บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1.1 ไก่เนื้อ (broiler) จำนวน 48 ตัว อายุ 38 วัน น้ำหนักประมาณ 1.2 – 2.5 กิโลกรัมต่อตัว (ตัวผู้ 24 ตัว ตัวเมีย 24 ตัว)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.2.1 สารมาตรฐาน Diethylstilbestrol (DES) (Sigma Chemical, USA)

3.1.2.2 สารมาตรฐาน Hexoestrol (Sigma Chemical, USA)

3.1.2.3 Methanol (HPLC grade) (Lab Scan, Ireland)

3.1.2.4 Methanol (Analytical reagent grade) (Lab Scan, Ireland)

3.1.2.5 Methyl-t-Butyl ether (Analytical reagent grade) (Lab Scan, Ireland)

3.1.2.6 Petroleum ether (Analytical reagent grade) (Lab Scan, Ireland)

3.1.2.7 *di*-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (Merck, Germany)

3.1.2.8 Sodium *di*-hydrogen phosphate monohydrate (Merck, Germany) (Amresco, USA)

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.3.1 กรวยแก้ว

3.1.3.2 กระบอกฉีดยา ชนิดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร

3.1.3.3 กระบอกตวงขนาด 25, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.3.4 ไนโตรเจน พร้อมชุดระเหยแห้ง

3.1.3.5 บีกเกอร์ขนาด 10, 50, 100, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.3.6 หลอดทดลองขนาด 2 และ 10 มิลลิลิตร พร้อม Racks

3.1.3.7 Centrifuge tube ชนิดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร

3.1.3.8 Centrifuge tube ชนิดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.3.9 Evaporator flask ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.3.10 HPLC column C_{18} ODS2 Spherisorb® ขนาด 4.6 มิลลิเมตร * 250 มิลลิเมตร pore size 5 ไมโครเมตร (Water, USA)

3.1.3.11 HPLC vial (small pack) ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.3.12 Micropipette พร้อม tips ขนาด 20, 100, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร

3.1.3.13 Pasteur pipettes

3.1.3.14 RC-syringe membrane filter เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดกรอง 0.45 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)

3.1.3.15 RC-Vliesverstarkt Mobile phase membrane filter เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดกรอง 0.45 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)

3.1.3.16 Solid phase extraction SepPak C_{18} classic (Water, USA)

3.1.3.17 Volumetric flask ขนาด 5, 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร

3.1.4 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.4.1 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler, Germany)

3.1.4.2 เครื่องทำน้ำปราศจากไอออน (Millipore, USA)

3.1.4.3 เครื่อง Centrifuge IECCR-6000 (International Equipment Company)

3.1.4.4 เครื่อง Centrifuge LABOFUGE I (Haraeus, Germany)

3.1.4.5 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography CLASS LC-10 พร้อม Ultraviolet-Visible detector รุ่น SPD-10A, ระบบประมวลผล CBM-10A, Sil-10A autoinjector, LC-10AC dual pump และ Degasser DGU-12A (Shimadzu, Japan)

3.1.4.6 Homogenizer POLYTRON 3000 (Kinematica AG, Switzerland)

3.1.4.7 pH meter (Hanna instruments, Singapore)

3.1.4.8 Rotary vacuum evaporator พร้อม apparatus รุ่น NAJ-100 (Eyela, Japan)

3.1.4.9 Shaker Laboshake LS 2/5 RO 2/5(Gerhardt bonn, Germany)

3.1.4.10 Sonicator TRANSSONIC 460/H (Elma, Germany)

3.1.4.11 Vacuum pump (Gelman Sciences, USA) พร้อมชุดกรอง

3.1.4.12 Vortex mixer Genie 2 (Scientific Industries, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยจะประกอบไปด้วย 3 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 การประยุกต์และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ DES และ Hexoestrol ในห้องปฏิบัติการด้วย HPLC

การทดลองที่ 2 การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่ใช้ผังคอไก่ที่มีใช้ในพื้นที่เพื่อระบุชนิดของตัวยาและปริมาณที่แท้จริงด้วย HPLC

การทดลองที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณของการตกค้างของ DES หรือ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลองด้วย HPLC

3.2.1 การทดลองที่ 1 การประยุกต์และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ DES และ Hexoestrol ในห้องปฏิบัติการด้วย HPLC

3.2.1.1 วิธีดำเนินการทดลอง

1) เตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol โดยชั่งผงของสารละลายมาตรฐานชนิดละ 20 มิลลิกรัม แยกใส่ลงในปีกเกอร์แต่ละอัน

2) เติมเมทานอลลงในแต่ละปีกเกอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้ละลาย

3) ย้ายสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดลงใน Volumetric flask แล้วเติมเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น Stock solution

4) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask ขวดเดียวกัน

5) เติมเมทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น Working Solution

6) จาก Working solution ดูดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask เติมเมทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7) เตรียม Volumetric flask อีกจำนวน 8 flask ดูดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาจำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ใบใหม่ แล้วเติมเมทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8) ปิเปตสารละลายมาตรฐานขนาดความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ใบใหม่ แล้วเติมเมทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นทั้งหมด 9 ความเข้มข้นคือ 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9) นำสารละลายมาตรฐานที่ได้ มาผ่านขบวนการกรองด้วย Membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ลงใน HPLC vial แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-UV ทำการวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นตัวอย่างละ 5 ครั้ง โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ Isocratic gradient เป็น Methanol : Water ในสัดส่วน 65 : 35 ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate) 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร Injected volume 20 ไมโครลิตร

10) ทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันรุ่งขึ้นด้วยเครื่อง HPLC ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง เพื่อคำนวณหาความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์ในแต่ละวันและระหว่างวัน (Intraday และ Interday precision)

3.2.2 <u>การทดลองที่ 2</u> การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ที่มีใช้ในพื้นที่ เพื่อระบุชนิดของตัวยา และปริมาณที่แท้จริงด้วย HPLC

ทำการเก็บตัวอย่างของฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ที่มีการใช้ในการเลี้ยงไก่ในพื้นที่จำนวน 7 แหล่ง (ตารางที่ 4) แหล่งละ 100 เม็ด จากนั้นนำกลับเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์

ตารางที่ 4 แหล่งที่มา ชนิดของตัวยา และปริมาณที่ระบุข้างขวด

แหล่ง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดตัวยาที่ระบุข้างขวด	ปริมาณที่ระบุข้างขวด (มิลลิกรัมต่อเม็ด)
A	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม	Hexoestrol	25
B	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม	Hexoestrol	25
C	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม	Hexoestrol	20
D	อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม	Hexoestrol	25
E	อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม	Hexoestrol	20
F	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม	Hexoestrol	15
G	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม	Hexoestrol	15

3.2.2.1 วิธีดำเนินการทดลอง

1) นำตัวอย่างฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่งละ 3 เม็ด ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicate) แยกใส่ลงใน Volumetric flask เติมเมทานอลลงในแต่ละ flask จนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วย Shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2) ดูดสารละลายในแต่ละตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask เติมเมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร

3) นำสารละลายที่ได้แต่ละตัวอย่าง ผ่าน Membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ใน HPLC vial

4) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะของเครื่องเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1 ตัวอย่างละ 2 ครั้ง เทียบกับ Standard curve ความเข้มข้น 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน

5) วิเคราะห์อัตราการคืนกลับ (recovery rate) ของสารใช้วิธีการเติมสารละลายมาตรฐาน (standard addition method) เป็นตัววิเคราะห์ โดยใช้ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่จากแหล่งที่เลือกมา 1 แหล่ง (ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง C) จำนวน 6 เม็ด ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วย Shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการแบ่งตัวอย่างของฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 10 มิลลิลิตร ส่วนแรกนำไปสกัดเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2 – 3 ในการทดลองนี้ ส่วนที่สองเติมสาร

ละลายมาตรฐาน Hexoestrol จำนวน 20 มิลลิกรัม แล้วนำไปสกัดเช่นเดียวกับส่วนแรก จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างทั้ง 2 ส่วน มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะของเครื่องเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 วิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง เทียบกับ Standard curve

6) ทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันรุ่งขึ้น โดยเลือกใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงสุดและต่ำสุด (ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง C และ D ตามลำดับ) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC วิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง เพื่อคำนวณหาความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์ในแต่ละวันและระหว่างวัน (Intraday และ Interday precision) เทียบกับ Standard curve

3.2.3 <u>การทดลองที่ 3</u> วิเคราะห์ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลองด้วย HPLC

3.2.3.1 ไก่ทดลอง

ใช้ไก่เนื้อจำนวน 48 ตัว อายุ 38 วัน น้ำหนักประมาณ 1.2-2.5 กิโลกรัม แยกเป็นเพศผู้และเพศเมียอย่างละเท่าๆ กัน จากนั้นแบ่งไก่ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฝังฮอร์โมนกับกลุ่มทดลองที่ฝังฮอร์โมน (เลือกใช้ฮอร์โมนจากแหล่ง C) จะได้ไก่ทั้งหมด 4 กลุ่มคือ 1) ไก่เพศผู้ ไม่ฝังฮอร์โมน จำนวน 12 ตัว 2) ไก่เพศเมีย ไม่ฝังฮอร์โมน จำนวน 12 ตัว 3) ไก่เพศผู้ ฝังฮอร์โมน จำนวน 12 ตัว 4) ไก่เพศเมีย ฝังฮอร์โมน จำนวน 12 ตัว สำหรับไก่กลุ่มทดลองจะใช้ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ Hexoestrol ในขนาดที่มีการใช้ในพื้นที่ (15-30 มิลลิกรัมต่อตัว หรือ 1 เม็ดต่อตัว โดยปริมาณของฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่เป็นปริมาณที่ระบุตามฉลากข้างขวด) ทำการฝังที่ด้านหลังคอไก่ชั้นใต้ผิวหนัง โดยการเลี้ยงและสภาพแวดล้อมถูกจำกัดให้อยู่ในสภาพเดียวกันตลอดการทดลอง

3.2.3.2 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากไก่ทั้ง 4 กลุ่มย่อย ในวันที่ 14, 21, 28 และ 35 หลังการฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ ครั้งละ 3 ตัว การเก็บตัวอย่างจะใช้วิธีทำให้สัตว์ตายอย่างสงบโดยผู้ชำนาญการเพื่อเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสำหรับการวิเคราะห์สารตกค้าง การเก็บจะเก็บตำแหน่งกล้ามเนื้อส่วนอก ปีกบน น่อง และคอแยกกัน บันทึกข้อมูลและนำส่งตัวอย่างกลับเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำกล้ามเนื้อส่วนอก ปีกบน และน่องมาบดรวมกันแล้วแบ่งกล้ามเนื้อไว้ 100 กรัม โดยถือว่ากล้ามเนื้อส่วนนี้เป็นกล้ามเนื้อรวม และทำการวิเคราะห์กล้ามเนื้อส่วนนี้ 2 ซ้ำ ส่วนกล้ามเนื้อคอนำมาบดแล้วแยกเก็บไว้ ซึ่งกล้ามเนื้อคอจะทำการวิเคราะห์ 1 ซ้ำ เนื่องจากปริมาณกล้ามเนื้อที่ได้จากการ

เก็บมีไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ บรรจุกล้ามเนื้อทั้ง 2 ส่วนในภาชนะที่เตรียมไว้ เก็บตัวอย่างในช่องแช่แข็งอุณหภูมิไม่เกิน –4 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจวิเคราะห์ต่อไป

3.2.3.3 วิธีดำเนินงานทดลอง (ดัดแปลงจาก Sawaya et al., 1998)

3.2.3.3.1 <u>การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์ Hexoestrol ในเนื้อไก่</u>

1) นำ centrifuge tube ชนิดพลาสติก มาจำนวน 2 หลอด ใส่ตัวอย่างกล้ามเนื้อรวมจากไก่กลุ่มควบคุมตัวที่ 1 หลอดละ 5 กรัม หลอดที่ 1 ทำการเติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ Centrifuge tube ทั้ง 2 หลอด มาเติม 67 mM phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer

2) เติม Methyl-t-Butyl ether ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ทั้ง 2 หลอด จากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 2 นาที และเขย่าต่อด้วยเครื่อง Shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3) นำไปเข้าเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

4) ดูดสารละลายชั้น Ether phase ใส่ใน Evaporator flask

5) ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 – 4 นำสารละลายชั้น Ether phase ที่ได้ มารวมกัน

6) นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator

7) นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติม Petroleum ether ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

8) นำไปเข้าเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

9) ดูดสารละลายที่ได้ในชั้น Ether phase ทิ้ง ได้สารละลายชั้นเมทานอล และนำสารละลายชั้นเมทานอลที่ได้ ไประเหยให้แห้งด้วยไนโตรเจน

10) ตะกอนที่ได้นำมาเติมเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ ผ่าน SepPak C_{18} classic ลงใน HPLC vial

11) สารละลายที่ได้ทั้ง 2 vial นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง เทียบกับ Standard curve ความเข้มข้น 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน

12) ทำการสกัดและวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งในวันรุ่งขึ้นตามขั้นตอนที่ 1 - 11 และนำผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ มาคำนวณหาอัตราการคืนกลับของสาร เพื่อบ่งบอกประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

3.2.3.3.2 <u>การตรวจวิเคราะห์ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol ในกล้ามเนื้อไก่ทดลอง</u>

1) นำตัวอย่างกล้ามเนื้อปริมาณ 5 กรัม ใส่ใน Centrifuge tube ชนิดพลาสติก เติม 67 mM phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer

2) เติม Methyl-t-Butyl ether ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 2 นาที และเขย่าต่อด้วยเครื่อง Shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3) ทำตามขั้นตอนที่ 3 – 10 ในหัวข้อที่ 3.2.3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์ Hexoestrol ในเนื้อไก่

4) สารละลายที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง เทียบกับ Standard curve ความเข้มข้น 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน

5) วิเคราะห์อัตราการคืนกลับของสารโดยนำตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่จากกลุ่มควบคุม จำนวน 5 กรัม ทำ 2 ซ้ำ ใส่ใน Centrifuge tube ชนิดพลาสติก เติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดและวิเคราะห์เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 – 4 ในการทดลองนี้ ผลที่ได้เทียบกับ Standard curve

6) ทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันรุ่งขึ้นด้วยเครื่อง HPLC วิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง เพื่อคำนวณหาความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์ในแต่ละวันและระหว่างวัน (Intraday และ Interday precision) เทียบกับ Standard curve

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.3.1 การวัดความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

3.3.1.1 Standard curve ของ DES และ Hexoestrol

ใช้วิธี Linear least squares equations ในโปรแกรมสำเร็จรูป CLASS-LC® software (Shimadzu, Japan) ของเครื่อง HPLC สำหรับการทดลองที่ 1, 2 และ 3

3.3.1.2 Limit of detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

สำหรับการทดลองที่ 1, 2 และ 3 คำนวณหาค่า LOD จากสมการ Standard curve ด้วยสูตร

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

เมื่อ σ หมายถึง Y-intercepts ในสมการ Standard curve

S หมายถึง slope ของสมการ Standard curve

คำนวณหาค่า LOQ จากสมการ Standard curve ด้วยสูตร

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

เมื่อ σ หมายถึง Y-intercepts ในสมการ Standard curve

S หมายถึง slope ของสมการ Standard curve

โดยที่ การคำนวณหาค่า LOQ ต้องมีค่า Coefficient of variation (CV) ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ จึงจะยอมรับได้ (Ambruster *et al.*, 1994)

3.3.1.3 Intraday, interday precision และ เปอร์เซ็นต์ CV

สำหรับการทดลองที่ 1, 2 และ 3 คำนวณหา เปอร์เซ็นต์ CV, Intraday และ Interday precision จาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ CV} = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{mean}} * 100$$

โดย Standard deviation (SD) ของแต่ละตัวอย่างได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Excel® (Microsoft, USA)

Intraday precision = เปอร์เซ็นต์ CV ของตัวอย่างในแต่ละวัน

Interday precision = เปอร์เซ็นต์ CV ของตัวอย่างระหว่างวัน

3.3.1.4 อัตราการคืนกลับของสาร (recovery rate)

สำหรับการทดลองที่ 2 และ 3 คำนวณจาก

$$\text{อัตราการคืนกลับของสาร} = \frac{(H_a - H_b)}{H_c} * 100$$

เมื่อ H_a หมายถึง ปริมาณของ Hexoestrol ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์

H_b หมายถึง ปริมาณของ Hexoestrol ในตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์

H_c หมายถึง ปริมาณสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol ที่เติมในตัวอย่าง

3.3.2 การคำนวณหาปริมาณการตกค้างในกล้ามเนื้อไก่ทดลอง

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป CLASS-LC® software (Shimadzu, Japan) และ Excel® (Microsoft, USA) ในการคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ของระดับการตกค้างของฮอร์โมนในเนื้อไก่ทดลอง และรายงานเป็นความเข้มข้นต่อน้ำหนักกล้ามเนื้อ