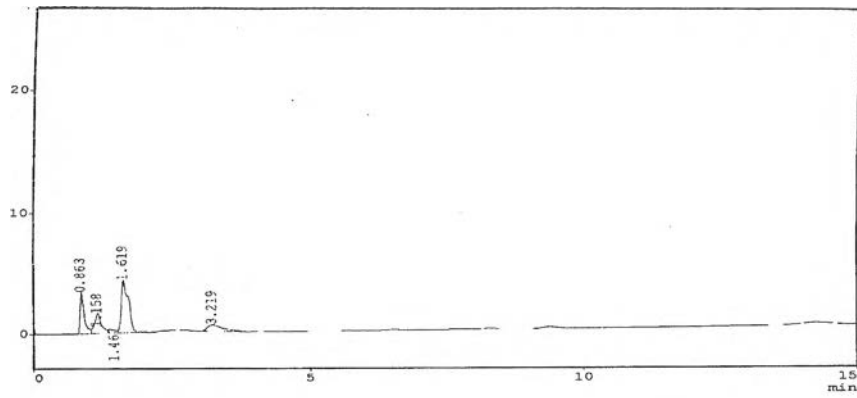


## บทที่ 4

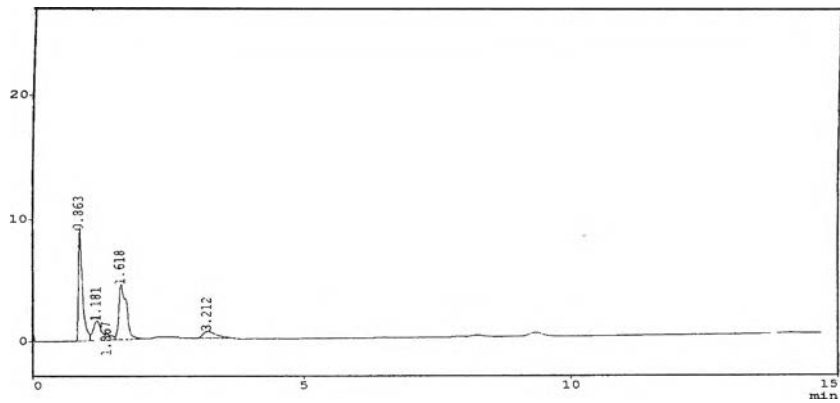
### ผลการทดลอง

#### 4.1 การทดลองที่ 1 การประยุกต์และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ DES และ Hexoestrol ในห้องปฏิบัติการด้วย HPLC

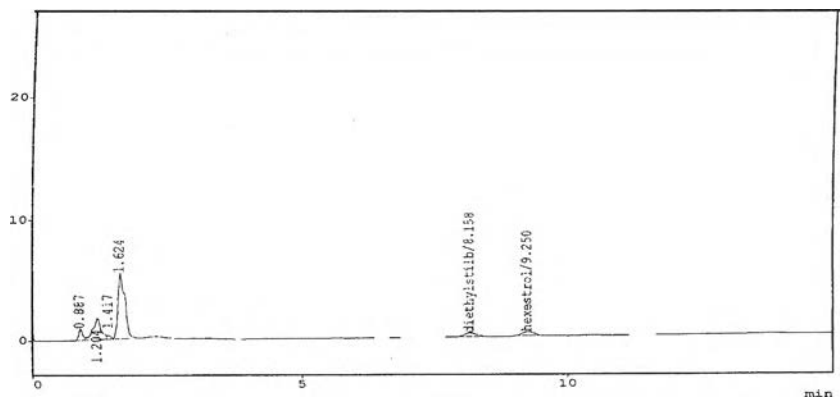
จากการทดลองนำสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol จำนวน 9 ความเข้มข้นคือ 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ Isocratic gradient เป็น Methanol : Water ในสัดส่วน 65 : 35 ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร Injected volume 20 ไมโครลิตร พบว่าระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาสารละลายมาตรฐานเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ (Retention time) เป็น 8.123 – 8.287 นาที สำหรับ DES และ 9.206 – 9.396 นาที สำหรับ Hexoestrol โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารทั้ง 2 ชนิด ที่เครื่องสามารถตรวจวิเคราะห์ได้คือ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 5) มี Peak area เฉลี่ยของ DES ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 4354.6, 9582.2, 19919.8, 40132.4, 80570.2, 163697.8 และ 324380.8 ตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) มากที่สุดคือ 1074.7 และที่ระดับความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (%CV) มากที่สุดคือ 3.4 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Peak area เฉลี่ยของ Hexoestrol ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 5812.4, 13262.2, 23926.6, 47772.4, 96034.2, 195935.6 และ 386012 ตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี SD มากที่สุดคือ 633.6 และที่ระดับความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี %CV มากที่สุดคือ 1.7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)



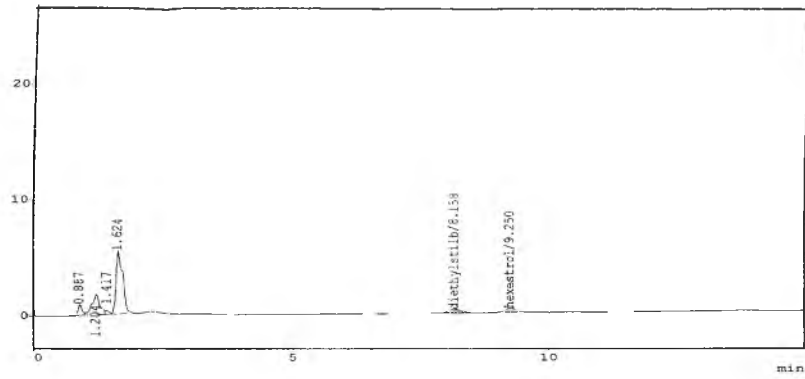
(a) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.03125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



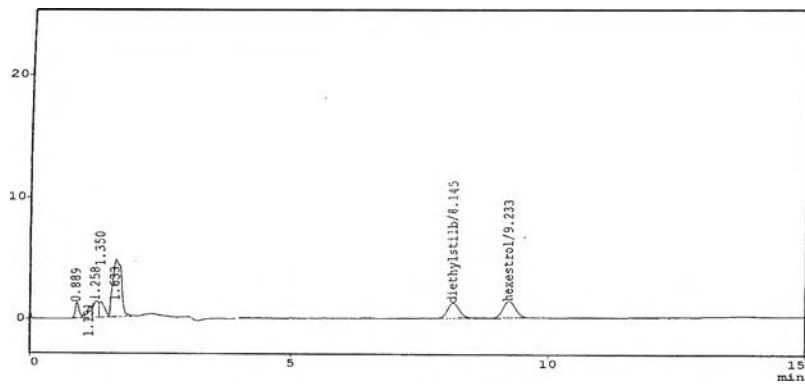
(b) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



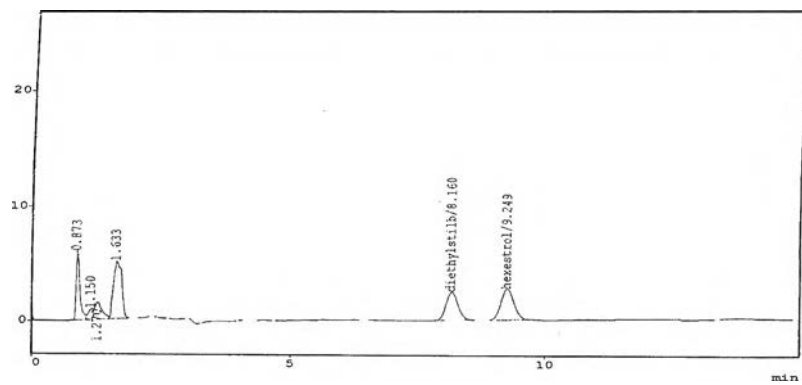
(c) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



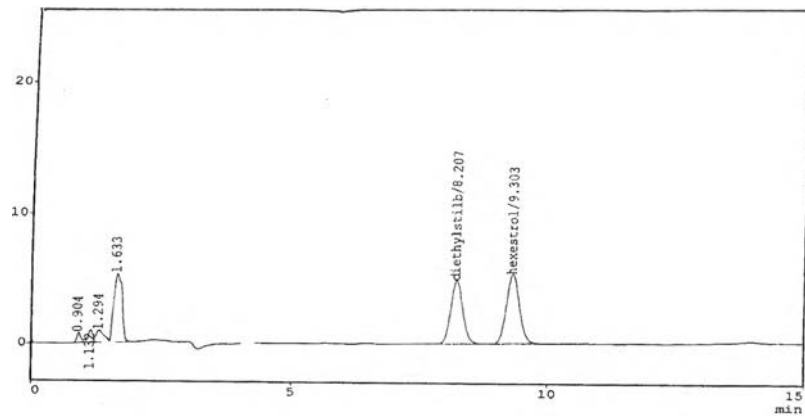
(d) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



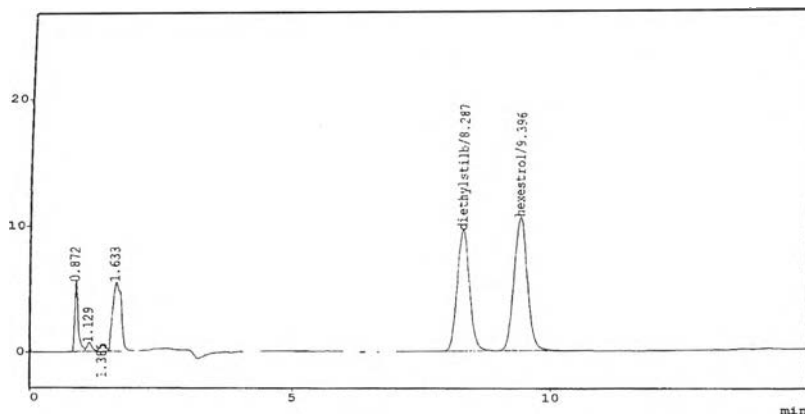
(e) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



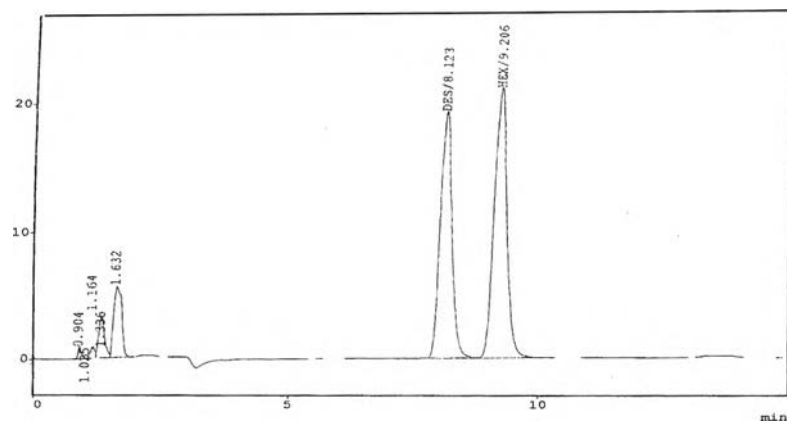
(f) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



(g) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



(h) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



(i) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 5 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.03125 ถึง 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 5 แสดง Peak area, SD และ CV ของสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol  
จากการทำการทดลองภายในวันเดียวกัน

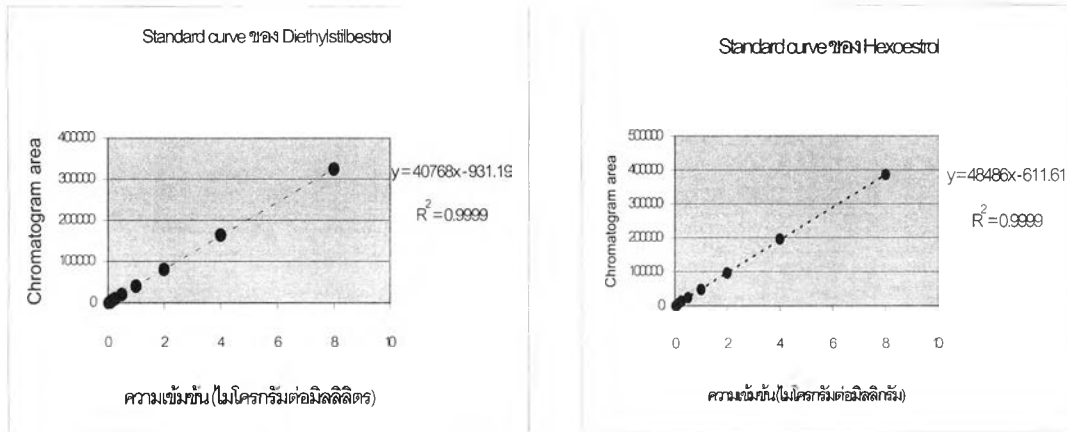
สาร ละลาย มาตรฐาน	ความเข้มข้น (ug/ml)	Peak area ของการวิเคราะห์					เฉลี่ย	SD	%CV
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5			
DES	0.03125	--*	--*	--*	--*	--*	--**	--**	--**
	0.0625	--*	--*	--*	--*	--*	--**	--**	--**
	0.125	4271	4331	4312	4342	4517	4354.6	84.7	1.9
	0.25	9710	9651	9817	8935	9798	9582.2	329.1	3.4
	0.5	20144	20103	19744	19797	19811	19919.8	168.3	0.8
	1	40162	40127	40340	40035	39998	40132.4	119.6	0.3
	2	80555	80569	80663	80595	80469	80570.2	62.8	0.1
	4	163001	164294	163722	163830	163642	163697.8	415.2	0.2
HEX***	8	324738	322607	323748	325422	325289	324380.8	1074.7	0.3
	0.03125	--*	--*	--*	--*	--*	--**	--**	--**
	0.0625	--*	--*	--*	--*	--*	--**	--**	--**
	0.125	5663	5918	5785	5767	5929	5812.4	99.9	1.7
	0.25	13323	13369	13143	13135	13341	13262.2	101.7	0.8
	0.5	23864	23883	23967	24133	23786	23926.6	118.2	0.5
	1	47884	47553	47692	47703	48030	47772.4	166.2	0.3
	2	96225	95868	95754	95969	96355	96034.2	223.5	0.2
4	194981	196632	195690	196277	196098	195935.6	565.6	0.3	
8	385974	385761	385168	386036	387121	386012	633.6	0.2	

\* ผลการวิเคราะห์ไม่ปรากฏ Peak ของ DES และ Hexoestrol

\*\* ไม่สามารถคำนวณได้

\*\*\* HEX หมายถึง Hexoestrol

เมื่อนำ Peak area ของ DES และ Hexoestrol มา plot กราฟเพื่อหาความสัมพันธ์กับความเข้มข้นทั้ง 9 ความเข้มข้น ด้วยวิธี Linear least square method พบว่า DES ได้สมการเชิงเส้นตรงเป็น  $Y=40768X - 931.19$  และมีค่า R-square เป็น 0.9999 ขณะที่ Hexoestrol ได้สมการเชิงเส้นตรงเป็น  $Y=48486X - 611.61$  และมีค่า R-square เป็น 0.9999 (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Chromatogram area กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol

จากการวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย %CV เพื่อวิเคราะห์ Interday และ Intraday precision โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วันติดต่อกัน พบว่า Interday precision ของ DES มีค่าเท่ากับ 0.4 และ 2.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ Hexoestrol มีค่าเท่ากับ 0.6 และ 3.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Intraday precision ของ DES ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าไม่เกิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าไม่เกิน 1.9 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Hexoestrol มี Intraday precision ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าไม่เกิน 0.3 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าไม่เกิน 1.7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ Intraday และ Interday precision ของสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol

สารละลาย มาตรฐาน	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	Interday (%CV)	Intraday (%CV)	
			วันที่ 1	วันที่ 2
DES	2	0.4	0.1	0.2
DES	0.125	2.3	1.9	1.4
Hexoestrol	2	0.6	0.2	0.3
Hexoestrol	0.125	3.4	1.7	0.8

เมื่อคำนวณหา Limit of Detection (LOD) ของ DES และ Hexoestrol จากสูตร

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

เมื่อ  $\sigma$  หมายถึง Y-intercepts ในสมการ Standard curve  
S หมายถึง slope ของสมการ Standard curve

แทนค่าในสมการ	LOD (DES)	= (3.3 * 931.19)/40768 = 0.075
	LOD (Hexoestrol)	= (3.3 * 611.61)/48486 = 0.041

ดังนั้นได้ค่าเป็น 0.075 และ 0.041 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และคำนวณค่า Limit of Quantitation (LOQ) ของ DES และ Hexoestrol จากสูตร

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

เมื่อ  $\sigma$  หมายถึง Y-intercepts ในสมการ Standard curve  
S หมายถึง slope ของสมการ Standard curve

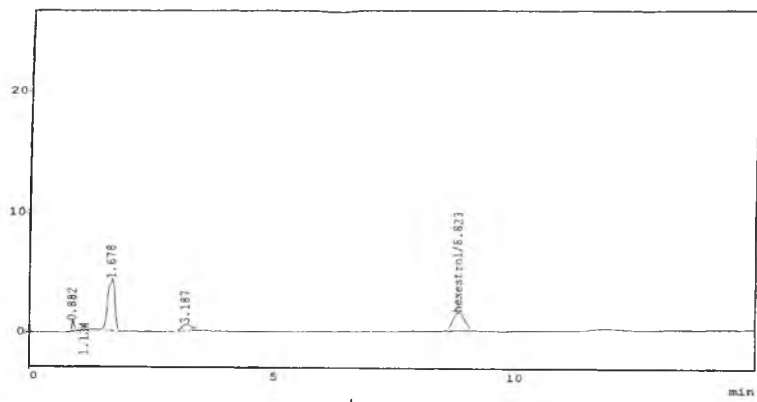
แทนค่าในสมการ	LOQ (DES)	= (10 * 931.19)/40768 = 0.228
	LOQ (Hexoestrol)	= (10 * 611.61)/48486 = 0.126

ดังนั้นได้ค่าเป็น 0.228 และ 0.126 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

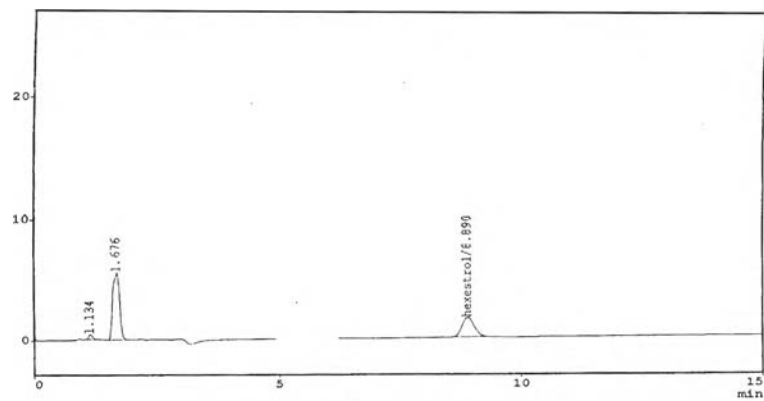
## 4.2 การทดลองที่ 2 การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่ใช้ฝังกอไก่ที่มีใช้ในพื้นที เพื่อระบุชนิดของตัวยาละและปริมาณที่แท้จริงด้วย HPLC

### 4.2.1 ชนิดของฮอร์โมน

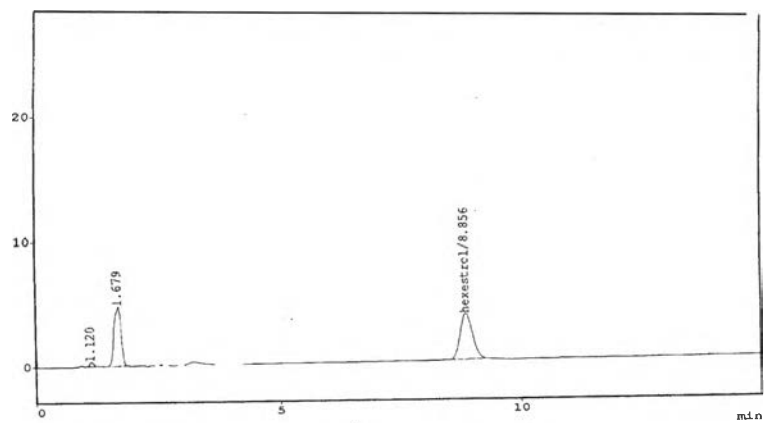
ผลของการวิเคราะห์ฮอร์โมนที่ใช้ฝังกอไก่จำนวน 7 แหล่ง (2 ซ้ำ) ด้วย HPLC แล้วเทียบกับสารละลายมาตรฐานพบว่าทุกตัวอย่างของฮอร์โมนที่ใช้ฝังกอไก่ที่ตรวจพบเป็น Hexoestrol ทั้งหมด โดยมี Retention time ของ Hexoestrol จากฮอร์โมนที่ใช้ฝังกอไก่แหล่ง A, B, C, D, E, F และ G จะอยู่ในช่วง 8.823 – 9.041 นาที (ตารางที่ 7) (รูปที่ 7)



(a) ฮอริโมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง A

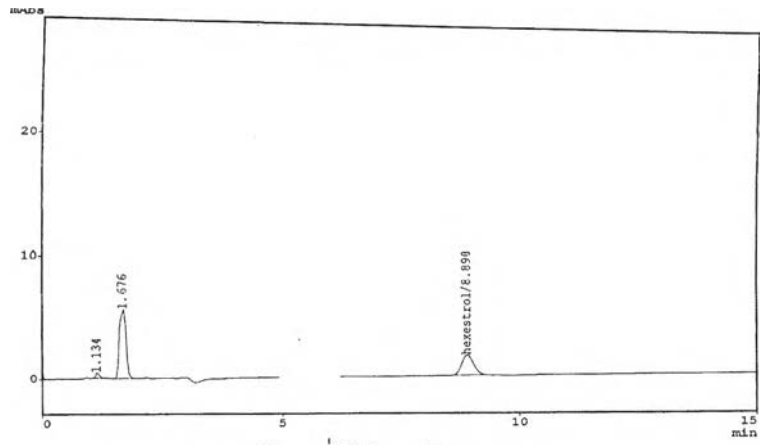


(b) ฮอริโมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง B

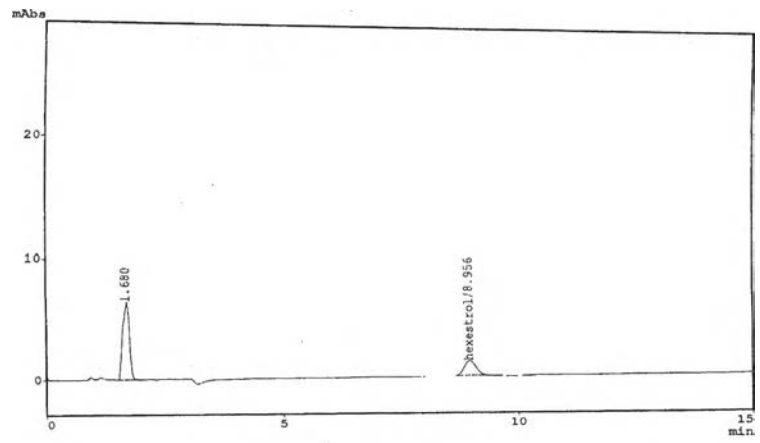


(c) ฮอริโมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง C

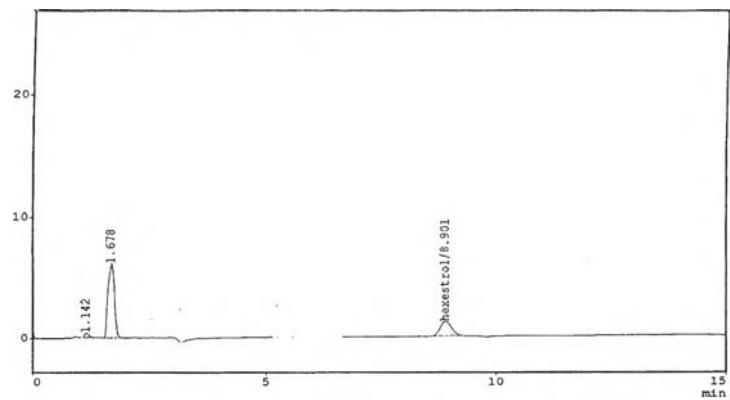




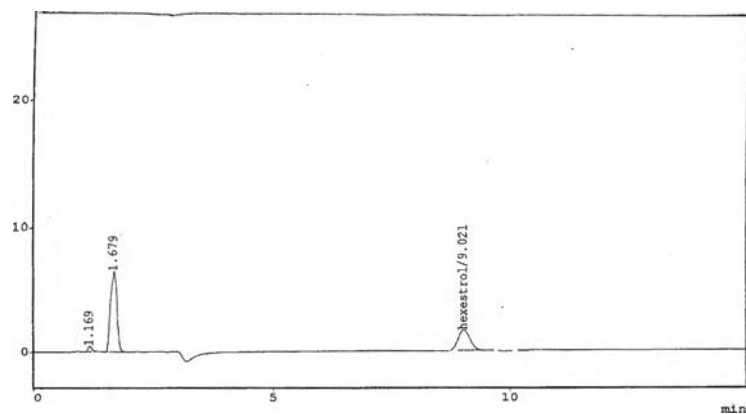
(d) ฮอริโมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง D



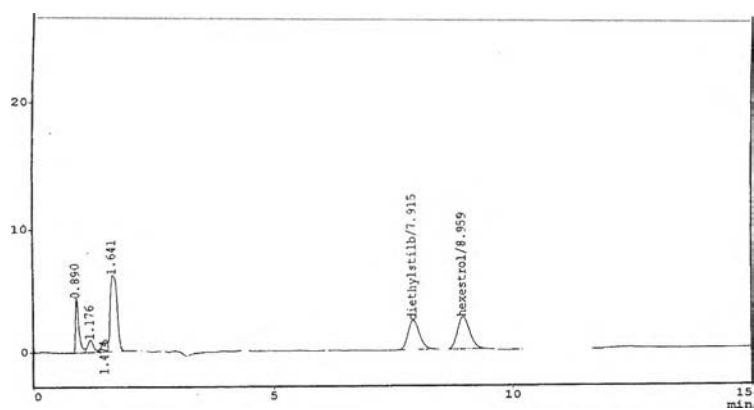
(e) ฮอริโมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง E



(f) ฮอริโมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง F



(g) ฮอโมนที่ใช้ฝิ่งคอกไก่แหล่ง G



(h) สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 7 Chromatograms ของฮอโมนที่ใช้ฝิ่งคอกไก่ทั้ง 7 แหล่งที่ระบุชนิดเป็น Hexoestrol เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7 แสดง Retention times ของ Hexoestrol จากฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ทั้ง 7 แห่ง  
เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

ชนิดสาร	Retention time (นาที)	
	วิเคราะห์ครั้งที่ 1	วิเคราะห์ครั้งที่ 2
สารละลายมาตรฐาน Hexoestrol 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	8.805	8.832
สารละลายมาตรฐาน Hexoestrol 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	8.807	8.969
สารละลายมาตรฐาน Hexoestrol 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	8.799	8.912
สารละลายมาตรฐาน Hexoestrol 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	8.797	8.890
สารละลายมาตรฐาน Hexoestrol 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	8.801	8.885
สารละลายมาตรฐาน Hexoestrol 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	8.811	8.887
สารละลายมาตรฐาน Hexoestrol 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	8.817	8.890
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง A ตัวอย่างที่ 1	8.823	8.834
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง A ตัวอย่างที่ 2	8.839	8.848
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง B ตัวอย่างที่ 1	8.856	8.862
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง B ตัวอย่างที่ 2	8.878	8.881
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง C ตัวอย่างที่ 1	8.874	8.878
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง C ตัวอย่างที่ 2	8.877	8.880
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง D ตัวอย่างที่ 1	8.886	8.890
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง D ตัวอย่างที่ 2	8.896	8.898
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง E ตัวอย่างที่ 1	8.898	8.901
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง E ตัวอย่างที่ 2	8.903	8.912
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง F ตัวอย่างที่ 1	8.917	8.929
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง F ตัวอย่างที่ 2	8.956	8.968
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง G ตัวอย่างที่ 1	8.998	9.009
ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง G ตัวอย่างที่ 2	9.021	9.041

#### 4.2.2 ปริมาณของฮอร์โมน

ผลการวิเคราะห์ขนาดปริมาณของตัวยาของฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ทั้ง 7 แห่ง (แหล่งละ 2 ซ้ำ) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol (สมการ Standrad curve เป็น  $Y=49547X-973.1$ ; R-square เป็น 0.9997) พบว่า ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง C มีปริมาณของ Hexoestrol มากที่สุด และมีความถูกต้องของสัดส่วนความแตกต่างของปริมาณตัวยาที่แท้จริงกับที่ระบุไว้ข้างขวดมากที่สุด ขณะที่ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง D ตัวอย่างที่ 2 และฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง E ตัวอย่างที่ 1 มีปริมาณของ Hexoestrol น้อยที่สุด และฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่แหล่ง D ตัวอย่างที่ 2 มีความถูกต้อง

ต้องของสัดส่วนความแตกต่างของปริมาณตัวยาที่แท้จริงกับที่ระบุไว้ข้างขวดยุ่ต่ำสุด ดังแสดงในตารางที่ 8 และจากการศึกษาอัตราการคืนกลับของสารโดยใช้ฮอร์โมนที่ใช้ฝิ่งคอไก่แหล่ง C ด้วยวิธี Standard addition method ผลการทดลองได้ 115.2 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 ผลของการวิเคราะห์ปริมาณของฮอร์โมนที่ใช้ฝิ่งคอไก่ทั้ง 7 แหล่ง

ที่มาของฮอร์โมน ที่ใช้ฝิ่งคอไก่	ปริมาณของตัวยา ตามที่ระบุข้างขวด (มิลลิกรัมต่อเม็ด)	ปริมาณของตัวยา จากการวิเคราะห์ (มิลลิกรัมต่อเม็ด)	% ของปริมาณตัวยา ที่วิเคราะห์เทียบกับ ที่ระบุข้างขวด
แหล่ง A ตัวอย่างที่ 1	25	4.81	19.24
แหล่ง A ตัวอย่างที่ 2	25	5.04	20.16
แหล่ง B ตัวอย่างที่ 1	25	11.29	45.16
แหล่ง B ตัวอย่างที่ 2	25	7.54	30.16
แหล่ง C ตัวอย่างที่ 1	20	20.26	101.30
แหล่ง C ตัวอย่างที่ 2	20	18.88	94.40
แหล่ง D ตัวอย่างที่ 1	25	4.91	19.64
แหล่ง D ตัวอย่างที่ 2	25	3.69	14.76
แหล่ง E ตัวอย่างที่ 1	20	3.69	18.45
แหล่ง E ตัวอย่างที่ 2	20	8.06	40.30
แหล่ง F ตัวอย่างที่ 1	15	3.86	25.73
แหล่ง F ตัวอย่างที่ 2	15	3.77	25.13
แหล่ง G ตัวอย่างที่ 1	15	5.07	33.80
แหล่ง G ตัวอย่างที่ 2	15	5.51	36.73

และผลจากการวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ฮอร์โมนที่ใช้ฝิ่งคอไก่แหล่ง C และ D พบว่า Intraday precision ของฮอร์โมนที่ใช้ฝิ่งคอไก่แหล่ง C และ D มีค่าไม่เกิน 1.22 และ 1.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ Interday precision ของฮอร์โมนที่ใช้ฝิ่งคอไก่แหล่ง C และ D มีค่าไม่เกิน 4.73 และ 0.41 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ทั้งนี้ระดับ LOD และ LOQ ของวิธีวิเคราะห์มีค่าเป็น 0.0648 และ 0.1964 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 9 ผลการคำนวณ Intraday และ Interday precision  
ของฮอร์โมนที่ใช้ฝั่งคอไก่แหล่ง C และ D

ฮอร์โมนที่ใช้ฝั่ง คอไก่แหล่ง	ปริมาณ (มิลลิกรัมเม็ด)	Interday (%CV)	Intraday (%CV)	
			วันที่ 1	วันที่ 2
C1	20.26	4.73	0.13	0.04
C2	18.88	4.09	1.22	0.30
D1	4.91	0.19	0.94	0.68
D2	3.69	0.41	0.83	1.11

### 4.3 การทดลองที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลองด้วย HPLC

#### 4.3.1 ประสิทธิภาพของวิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์ Hexoestrol ในเนื้อไก่

จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการสกัดและตรวจวิเคราะห์ Hexoestrol ในเนื้อไก่ ด้วยอัตราการคืนกลับของสารเป็นเวลา 2 วันติดต่อกันจาก

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

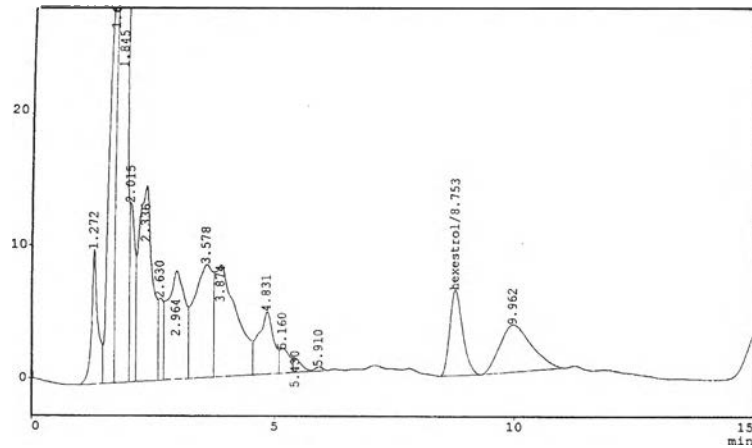
เมื่อ  $H_a$  หมายถึง ปริมาณของ Hexoestrol ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์  
 $H_b$  หมายถึง ปริมาณของ Hexoestrol ในตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์  
 $H_c$  หมายถึง ปริมาณสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol ที่เติมในตัวอย่าง

แทนค่าในสมการ

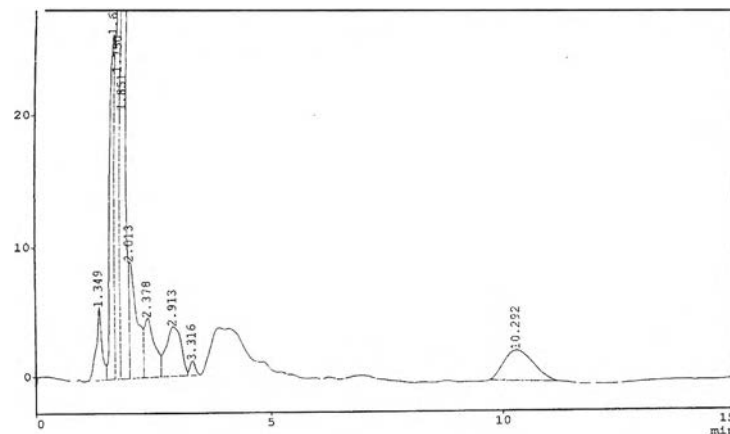
$$\text{วันที่ 1 อัตราการคืนกลับของสาร} = \frac{(3.2407 - 0)}{4} * 100 = 81.02$$

$$\text{วันที่ 2 อัตราการคืนกลับของสาร} = \frac{(3.5102 - 0)}{4} * 100 = 87.75$$

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์มีอัตราการคืนกลับของสารเป็น 81.02 และ 87.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยลักษณะของ Chromatogram ดังแสดงในรูปที่ 8



(a) Chromatogram ของกล้ามเนื้อที่เติมสารละลายมาตรฐาน  
Hexoestrol 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



(b) Chromatogram ของกล้ามเนื้อ  
ที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol

รูปที่ 8 Chromatogram ของกล้ามเนื้อที่เติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol  
เปรียบเทียบกับ Chromatogram ของกล้ามเนื้อที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน Hexoestrol

#### 4.3.2 ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลอง

จากการทดลองสกัดตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ของไก่กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ทั้งไก่เพศผู้  
และไก่เพศเมีย เพื่อวิเคราะห์ขนาดของการตกค้างของ Hexoestrol เทียบกับสารละลายมาตรฐาน  
Hexoestrol ด้วยเครื่อง HPLC โดยทำการแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 4 ชุดเพื่อความสะดวกใน  
การวิเคราะห์ และตัวอย่างในแต่ละชุดจะเทียบสารละลายมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่าง

ชุดนั้นๆ ดังนั้นได้สมการของ Standard curve ทั้งหมด 4 สมการคือ  $Y=48467X-2150.4$ ,  $Y=49873X-2885.3$ ,  $Y=49690X-2094.8$  และ  $Y=48444X-2732.6$  โดยมี R-square เป็น 0.9998, 0.9998, 0.9997 และ 0.9998 ตามลำดับ พบว่าตัวอย่างในกลุ่มควบคุมทั้งหมด ตรวจไม่พบการตกค้างของ Hexoestrol ขณะที่ตัวอย่างกล้ามเนื้อรวมในกลุ่มทดลองตรวจพบการตกค้างในไก่เพศผู้ที่ฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 14 วัน ในไก่ตัวที่ 1 ตัวอย่างที่ 2 และ ไก่ตัวที่ 3 ตัวอย่างที่ 2 ให้ Peak นาที่ที่ 8.675 – 9.030 และตรวจพบการตกค้างในไก่เพศเมียที่ฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 28 วัน ตัวที่ 2 ตัวอย่างที่ 2 ให้ Peak นาที่ที่ 8.700 สำหรับกล้ามเนื้อส่วนคอตรวจไม่พบการตกค้างทั้งในไก่เพศผู้และไก่เพศเมีย (ตารางที่ 10, 11, 12, 13) โดยลักษณะของ Peak ของตัวอย่างเนื้อไก่กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทั้งที่ตรวจพบสามารถดูได้ในรูปที่ 8

ตารางที่ 10 ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลอง  
หลังฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 14 วัน

เพศ	ไก่ตัว ที่/ตัว อย่าง ที่	กลุ่มควบคุม				กลุ่มทดลอง			
		กล้ามเนื้อรวม		กล้ามเนื้อคอ		กล้ามเนื้อรวม		กล้ามเนื้อคอ	
		น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)
ผู้	1/1	5.07	ไม่พบ	5.05	ไม่พบ	5.03	ไม่พบ	5.20	ไม่พบ
	1/2	5.13	ไม่พบ	*	--	5.12	0.23	*	--
							(9.030)**		
	2/1	5.16	ไม่พบ	5.18	ไม่พบ	5.24	ไม่พบ	5.19	ไม่พบ
	2/2	5.14	ไม่พบ	*	--	5.02	ไม่พบ	*	--
	3/1	5.07	ไม่พบ	5.23	ไม่พบ	5.14	ไม่พบ	5.11	ไม่พบ
เมีย	3/2	5.19	ไม่พบ	*	--	5.17	0.22	*	--
							(8.675)**		
	1/1	5.18	ไม่พบ	5.38	ไม่พบ	5.22	ไม่พบ	5.11	ไม่พบ
	1/2	5.21	ไม่พบ	*	--	5.21	ไม่พบ	*	--
	2/1	5.00	ไม่พบ	5.13	ไม่พบ	5.12	ไม่พบ	5.15	ไม่พบ
	2/2	5.32	ไม่พบ	*	--	5.18	ไม่พบ	*	--
3/1	5.04	ไม่พบ	5.18	ไม่พบ	5.15	ไม่พบ	5.01	ไม่พบ	
3/2	5.34	ไม่พบ	*	--	5.02	ไม่พบ	*	--	

\* ปริมาณกล้ามเนื้อส่วนคอที่ได้มีไม่เพียงพอในกล้ามเนื้อวิเคราะห์ซ้ำ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 2 ได้

\*\* Retention time ของ Hexoestrol (หน่วย: นาที่)

ตารางที่ 11 ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลอง  
หลังฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 21 วัน

เพศ	ไก่ตัว ที่/ตัว อย่าง ที่	กลุ่มควบคุม				กลุ่มทดลอง			
		กล้ามเนื้อรวม		กล้ามเนื้อคอ		กล้ามเนื้อรวม		กล้ามเนื้อคอ	
		น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)
ผู้	1/1	5.17	ไม่พบ	5.28	ไม่พบ	5.13	ไม่พบ	5.18	ไม่พบ
	1/2	5.27	ไม่พบ	-*	--	5.29	ไม่พบ	-*	--
	2/1	5.29	ไม่พบ	5.29	ไม่พบ	5.12	ไม่พบ	5.28	ไม่พบ
	2/2	5.28	ไม่พบ	-*	--	5.13	ไม่พบ	-*	--
	3/1	5.14	ไม่พบ	5.28	ไม่พบ	5.23	ไม่พบ	5.16	ไม่พบ
	3/2	5.29	ไม่พบ	-*	--	5.16	ไม่พบ	-*	--
เมีย	1/1	5.16	ไม่พบ	5.07	ไม่พบ	5.08	ไม่พบ	5.17	ไม่พบ
	1/2	5.00	ไม่พบ	-*	--	5.16	ไม่พบ	-*	--
	2/1	5.26	ไม่พบ	5.13	ไม่พบ	5.25	ไม่พบ	5.15	ไม่พบ
	2/2	5.25	ไม่พบ	-*	--	5.03	ไม่พบ	-*	--
	3/1	5.30	ไม่พบ	5.08	ไม่พบ	5.26	ไม่พบ	5.08	ไม่พบ
	3/2	5.22	ไม่พบ	-*	--	5.29	ไม่พบ	-*	--

\* ปริมาณกล้ามเนื้อส่วนคอที่ได้มีไม่เพียงพอในกล้ามเนื้อวิเคราะห์ซ้ำ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 2 ได้



ตารางที่ 12 ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลอง  
หลังฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 28 วัน

เพศ	ไก่ตัว ที่/ตัว อย่าง ที่	กลุ่มควบคุม				กลุ่มทดลอง				
		กล้ามเนื้อรวม		กล้ามเนื้อคอ		กล้ามเนื้อรวม		กล้ามเนื้อคอ		
		น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	
ผู้	1/1	5.09	ไม่พบ	5.29	ไม่พบ	5.05	ไม่พบ	5.16	ไม่พบ	
	1/2	5.26	ไม่พบ	-*	--	5.20	ไม่พบ	-*	--	
	2/1	5.20	ไม่พบ	5.16	ไม่พบ	5.25	ไม่พบ	5.00	0.29	
	2/2	5.08	ไม่พบ	-*	--	5.28	ไม่พบ	-*	--	
	3/1	5.30	ไม่พบ	5.20	ไม่พบ	5.14	ไม่พบ	5.16	ไม่พบ	
	3/2	5.08	ไม่พบ	-*	--	5.08	ไม่พบ	-*	--	
	เมีย	1/1	5.15	ไม่พบ	5.28	ไม่พบ	5.07	ไม่พบ	5.04	ไม่พบ
		1/2	5.13	ไม่พบ	-*	--	5.12	ไม่พบ	-*	--
		2/1	5.16	ไม่พบ	5.11	ไม่พบ	5.17	ไม่พบ	5.15	ไม่พบ
		2/2	5.19	ไม่พบ	-*	--	5.25	0.20 (8.700)**	-*	--
3/1		5.04	ไม่พบ	5.10	ไม่พบ	5.06	ไม่พบ	5.28	ไม่พบ	
3/2		5.12	ไม่พบ	-*	--	5.17	ไม่พบ	-*	--	

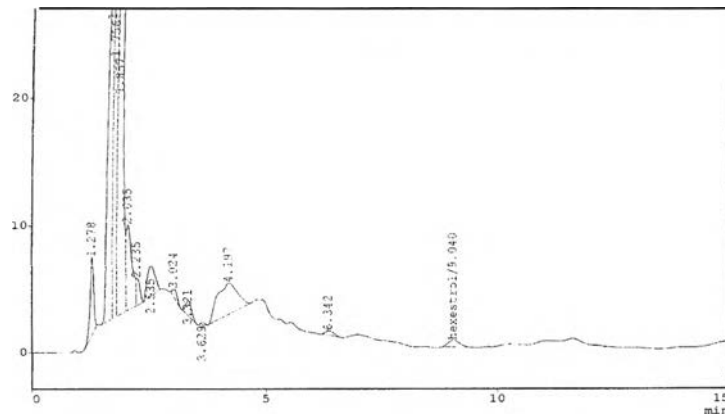
\* ปริมาณกล้ามเนื้อส่วนคอที่ได้มีไม่เพียงพอในกล้ามเนื้อวิเคราะห์ซ้ำ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 2 ได้

\*\* Retention time ของ Hexoestrol (หน่วย: นาที)

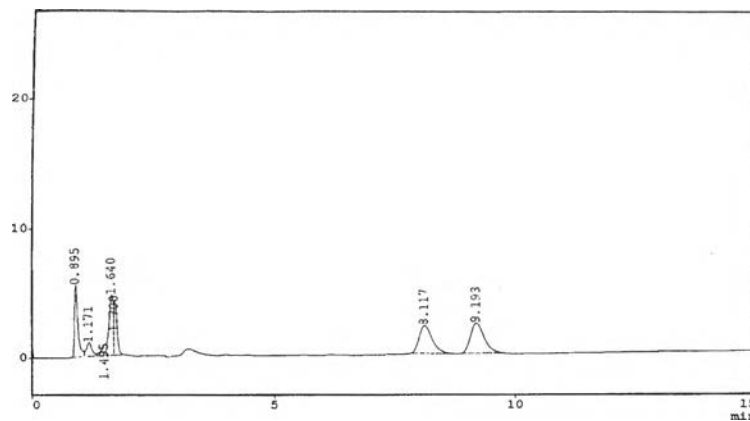
ตารางที่ 13 ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลอง  
หลังฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่มา 35 วัน

เพศ	ไก่ตัว ที่/ตัว อย่าง ที่	กลุ่มควบคุม				กลุ่มทดลอง			
		กล้ามเนื้อรวม		กล้ามเนื้อคอ		กล้ามเนื้อรวม		กล้ามเนื้อคอ	
		น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)	น้ำหนัก เนื้อ (กรัม)	ระดับ ตกค้าง (ไมโครกรัม)
ผู้	1/1	5.03	ไม่พบ	5.16	ไม่พบ	5.05	ไม่พบ	5.16	ไม่พบ
	1/2	5.08	ไม่พบ	-*	--	5.21	ไม่พบ	-*	--
	2/1	5.27	ไม่พบ	5.21	ไม่พบ	5.11	ไม่พบ	5.25	ไม่พบ
	2/2	5.24	ไม่พบ	-*	--	5.20	ไม่พบ	-*	--
	3/1	5.08	ไม่พบ	5.12	ไม่พบ	5.19	ไม่พบ	5.04	ไม่พบ
	3/2	5.21	ไม่พบ	-*	--	5.25	ไม่พบ	-*	--
เมีย	1/1	5.27	ไม่พบ	5.22	ไม่พบ	5.20	ไม่พบ	5.19	ไม่พบ
	1/2	5.00	ไม่พบ	-*	--	5.28	ไม่พบ	-*	--
	2/1	5.15	ไม่พบ	5.20	ไม่พบ	5.24	ไม่พบ	5.07	ไม่พบ
	2/2	4.97	ไม่พบ	-*	--	5.15	ไม่พบ	-*	--
	3/1	5.26	ไม่พบ	5.04	ไม่พบ	5.14	ไม่พบ	5.04	ไม่พบ
	3/2	5.02	ไม่พบ	-*	--	5.17	ไม่พบ	-*	--

\* ปริมาณกล้ามเนื้อส่วนคอที่ได้มีไม่เพียงพอในกล้ามเนื้อวิเคราะห์ซ้ำ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 2 ได้



(a) ตัวอย่าง Chromatogram ของกล้ามเนื้อรวม จากไก่เพศผู้ กลุ่มทดลอง ตัวที่ 1 ตัวอย่างที่ 2 หลังฝังยา 14 วัน ที่ให้ผลบวก



(b) Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้ peak ของ DES ที่นาที 8.117 และให้ peak ของ Hexoestrol ที่นาที 9.193

รูปที่ 9 แสดง Chromatogram ของกล้ามเนื้อในกลุ่มทดลองที่ให้ผลบวก  
เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน DES และ Hexoestrol

จากการคำนวณหาอัตราค่าคืนกลับของสารพบว่าการแบ่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวน 4 ครั้ง ให้อัตราค่าคืนกลับของสารเป็น 93.70, 93.56, 82.93 และ 87.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการคำนวณความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย Intraday precision พบว่า สำหรับการวิเคราะห์ Interday precision จะทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ในวันถัดไปและใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อในกลุ่มทดลองที่ให้ผลบวกมาคำนวณหาพบว่า Interday precision มี %CV เท่า

กับ 32.39 – 141.42 เปอร์เซ็นต์ และ Intraday precision มีค่าเท่ากับ 0.04 – 141.42 เปอร์เซ็นต์ และในบางตัวอย่างไม่สามารถคำนวณ %CV ได้ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ผลการคำนวณ Intraday และ Interday precision จากการวิเคราะห์ระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ กลุ่มทดลอง ที่ให้ผลบวก

ตัวอย่างเนื้อไก่	ระดับการตกค้างที่ตรวจพบ (ไมโครกรัม)	Interday (%CV)	Intraday (%CV)	
			วันที่ 1	วันที่ 2
เพศผู้ ตัวที่ 1 ตัวอย่างที่ 2 กล้ามเนื้อรวม (14 วัน*)	0.23	141.42	2.83	--**
เพศผู้ ตัวที่ 3 ตัวอย่างที่ 2 กล้ามเนื้อรวม (14 วัน*)	0.22	32.39	0.04	141.42
เพศเมีย ตัวที่ 2 ตัวอย่างที่ 2 กล้ามเนื้อรวม (28 วัน*)	0.20	141.42	9.77	--**

\* จำนวนวันหลังการฝังฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่

\*\* ไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจากตรวจไม่พบ Chromatogram ในวันที่ 2

ในการแบ่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ 4 ครั้ง และคำนวณหา LOD พบว่ามีค่าเป็น 0.146, 0.191, 0.139 และ 0.186 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน LOQ มีค่าเป็น 0.444, 0.578, 0.422 และ 0.564 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ