเทพฯ: คณะวิทยาสาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 552 น.

ลาวัลย์ ศรีพงษ์. 2544. **การวิเคราะห์เชิงฟลูออโรเมตรี**. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 150 น.

สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. 2550. **การวิเคราะห์สารปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินและเตตราซัยคลินที่ตกค้างในน้ำตัวอย่างโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.scisoc.or.th/stt/28/web/content /A_01/A73.htm. (25 พฤษภาคม2550).

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และ เพ็ญศรี ตังคณะสิงห์. 2529. **ชีววิทยาของผึ้ง**. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 147 น.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2547. **สมุนไพรบำบัดโรคงานวิจัยยกเกรดน้ำผึ้งเฉี้ยง.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.businessthai.co.th/content.php?data =408624_Special%20Report. (25 พฤษภาคม2550).

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2526. **น้ำผึ้ง.** มอก.470-2526

ส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมงสำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2547. **การผลิตการตลาดน้ำผึ้ง.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://ndoae.doae.go.th/news/news_0102.html. (25 พฤษภาคม 2550).

Agricultural and Processed Food Products Export Development Authority. 2005. **Residue Monitoring Plan for 2005 for Drugs and Pesticides for Export of Honey to the European Union .** [Online]. Available http://www.apeda.com/pesticides/RMP_Honey05.pdf . (19 May 2008).

Alfredsson, G., C. Branzel and A. Lundstrom. 2005. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC–MS/MS. **Analytica Chimica Acta** 529: 47-51.

Anderson, C. R., H. S. Rupp and W. Wu. 2005. Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatograph. **Journal of Chromatography A** 1075: 23-32.

AOAC Official Method. 2000. **Moisture in honey.** AOAC 969.38.

Aranda, M., E. Cisternas and R. Villegas. (2006). Determination of oxytetracyclien in honey by ion-pair HOLC with cationic-SPE. **Electronic journal of Food and plants Chemistry** 1(1): 12-15.

Australia New Zealand Food Authority. 2002. **Final Assessment Report (Inquiry –S.17) Application A422 Maximum Residue Limits Antibiotics.** [Online]. Available http://www. foodstandards. gov.au/ _srcfiles/A422_FAR.pdf. (19 May 2008).

Biotage. 2008. **Introduction to Solid Phase Extraction (SPE) for Reaction Work-up.** [Online]. Available http://www.biotage.com/Print.aspx?id=35833. (24 July 2008).

Blackwell, P. A., H. C. Holten - Lutzhoft and P. Kay. 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. **Talanta** 64(4): 1058-1064.

Braithwaite, A. and F. J. Smith. 1996. **Chromatographic method.** London: Chapman & Hall. 558 p.

Christian, G. D. 1994. **Analytical Chemistry.** New York: John Wiley & Sons. 812 p.

Cinquina, A. L., F. Longo and R. Cozzani. 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. **Journal of Chromatography A** 987(1-2): 227-233.

Codex alimentarius. 2003. **Review of Performance Based Criteria for Methods of Analysis for Veterinary Drug Residues in Food.** CX/RVDF 03/01-2003.

_____. 2007. **Veterinary drug Residues in Food.** [Online]. Available http://www. codexalimentarius.net/mrls/servlet/VetDrugServlet?Substances. (19 May 2008).

Council Regulation (EEC) No. 2377/90. 1990. Laying down a Community Procedure for the Establishment of Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products in Foodstuffs of Animal Origin. **Official Journal of the European Communities** 224: 1-12

Couto, C. M. C. M., J. L. F. C. Lima and S. Reis. 1998. Tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline determination by flow injection potentiometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 18: 527-533.

Dinkov, D., I. Kanelov and I. Vashin. 2005. Persistence of tetracycline and oxytrtracycline in bee honey after improper application of bee families. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine** 8(3): 205-209.

Eurachem Guide. 1998. **The Fitness for Purpose of Analytical Method.** N.P : n.p. 60 p.

Furusawa, N. 2003. Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. **Talanta** 59(1): 155-159.

Halvatzis, S. A., M. M. Timotheou-Potamia and A. C. Calokerinos. 1993. Continuous-flow chemiluminomertric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with N-bromosuccinimide. **The analyst** 118: 633-637.

Huq, S., M. Garriques and K. M. R. Kullury. 2006. Role of zwitterionic structures in the solid-phase extraction based method development for clean up of tetracycline and oxytetracycline from honey. **Journal of Chromatography A** 1135: 12-18.

Kellner, R., J. M. Marmet and H. M. Widmer. 2004. **Analytical Chemistry.** 2th ed. Hong Kong : Ebner & Spiegle. 1181 p.

Landerkin, G. B. and H. Katznelson. 1957. Stability of Antibiotics in Honey and Sugar Syrup as affected by Temperature. **Applied and Environmental Microbiology** 5: 152-154.

Li, J., L. Chen and H. Zhang. 2008. Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. **Talanta** 75(5): 1245-1252.

Lu, H. T., Y. Jiang and M. H. Wong. 2004. Simultaneous determination of oxytetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline in tetracycline antibiotics by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Chromatographia.** 60: 259-264.

Marin, P. 2004. **Honey Quality standard.** [Online]. Available http://www.hipa. org.uk/ Documents /public/HONEY%20QUALITY.doc. (19 May 2008).

Michaud, V. 2005. **Antibiotic residues in Honey.** [Online]. Available. http;//www. apimondia.org/apiacta/articles/2005/Michaud_1. (31 May 2008).

Mitra, S. 2003. **Sample Preparation Technique in Analytical Chemistry.** New Jersey: John Wilg & Son. 457 p.

Nakazawa, H., S. Ino and H. Oka. 1999. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications** 732(1): 55-64.

Pena, A., A. Carbusa and B. Castillo. 1998. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 18: 839-845.

Pena, A., N. Pelantova and P. Solich. 2005. Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 3784-3788.

Reybroeck, W. 2003. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the belgian market. **Apiacta** 38:23-30.

Rouessac, F. and A. Rouessac. 2000. **Chemical Analysis.** New York :John Wiley & Sons. 445 p.

Salter, R. 2003. Charm II system comprehensive residue analysis system for honey. **Apiacta** 38:198-206.

Schneider, M. J., S. E. Braden and D. J. Donoghue. 2007. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B** 846(1-2): 8-13.

Senyuva, H., T. Ozden and Saricad D. Y. 2000. High performance liquid chromatographic determination of oxttetracycline residue in cured meat products. **Turkish Journal Chemistry** 24: 395-400.

Sithiporn Associates Co. Ltd. 2007. **การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิควิธี Solid Phase Extraction.** [Online]. Available http://www.sithiphorn.com/newweb/newsletter/31-3-2005- 1112256707.pdf. (31 May 2008).

Sithiporn Associates Co. Ltd. 2007. **การเตรียมตัวอย่างโดยวิธี Solid Phase Extraction.** [Online]. Available http://www.sithiphorn.com/newweb/newsletter/18-5-2005-1116388436.pdf. (31 May 2008).

Skoog, D. A., F. Holler and T. A. Nieman. 1998. **Instrumental analysis.** Philadelphia: Saunders College. 845 p.

Sokol, J. and E. Matisova. 1994. Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A** 669(1-2): 75-80.

Spisso, B. F., A. L. O. Jesue and M. A. Monteiro. 2007. Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk. **Analytica Chimica Acta** 581: 108-117..

Sung-Chul, K. and C. Kenneth. 2007. Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 387: 1301-1315.

Vinas, P., N. Balsalobre and M. H. Cordoba. 2004. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. **Journal of Chromatography A** 1022(1-2): 125-129.

Wan, G. H., H. Cui and X. F. Yu. 2005. Determination of tetracyclines residues in honey using high-performance liquid chromatography with potassium permanganate-sodium sulfite-[beta]-cyclodextrin chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography B** 824(1-2): 57-64.

Wang, L., H. Yang and X. Lu. 2008. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, 619(1): 54-58.

Waters Corporation. 2003. **Oasis Applications Notebook.** N.P : n.p. 130 p.

Weigel, S. and R. Gaterman. 2005. Screening of honey for residues of antibiotics by an optical biosensor. **Apiacta** 40 : 63-69.

Willard, H. H., L. L. Mertt and F. A. Setlle. 1998. **Instrumental Methods of Analysis.** California: Wadsworth. 895 p.

Thailabonline. (2000). **ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial drugs).** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www. thailabonline.com/drugs13.htm. (31 May 2008).

Zollinger, H. 1991. **Color Chemistry.** Weinheim: VCH. 496 p.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ)

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ)

จากหัวข้อการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation of method) เมื่อนำค่า SD ที่ได้จากการคำนวณร้อยละผลผลิตของสารมาตรฐานที่มีการเติมลงไปทั้งสามระดับความเข้มข้น นำค่าSD ที่ได้มาพล็อตกับค่าของแต่ละความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ เพื่อหาค่า จุดตัดแกน Y (SD_0) ดังแสดงในภาพ 27 SD_0 ที่ได้มาคำนวณหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) โดย

$$LOD = 3\ SD_0$$

$$LOQ = 10\ SD_0$$

เมื่อ SD_0 = คือจุดตัดแกน Y ที่ได้จากการพล็อตระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงไป กับค่า SD ที่ได้ของแต่ละความเข้มข้น

จากภาพ 27 เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง SD กับความเข้มข้นของสารออกซีเตตราซัยคลินที่มีการเติมลงไป จากสมการเส้นตรงที่ได้

$SD_0 = 1.13$

$LOD = 3(1.13)$

$= 3.39\ \mu g/kg$

$LOQ = 10(1.13)$

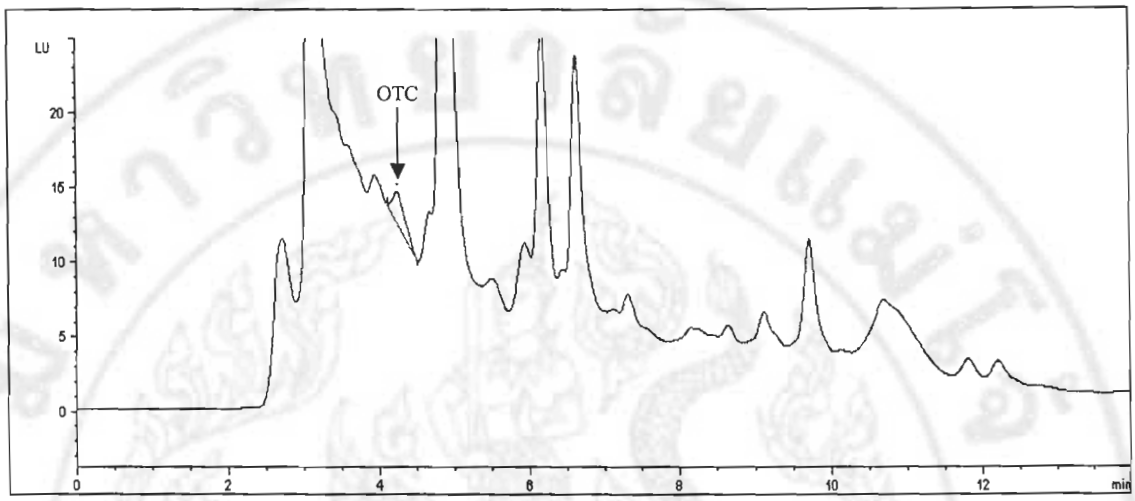
$= 11.30\ \mu g/kg$

ดังนั้น LOD มีค่าเท่ากับ 3.39 µg/kg และ LOQ มีค่าเท่ากับ 11.30 µg/kg

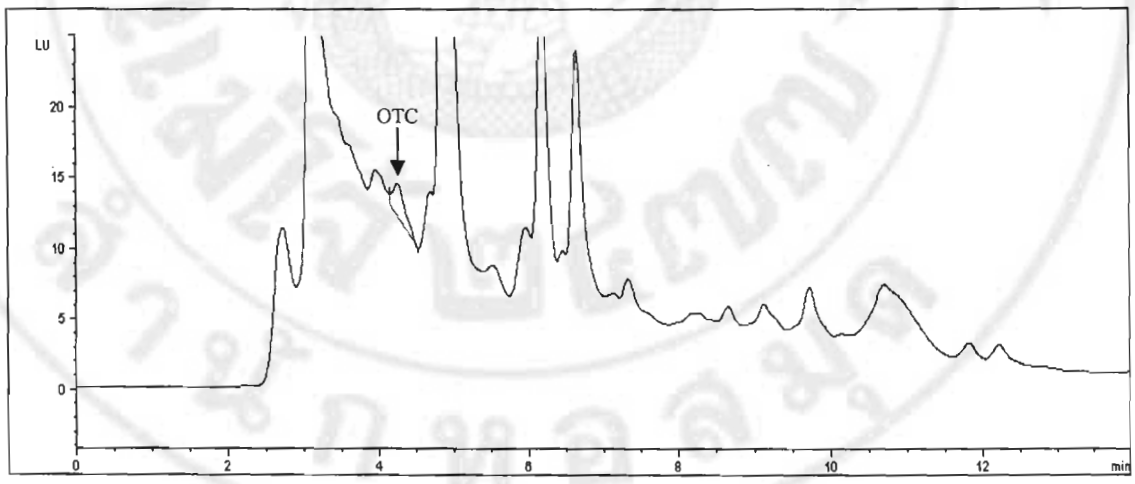
ภาคผนวก ข

ภาพโครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งที่สุ่มตรวจปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลิน

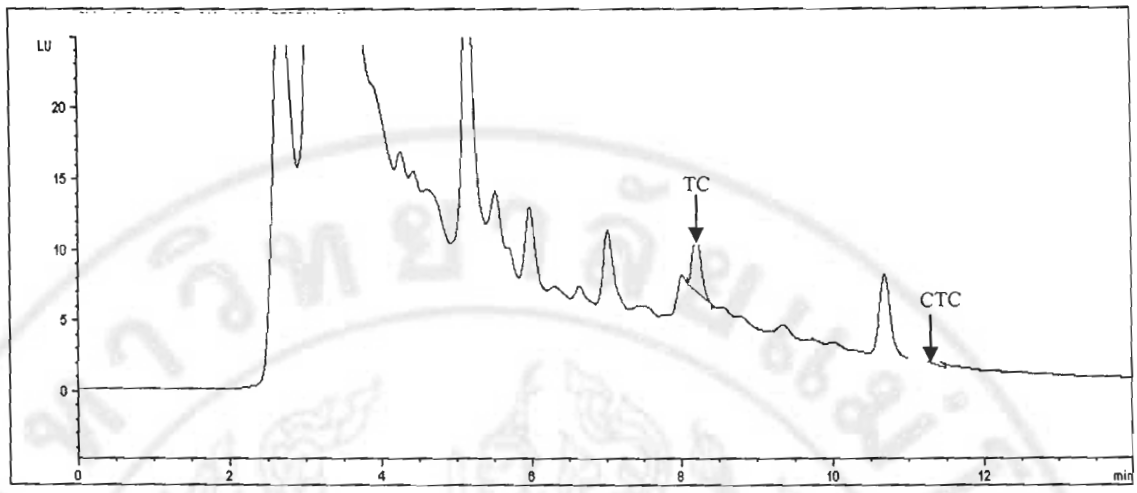
โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้ง



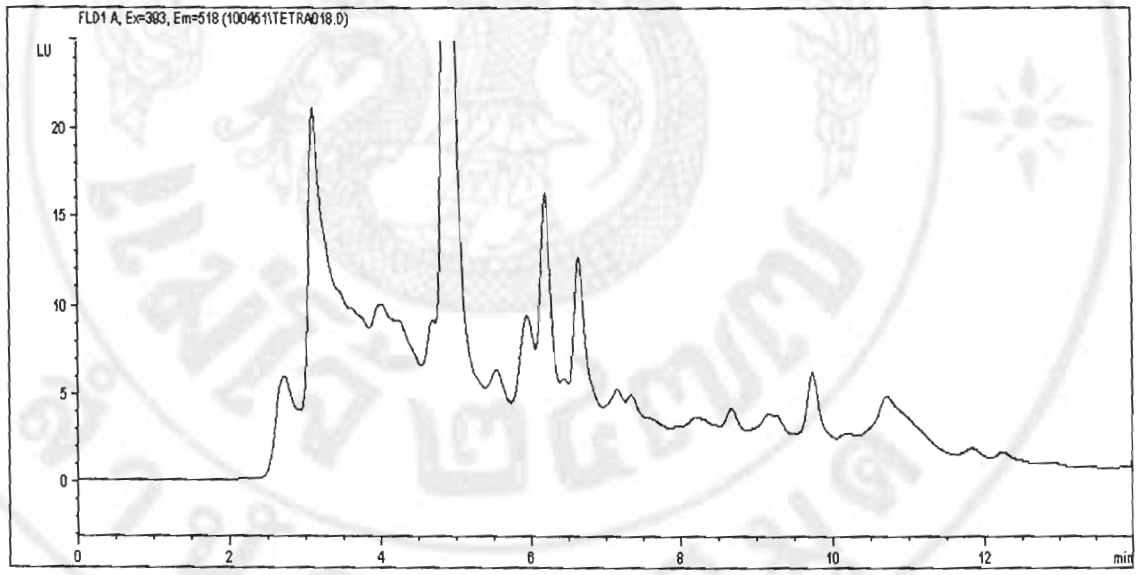
ภาพผนวก 1 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 1LOH



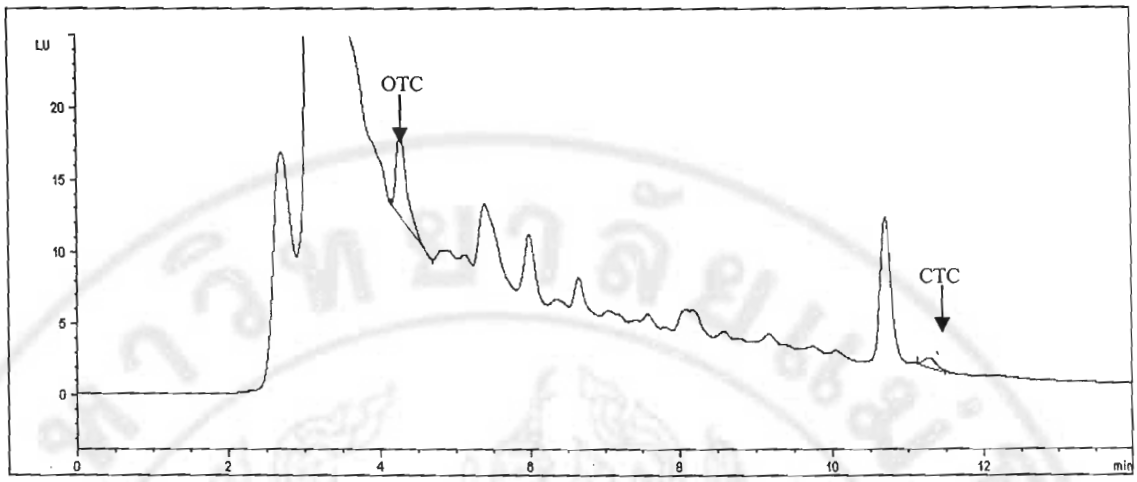
ภาพผนวก 2 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 1SOH



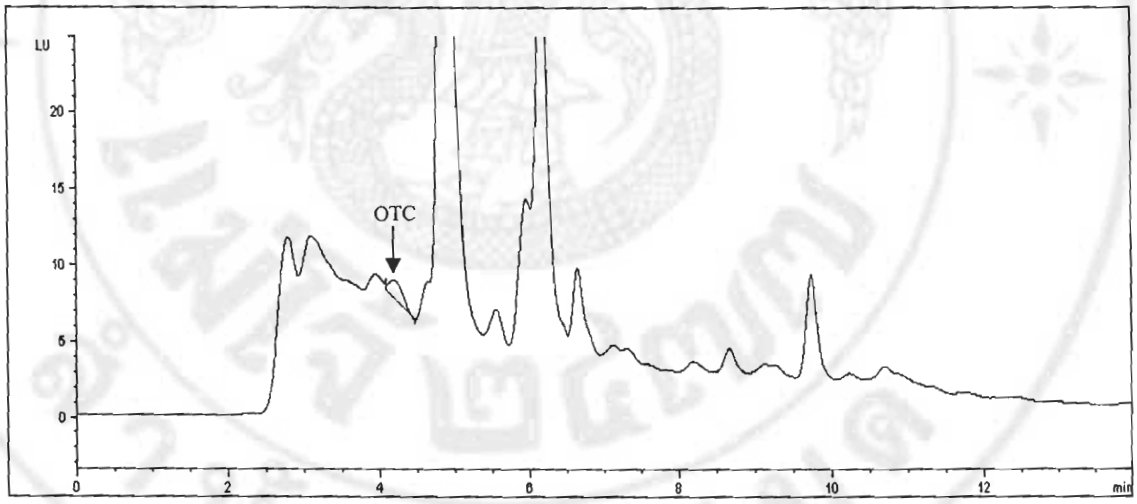
ภาพผนวก 3 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 1FRH



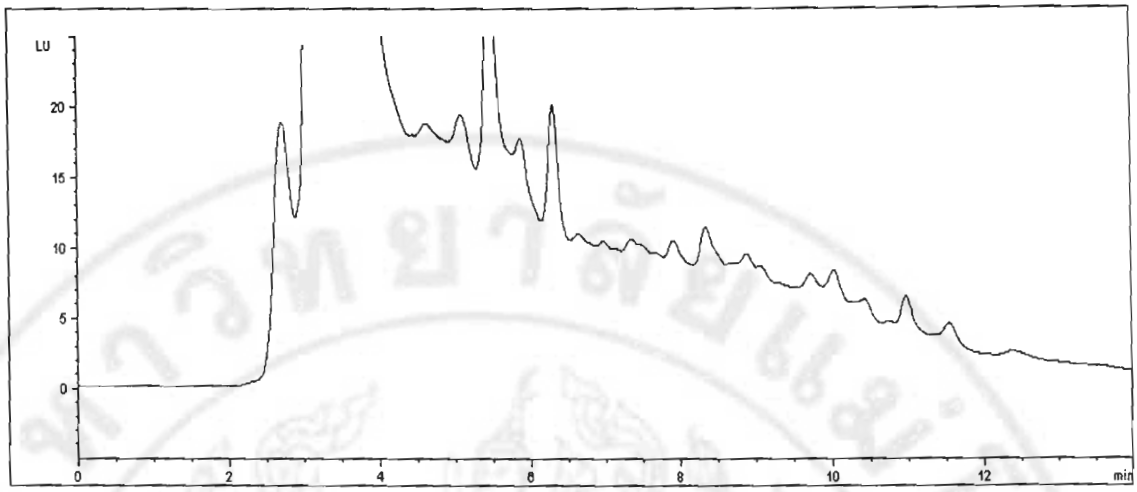
ภาพผนวก 4 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 2LOH



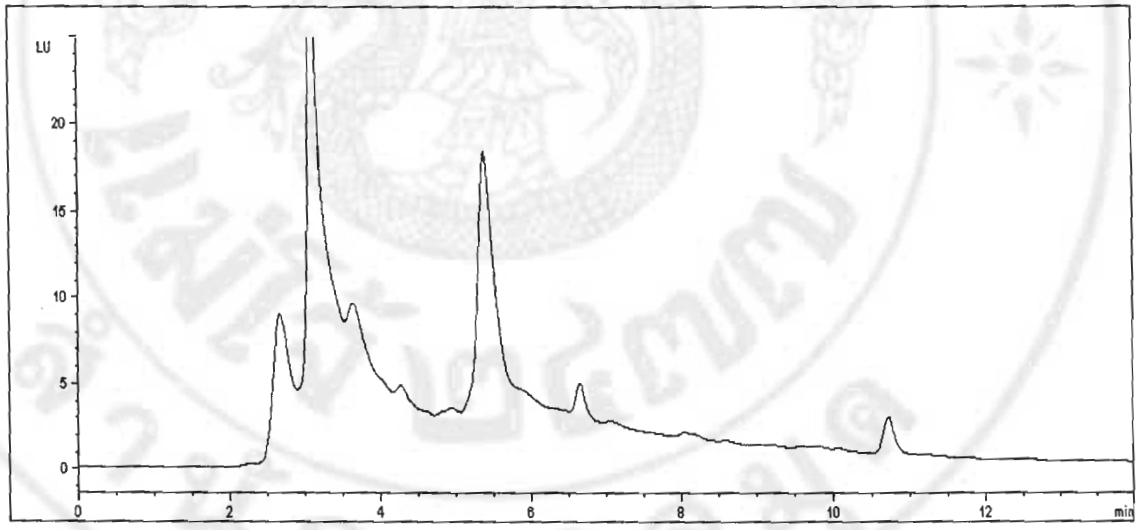
ภาพผนวก 5 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 2WFH



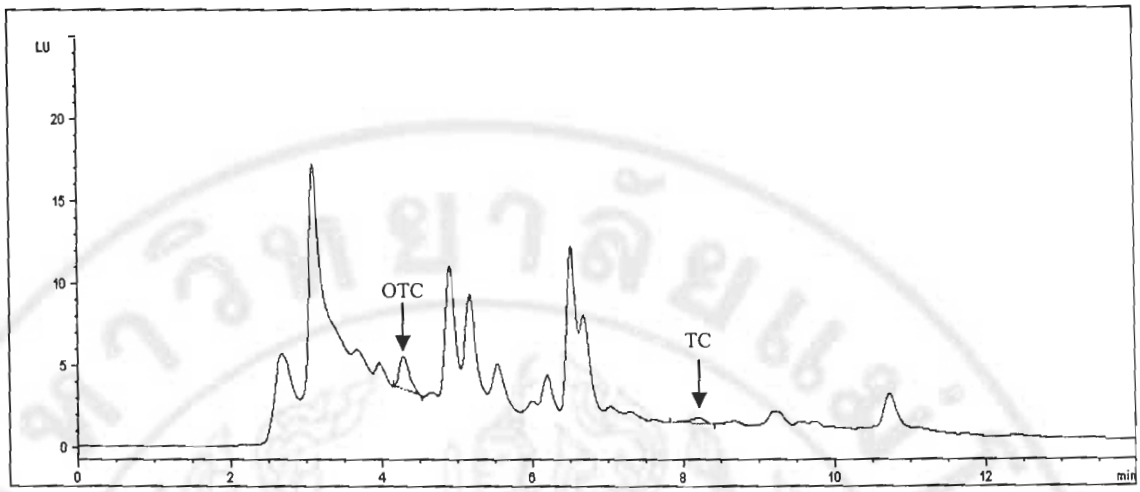
ภาพผนวก 6 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 3LOH



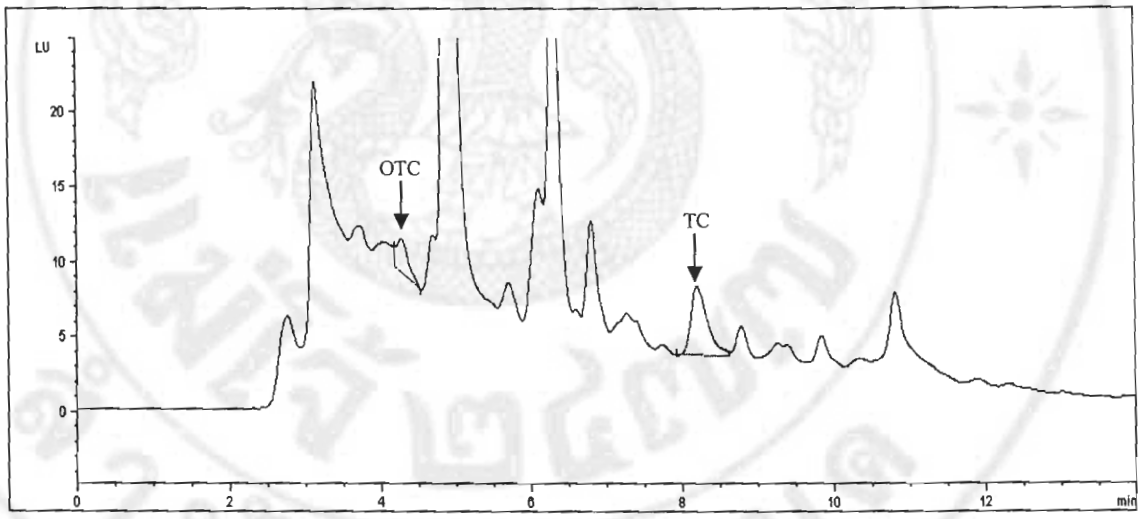
ภาพผนวก 7 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 3FRH



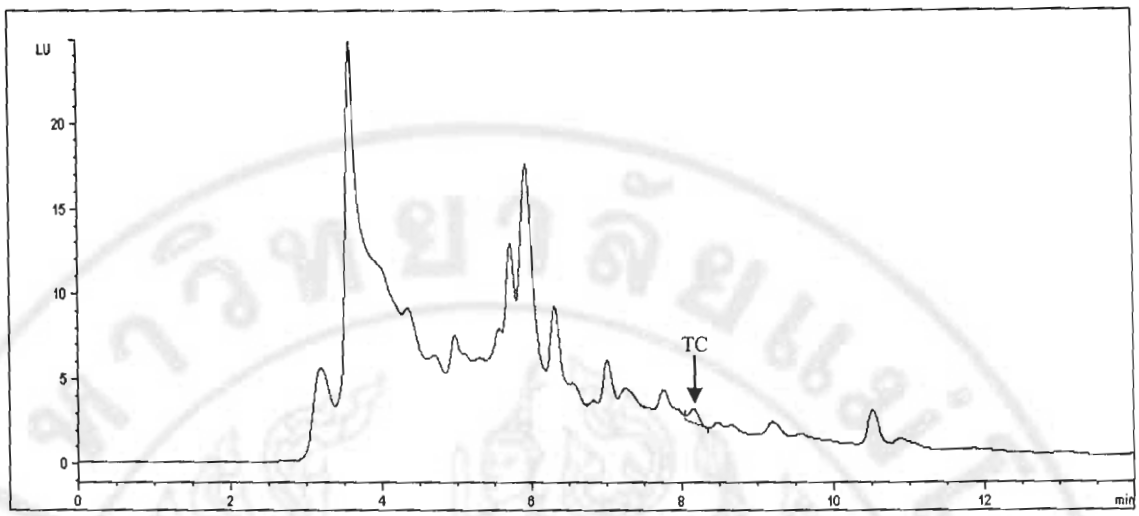
ภาพผนวก 8 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 3SUH



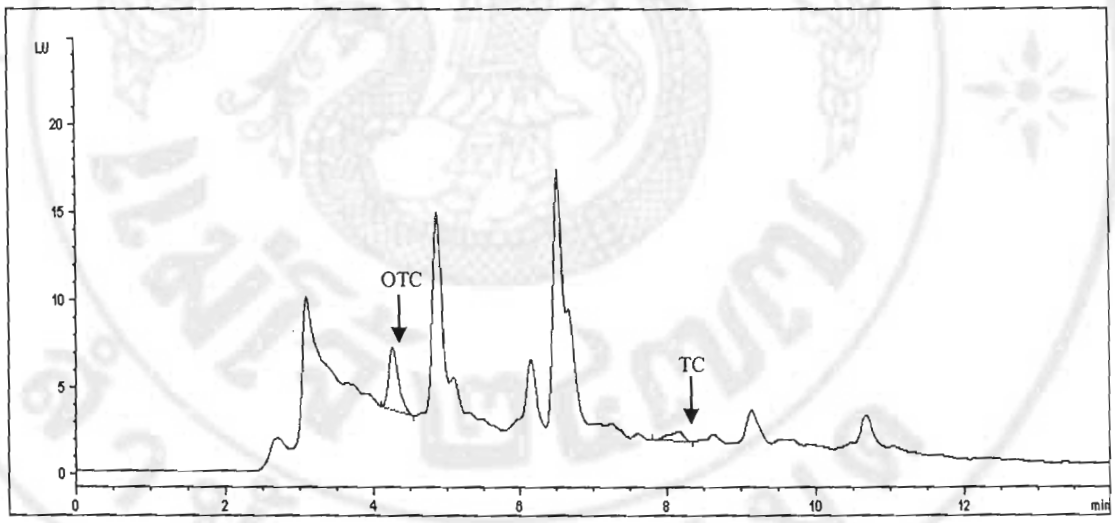
ภาพผนวก 9 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 3LYH



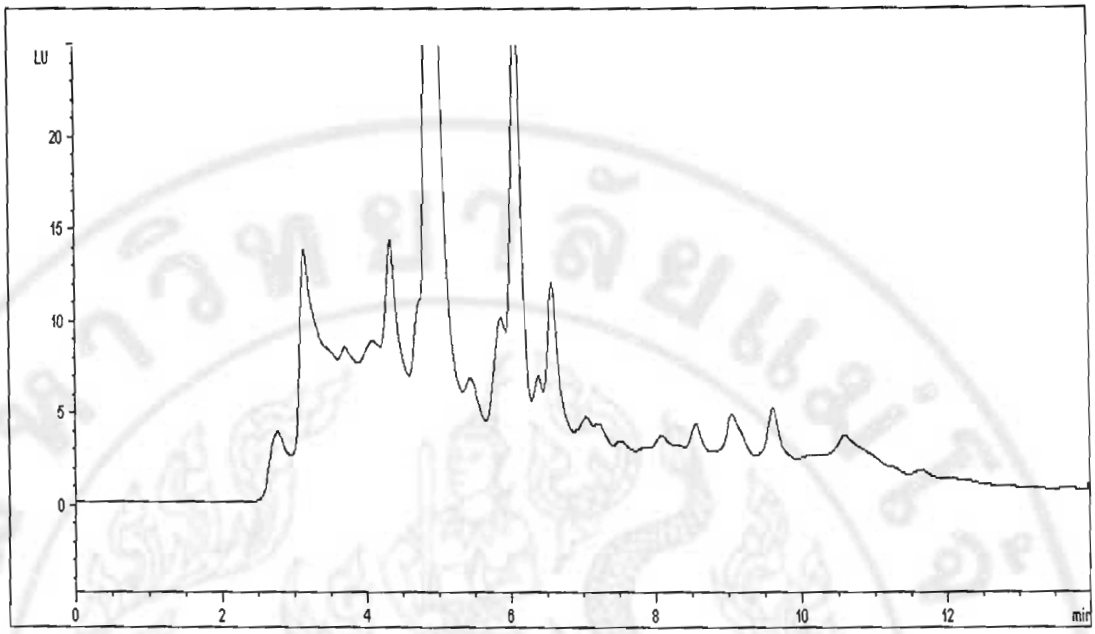
ภาพผนวก 10 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 4LOH



ภาพผนวก 11 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 4FRH



ภาพผนวก 12 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 4LYH



ภาพผนวก 13 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้งรหัส 5LOH

ภาคผนวก ค

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 211) พ.ศ. 2543 เรื่องน้ำผึ้ง

(สำเนา)

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

(ฉบับที่ 211) พ.ศ. 2543

เรื่อง น้ำผึ้ง

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง น้ำผึ้ง

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 6(3)(4)(5)(6)(7) และ (10) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 อันเป็นพระราชบัญญัติที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและ เสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา 29 ประกอบกับมาตรา 35 มาตรา 48 และมาตรา 50 ของรัฐธรรมนูญแห่ง ราชอาณาจักรไทยบัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 139 (พ.ศ.2534) เรื่อง น้ำผึ้ง ลงวันที่ 18 ธันวาคม พ.ศ.2534

ข้อ 2 ให้น้ำผึ้งเป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน

ข้อ 3 น้ำผึ้ง หมายความว่า ของเหลวรสหวานซึ่งผึ้งผลิตขึ้น

ข้อ 4 น้ำผึ้ง ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

(1) มีสี กลิ่นและรส ตามลักษณะเฉพาะของน้ำผึ้ง

(2) มีน้ำตาลรีดิวซิ่งคิดเป็นน้ำตาลอินเวอร์ตไม่น้อยกว่าร้อยละ 65 ของน้ำหนัก

(3) มีความชื้นไม่เกินร้อยละ 21 ของน้ำหนัก

(4) มีน้ำตาลซูโครสไม่เกินร้อยละ 5 ของน้ำหนัก

(5) มีสารที่ไม่ละลายน้ำไม่เกินร้อยละ 0.1 ของน้ำหนัก

(6) มีเถ้าไม่เกินร้อยละ 0.6 ของน้ำหนัก

(7) มีค่าความเป็นกรดไม่เกิน 40 มิลลิอิควิวาเลนท์ของกรดต่อ 1 กิโลกรัม

(8) มีค่าไดแอสเตสแอกติวิตี (Diastase activity) ไม่น้อยกว่า 3 โกเตสเกล (Gothe Scale)

(9) มีค่าไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟิวรัล (Hydroxymethylfurfural) ไม่เกิน 80 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม

(10) ไม่ใช้วัตถุเจือปนอาหาร

(11) ไม่ใช้สี

(12) ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

(13) ไม่มีสารพิษจากจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

(14) ตรวจพบยีสต์และราไม่เกิน 10 ต่อน้ำผึ้ง 1 กรัม

(15) ไม่มีสารปนเปื้อน เว้นแต่

(15.1) สารหนู ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัม ต่อน้ำผึ้ง 1 กิโลกรัม

(15.2) ตะกั่ว ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำผึ้ง 1 กิโลกรัม

ข้อ 5 ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าน้ำผึ้งเพื่อจำหน่าย ต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร

ข้อ 6 การใช้ภาชนะบรรจุน้ำผึ้ง ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ภาชนะบรรจุ

ข้อ 7 การแสดงฉลากของน้ำผึ้ง ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลาก

ข้อ 8 ประกาศฉบับนี้ ไม่ใช้บังคับกับน้ำผึ้งที่ผลิตเพื่อจำหน่ายโดยสถานที่ผลิตที่ไม่เข้าลักษณะเป็นโรงงานตามกฎหมายว่าด้วยโรงงาน

ข้อ 9 ให้ใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับอาหารหรือใบสำคัญการใช้ฉลากอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 139 (พ.ศ.2534) เรื่อง น้ำผึ้ง ลงวันที่ 18 ธันวาคม พ.ศ.2534 ซึ่งออกให้ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับยังคงใช้ต่อไปได้อีกสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 10 ให้ผู้ผลิต ผู้นำเข้าน้ำผึ้งที่ได้รับอนุญาตอยู่ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ ยื่นคำขอรับเลขสารบบอาหารภายในหนึ่งปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ เมื่อยื่นคำขอดังกล่าวแล้วให้ได้รับการผ่อนผันการปฏิบัติตามข้อ 5 ภายในสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ และให้คงใช้ฉลากเดิมที่เหลืออยู่ต่อไปจนกว่าจะหมดแต่ต้องไม่เกินสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 11 ประกาศนี้ ให้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดหนึ่งร้อยแปดสิบวันนับแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 19 กันยายน พ.ศ.2543

กร ทัพพะรังสี

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

(ราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 118 ตอนพิเศษ 6 ง. ลงวันที่ 24 มกราคม พ.ศ.2544)

ภาคผนวก ง
ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นายนรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์	
เกิดเมื่อ	14 ตุลาคม 2521	
ประวัติการศึกษา	พ. ศ. 2539	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนแม่สรวยวิทยาคม จังหวัดเชียงราย
	พ. ศ. 2543	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ประวัติการทำงาน	พ. ศ. 2544-พ. ศ. 2548	นักวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	พ. ศ. 2549-ปัจจุบัน	หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง ประเทศไทยจำกัด สาขาเชียงใหม่