การประยุกต์ใช้ ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟฟี่ สำหรับตรวจการตกค้างของ ไดเอทิลสติลเบสทรอลและเฮ็กโซเอสทรอล ในเนื้อไก่

นายชัยเทพ พูลเขตต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5514-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETECTING DIETHYLSTILBESTROL AND HEXOESTROL RESIDUES IN CHICKEN MEAT

Mr. Chaithep Poolkhet

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Veterinary Public Health
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-5514-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์ใช้ ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟฟี่ สำหรับตรวจการตกค้างของ ไดเอทิลสติลเบสทรอลและ เฮ็กโซเอสทรอล ในเนื้อไก่
โดย	นายชัยเทพ พูลเขตต์
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ เรืองวิเศษ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

(ศาสตราจารย์ น.สพ. พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์)

ชัยเทพ พูลเขตต์ : การประยุกต์ใช้ ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟฟี่ สำหรับตรวจการตกค้างของ ไดเอทิลสติลเบสทรอลและเฮ็กโซเอสทรอล ในเนื้อไก่. (THE APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETECTING DIETHYLSTILBESTROL AND HEXOESTROL RESIDUES IN CHICKEN MEAT) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย; 62 หน้า. ISBN 974-17-5514-7.

ไดเอทิลสติลเบสทรอล (Diethylstilbestrol; DES) และเฮ็กโซเอสทรอล (Hexoestrol) เคยถูกนำมาใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ปีก แต่ปัจจุบันถูกห้ามใช้เนื่องจากฤทธิ์ในการก่อมะเร็งทั้งในมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ดียังพบว่ามีการลักลอบนำมาใช้เป็นสารช่วยเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ปีกในบางพื้นที่ของหลายประเทศ จึงได้มีการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์เพื่อเฝ้าระวังการตกค้างในเนื้อเยื่อและสิ่งคัดหลั่งจากสัตว์หลายเทคนิค แต่ยังไม่มีเทคนิคในการวิเคราะห์ใดที่เป็นมาตรฐาน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟฟี่ (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ในการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของ DES และ Hexoestrol ในเนื้อไก่ โดยการทดลองที่ 1 เป็นการทดลองหาสภาวะของเครื่อง HPLC ด้วยสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol จากการทดลองพบว่าการใช้ HPLC column ชนิด C_{18} ODS2 Spherisorb® (ขนาด 5 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 mm ยาว 250 mm) เฟสเคลื่อนที่เป็น Methanol : Water (65 : 35) ความเร็วเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ Ultraviolet-Visible detector ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร จะให้ Retention time ของ DES และ Hexoestrol ที่ 8.123 – 8.287 และ 9.206 – 9.396 นาที ตามลำดับ การทดลองที่ 2 เป็นการเก็บสารสังเคราะห์ที่มีการลักลอบใช้ในการเลี้ยงไก่ในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 7 แหล่ง มาวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อระบุชนิดและปริมาณของตัวยา จากการทดลองพบว่าทุกแหล่งมี Hexoestrol เป็นสารออกฤทธิ์ทั้งหมด และมี 6 จาก 7 แหล่งที่ปริมาณน้อยกว่าที่ระบุไว้ข้างขวด การทดลองที่ 3 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของการสกัดและวิธีวิเคราะห์การตกค้างของ Hexoestrol ในกล้ามเนื้อด้วย HPLC ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (พีพีเอ็ม) ลงในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่จากกลุ่มควบคุม พบว่ามีอัตราการคืนกลับของสารเป็น 81.02 - 87.75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการชำแหละไก่อายุ 38 วัน ที่ทำการฝังด้วยา Hexoestrol จากแหล่งที่ระบุความเข้มข้นเป็น 20 มิลลิกรัมต่อเม็ด พร้อมกลุ่มควบคุม ครั้งละ 12 ตัว (แบ่งเป็นไก่ตัวผู้ 6 ตัว และไก่ตัวเมีย 6 ตัว) เพื่อเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อหลังจากฝังยาวันที่ 14, 21, 28 และ 35 แล้วนำตัวอย่างกล้ามเนื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้าง และจากตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ทั้งหมด 144 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้างในกล้ามเนื้อรวมทั้งสิ้น 3 ตัวอย่าง โดยมีระดับการตกค้างที่ตรวจพบเป็น 0.20 – 0.23 ไมโครกรัมต่อเนื้อไก่ประมาณ 5 กรัม โดยมี Limit of Detection ที่ 0.139 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Limit of Quatitation ที่ 0.422 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์การตกค้างที่ระดับความเข้มข้นสูง เช่น การวิเคราะห์จากตัวยาโดยตรง แต่การวิเคราะห์เพื่อหาระดับการตกค้างในเนื้อไก่จำเป็นต้องพัฒนาต่อไป

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2546

##4475579031 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD : DIETHYLSTILBESTROL / HEXOESTROL / CHICKEN MEAT / RESIDUES / HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

CHAITHEP POOLKHET : THE APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETECTING DIETHYLSTILBESTROL AND HEXOESTROL RESIDUES IN CHICKEN MEAT. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. BENJAMAS PUTTAMALAI, D.V.M., Ph.D. 62 PP. ISBN 974-17-5514-7.

Diethylstilbestrol (DES) and hexoestrol had been extensively used as potent growth promoters in livestocks, but the uses were banned due to their carcinogenic effects in human and animals. However, these compounds are still available illegally in the markets of certain countries and mostly used for promoting growth of poultry. There are several analytical methods developed for detecting the residues of these compounds in animal tissue and fluids. However, there is no standard method available yet Therefore, the purpose of this present study was to apply the isolation and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) techniques for determining the residues of DES and hexoestrol in chicken meat. In the first experiment, the HPLC condition suitable for detecting DES and hexoestrol was determined. It was found that the condition of which C_{18} ODS2 Spherisorb® HPLC column (5 μ; 4.6 mm in diameter 250 mm in length), methanol : water (65 : 35) as mobile phase at flow rate of 1.5 ml/min, and Ultraviolet-Visible detector at 230 nm was able to detect the peaks of DES and hexoestrol at the retention time of 8.123 – 8.287 min and 9.206 – 9.396 min, respectively. In the second experiment, the HPLC technique was used to identify the active compound in the hormone pellets collected from 7 black markets in the central part of Thailand. All of samples were found to contain only hexoestrol as an active ingredient, and 6 of 7 samples contained lower contents of hexoestrol than their label claimed. In the third experiment, the HPLC technique was applied together with an isolation technique for detecting the content of hexoestrol residue in chicken meat. The recovery rate of hexoestrol was found to be 81.02 – 87.75 % when 4 μg/ml (ppm) of standard hexoestrol was added to the meat of a control group. The treatment chicken were subcutaneously implanted with hexoestrol pellets (20 mg/pellet) at 38 days old chicks. Twelve chickens (6 males and 6 females) were sacrificed on day 14, 21, 28 and 35 after the implantation. From the total number of 144 samples, only 3 samples were found to contain hexoestrol residue level ranged from 0.20 to 0.23 μg per 5 g. The limit of detection was 0.139 μg/ml and the limit of quantitation was 0.422 μg/ml. In conclusion, the above HPLC condition can be used for determining the DES and hexoestrol at high concentration, such as in a pellet, but its efficiency for determinig the hexoestrol in tissue needs further investigation.

Department of Veterinary Public Health Student's signature Chaithep Poolkhet

Field of study Veterinary Public Health Advisor's signature Benjamas Puttamalai

Academic year 2003

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิตเรื่อง การประยุกต์ใช้ ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟฟี สำหรับตรวจการตกค้างของ ไดเอทิลสติลเบสทรอลและเฮ็กโซเอสทรอล ในเนื้อไก่สำเร็จลงได้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น แก้ไข และตรวจทานวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ น.สพ. พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป และ น.สพ. ประเทือง สุดสาคร ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และข้อมูลซึ่งเป็นที่มาของการตั้งสมมติฐานของงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ดวงนฤมล ประชัญคดี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพัฒนะ จุ้ยเจริญ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทดลอง ช่วยดูแลไก่ทดลอง ตลอดจนช่วยเหลือผู้วิจัยในขั้นตอนของการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณ คุณเบ็ญจรัตน์ วงศาวิภาส บริษัทเจนเทคอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด สำหรับคำแนะนำในการใช้เครื่อง ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟฟี่ในเบื้องต้น ขอขอบคุณ คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล สำหรับคำแนะนำในการเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ รวมทั้งช่วยเหลือในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างบางส่วน

ขอขอบคุณกองทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนอุดหนุนวิจัยจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย ขอขอบคุณโครงการพัฒนาอาจารย์ สาขาขาดแคลน (สัตวแพทยศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย พี่สาว ที่ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขออุทิศส่วนดีของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แก่ สัตว์ทดลอง ที่เปรียบเสมือนอาจารย์ของผู้วิจัยอีกท่านหนึ่ง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติของ Diethylstilbestrol และ Hexoestrol และการใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์..... 5

2.2 ความเป็นพิษของ DES และ Hexoestrol และการห้ามใช้ในปศุสัตว์..... 7

2.3 การตกค้างของ DES และ Hexoestrol..... 11

2.4 สถานภาพการใช้และการควบคุม DES และ Hexoestrol ในประเทศไทย..... 12

2.5 วิธีวิเคราะห์การตกค้างของ DES และ Hexoestrol..... 13

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย..... 20

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 22

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 28

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การประยุกต์และทดสอบวิธีวิเคราะห์ DES และ Hexoestrol ในห้องปฏิบัติการด้วย HPLC..... 30

4.2 การทดลองที่ 2 การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่ใช้ผังคอไก่ที่มีการใช้ในพื้นที่ เพื่อระบุชนิดของตัวยาและปริมาณที่แท้จริงด้วย HPLC..... 36

สารบัญ (ต่อ)

4.3 การทดลองที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol
ในเนื้อไก่ทดลองด้วย HPLC..... 42

บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง..... 50

5.2 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ..... 54

รายการอ้างอิง..... 56

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 62

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. ขนาดของ DES และ Hexoestrol ที่ใช้ในปศุสัตว์ (Velle, 1982)..... 7
2. ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol ของสัตว์ชนิดต่างๆ (Lone, 1997)..... 11
3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์การตกค้างของ DES และ Hexoestrol ที่สำคัญในเนื้อเยื่อจากสัตว์..... 19
4. แหล่งที่มา ชนิดของตัวยาและปริมาณที่ระบุข้างขวด..... 24
5. แสดง Peak area, SD และ CV ของสารสะลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol จากการทำการทดลองภายในวันเดียวกัน..... 34
6. ผลการวิเคราะห์ Intraday และ Interday precision ของสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol..... 35
7. แสดง Retention time ของ Hexoestrol จากฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ทั้ง 7 แหล่ง เทียบกับสารละลายมาตรฐาน..... 40
8. ผลของการวิเคราะห์ปริมาณของฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ทั้ง 7 แหล่ง..... 41
9. ผลการคำนวณ Intraday และ Interday precision ของฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง C และ D..... 42
10. ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลองหลังฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 14 วัน..... 44
11. ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลองหลังฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 21 วัน..... 45
12. ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลองหลังฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 28 วัน..... 46
13. ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลองหลังฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 35 วัน..... 47
14. ผลการคำนวณ Intraday และ Interday precision จากการวิเคราะห์ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ กลุ่มทดลองที่ให้ผลบวก..... 49

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่

1. โครงสร้างเคมีของ DES (a) และ Hexoestrol (b) (Botsoglou and Fletouris, 2001)..... 5
2. โครงสร้างทางเคมีของ 3'-OH-DES (a) เปรียบเทียบกับ Cathecol (b)..... 9
3. แสดงเมตาบอไลท์ที่สำคัญที่ก่อให้เกิดขบวนการ DNA adducts เปรียบเทียบ ระหว่าง Estradiol และ Hexoestrol (ดัดแปลงจาก Cavalieri and Rogan, 2002)..... 9
4. ขบวนการเกิด DNA adducts ของเอสโตรเจน (Cavalieri *et al.*, 1997)..... 10
5. Chromatogram ของสารสะลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.03125 ถึง 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... 33
6. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Chromatogram area กับความเข้มข้นของสารสะลาย มาตรฐาน DES และ Hexoestrol..... 35
7. Chromatogram ของฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ทั้ง 7 แหล่ง ที่ระบุชนิดเป็น Hexoestrol เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... 39
8. Chromatogram ของกล้ามเนื้อที่เติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol เปรียบเทียบกับ Chromatogram ของกล้ามเนื้อที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol..... 43
9. แสดง Chromatogram ของกล้ามเนื้อในกลุ่มทดลองที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol 48