บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

5.1.1 การประยุกต์และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ DES และ Hexoestrol ในห้องปฏิบัติการด้วย HPLC

จากผลการทดลองพบว่า สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการทดลองนี้จะให้ลักษณะของ Peak ของ DES และ Hexoestrol ที่แยกออกจากกันชัดเจน โดยที่ Peak ของ DES ปรากฏขึ้นก่อนที่นาที 8.123 – 8.287 ขณะที่ Hexoestrol ให้ Peak นาทีที่ 9.206 – 9.396 เนื่องจาก DES เป็นสารที่มีขั้ว (polarity) มากกว่า Hexoestrol ประกอบกับการใช้ HPLC column ซึ่งเป็น Reverse phase ที่มีเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) เป็นสารที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย ทำให้สารที่ถูกชะออกจาก column ก่อน จะเป็นสารที่มีสภาพความเป็นขั้วมากกว่า ขณะที่สารที่มีขั้วน้อยกว่าจะถูกหน่วงอยู่ใน column นานกว่า และเมื่อพิจารณาถึงสมการเส้นตรงของ Standard curve ร่วมกับ R-square พบว่าทั้ง DES และ Hexoestrol มีค่าเท่ากับ 0.9999 ซึ่งเป็นระดับที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ยังพบว่า Peak area ของ Hexoestrol มีแนวโน้มที่จะมีค่ามากกว่า DES ในทุกความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน สอดคล้องกับการศึกษาของ Koole และคณะ (1999) ที่ได้ทดลองหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมต่อการดูดกลืนแสงของ DES และ Hexoestrol ด้วย HPLC โดยใช้ Diode array detector พบว่า DES ดูดกลืนแสง Ultraviolet-Visible (UV) ได้ดีที่สุดที่ 242 นาโนเมตร ขณะที่ Hexoestrol ดูดกลืนแสง UV ได้ดีที่สุดที่ 230 นาโนเมตร ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ความยาวคลื่นที่ 230 นาโนเมตร ทำให้ Peak area ของ DES มีแนวโน้มที่จะมีค่าน้อยกว่า Hexoestrol ดังนั้นเมื่อนำ Peak area มาคำนวณหา Standard curve, Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) จะทำให้ค่าที่ได้ของ Hexoestrol ดีกว่า DES กล่าวคือ Hexoestrol มีแนวโน้มในการสามารถตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างได้ในความเข้มข้นระดับที่ต่ำกว่า DES ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร โดยในการทดลองนี้ LOD และ LOQ ของ Hexoestrol มีค่าเป็น 0.041 และ 0.126 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ DES มีค่า LOD และ LOQ เป็น 0.075 และ 0.228 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับการคำนวณหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์พบว่าทั้ง DES และ Hexoestrol มี %CV ของทั้ง Interday และ Intraday precision ไม่เกิน 3.4 เปอร์เซ็นต์ และเป็นน่าที่สังเกตว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า จะมี %CV มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า แสดงให้เห็นว่าหากต้องการศึกษาการตกค้างของสารในระดับต่ำๆ อาจจะเกิดความผันแปรของวิธีวิเคราะห์มากกว่าสารที่มีการตกค้างในปริมาณสูง อย่างไรก็ดีผลจากการทดลองระดับ %CV อยู่ในระดับที่ยอมรับได้เนื่องจากไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ (Ambruster *et al.*, 1994)

5.1.2 การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ที่มีการใช้ในพื้นที่ เพื่อระบุชนิดของตัวยาและปริมาณที่แท้จริงด้วย HPLC

การระบุชนิดของฮอร์โมนที่ลักลอบใช้ในประเทศได้อย่างถูกต้องเป็นสิ่งสำคัญ เพราะสามารถช่วยให้การเฝ้าระวังการตกค้างและการแก้ไขการลักลอบใช้สารฮอร์โมนที่ผิดกฎหมายประสบความสำเร็จได้มากขึ้น เนื่องจากทำให้ผู้ตรวจสามารถเลือกใช้ชุดตรวจสอบและวิธีการตรวจได้อย่างถูกต้องตรงกับสารที่มีการลักลอบใช้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลือกใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสารที่ตรวจสูง จากข้อมูลของบริษัท Randox Laboratories ประเทศสหราชอาณาจักร ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบ ELISA รายงานว่าชุดทดสอบ ELISA สำหรับสารในกลุ่ม Stilbene มี Cross reactivity ต่อ Hexoestrol และ DES เท่ากับ 100 และ 43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ[1] ในทางตรงกันข้ามชุดทดสอบ ELISA สำหรับ DES ของบริษัท R-biopharm AG ประเทศเยอรมัน มี Cross reactivity ต่อ Hexoestrol และ DES เท่ากับ 22 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ[2] ดังนั้นเมื่อใช้ชุดตรวจสอบที่ไม่ตรงกับชนิดของสารที่จะตรวจก็อาจได้ผลการตรวจที่ผิดพลาด ส่วนวิธีการตรวจ HPLC นั้นสามารถตรวจหาสารทั้งสองชนิดคือ DES และ Hexoestrol ได้พร้อมกัน ด้วยเหตุผลนี้การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีวิเคราะห์แบบ HPLC

ผลจากการวิเคราะห์ชนิดของฮอร์โมนที่ใช้ฝังคอไก่ที่ลักลอบจำหน่ายในภาคกลางจากงานวิจัยนี้ พบว่า Chromatogram ของตัวอย่างยาทั้ง 7 แหล่งให้ Peak ที่เวลา 8.799 – 9.041 นาที ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ Peak ของสารละลายมาตรฐานแล้ว พบว่าเป็น Peak ของ Hexoestrol *แสดงว่าฮอร์โมนที่ลักลอบใช้ฝังคอไก่ในเขตภาคกลางของประเทศไทยที่นำมาวิเคราะห์คือ Hexoestrol*

[1] *แหล่งที่มา: E-Mail: Lynsey.Smith@randox.com*

[2] *แหล่งที่มา: http://www.r-biopharm.de*

จากการศึกษาของ Nascimento และคณะ (1996) พบว่าชนิดของตัวยาที่มีการลักลอบใช้ในประเทศบราซิล พบว่าชนิดของตัวยาที่ตรวจพบมีทั้ง DES และ Hexoestrol และ Sadex และคณะ (1998) ได้ทำการสำรวจปริมาณฮอร์โมนชนิดต่างๆ ที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ในประเทศอียิปต์พบว่า DES เป็นสารที่มีการลักลอบใช้เช่นกัน จากข้อมูลเหล่านี้แสดงว่าในปัจจุบันยังมีการลักลอบใช้สารทั้ง 2 ชนิดในการเลี้ยงสัตว์ของประเทศที่กำลังพัฒนา สำหรับในประเทศไทยจากประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดรายชื่อวัตถุดิบที่ใช้ผลิตยาที่ต้องจัดทำบัญชีทุกสี่เดือน ซึ่งประกาศ ณ วันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2545 พบว่า DES เป็นวัตถุดิบที่สามารถนำเข้ามาในราชอาณาจักรได้อย่างถูกกฎหมาย แต่ต้องจัดทำบัญชีทุกสี่เดือนเพื่อควบคุมการใช้ ดังนั้นอาจจะมีการลักลอบนำเอา DES ไปใช้เพื่อการเลี้ยงสัตว์ จึงจำเป็นที่ต้องมีการสำรวจเพิ่มเติมว่าในประเทศไทยมีการใช้สาร DES ด้วยหรือไม่

เมื่อพิจารณาปริมาณที่แท้จริงของฮอร์โมนที่มีอยู่ในตัวอย่างยาอัดเม็ดที่นำมาวิเคราะห์พบว่า มีตัวอย่างจากเพียงแหล่งเดียวคือ แหล่ง C ที่มีปริมาณของ Hexoestrol ต่อเม็ดใกล้เคียงกับที่ระบุไว้ข้างขวดคือ 20 มิลลิกรัมต่อเม็ด ขณะที่ตัวอย่างยาอัดเม็ดจากแหล่งอื่นๆ มีปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่าที่ระบุไว้ข้างขวด และจากการทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำต่อหนึ่งตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างยาจากแหล่ง E มีปริมาณ Hexoestrol ต่อเม็ดแตกต่างกันมากคือ 3.69 และ 8.06 มิลลิกรัมต่อเม็ด แสดงให้เห็นถึงขบวนการผลิตยาที่ไม่ได้มาตรฐาน เนื่องจากเป็นสิ่งที่ลักลอบทำอย่างผิดกฎหมาย ข้อมูลที่พบนี้แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ตอนโดยการฝังยาส่วนมากมีโอกาสใช้สารฮอร์โมนในขนาดต่ำกว่าที่ระบุไว้ข้างขวด และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของไก่อาจไม่ใช้ผลที่แท้จริงจากการใช้ฮอร์โมน จากการศึกษาของ Wanichapichart และคณะ (1999) เกี่ยวกับผลของการตอนไก่โดยการฝังยาในไก่เพศผู้และเพศเมียพบว่า ไก่เพศผู้กลุ่มที่ฝังยามีอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่ไก่เพศเมียไม่พบความแตกต่างแต่จะพบไขมันในช่องท้องมากขึ้น ซึ่งในสภาพการเลี้ยงไก่ตอนในพื้นที่จริงมักจะพบว่าเกษตรกรใช้ไก่ทั้ง 2 เพศในการเลี้ยง และจากข้อมูลข้างต้นแสดงให้ว่า หากเกษตรกรทำการฝังฮอร์โมนให้แก่ไก่เพศเมียในการเลี้ยงเพื่อหวังผลเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักไก่ อาจเป็นการเพิ่มต้นทุนแก่เกษตรกรและเพิ่มโอกาสของการตกค้างของ Hexoestrol โดยไม่จำเป็น ดังนั้นการให้ความรู้เกี่ยวกับอันตรายของสารในกลุ่มนี้ ประสิทธิภาพที่แท้จริงของฮอร์โมน รวมทั้งแนวทางในการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตในไก่ เพื่อให้เกษตรกรเลิกใช้สารในกลุ่มนี้ จึงเป็นสิ่งที่ควรปฏิบัติสำหรับบุคลากรและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

สำหรับความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์พบว่าสมการเส้นตรงของ Standard curve และค่า R-square อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ คือมีค่า R-square เท่ากับ 0.9997 มีค่า Interday และ Intraday precision ไม่เกิน 4.73 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่ยอมรับได้ (Ambruster *et al.*, 1994) โดยมี LOD และ LOQ เท่ากับ 0.065 และ 0.196 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการทดลองที่ 1 เล็กน้อยอาจเนื่องจากเป็นเพราะสภาพแวดล้อมในการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งที่แตกต่างกัน

5.1.3 วิเคราะห์ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลองด้วย HPLC

5.1.3.1 ประสิทธิภาพของการสกัดและวิธีวิเคราะห์ Hexoestrol ในเนื้อไก่

จากผลการคำนวณประสิทธิภาพของวิธีสกัดและวิเคราะห์จากอัตราการคืนกลับของสารเป็นเวลา 2 วันติดต่อกันพบว่า มีค่าเท่ากับ 81.02 และ 87.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ดีการทำเทคนิค Standard addition method ในการทดลองนี้ใช้สารละลายมาตรฐาน Hexoestrol ที่ความเข้มข้นสูงคือ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพียงระดับเดียว ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพของวิธีสกัดและวิเคราะห์จากอัตราการคืนกลับของสารโดยใช้สารละลายมาตรฐานมากกว่า 1 ความเข้มข้น

5.1.3.2 ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ทดลอง

ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างกล้ามเนื้อจากไก่กลุ่มควบคุมทั้งหมด 72 ตัวอย่าง ไม่พบว่ามีการตกค้างของ Hexoestrol และในกลุ่มทดลองอีก 72 ตัวอย่าง พบการตกค้างของ Hexoestrol ในกล้ามเนื้อรวมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง โดยพบระดับตกค้างสูงสุดพบในไก่ทดลองที่ฝังฮอร์โมนที่มาแล้ว 14 วัน เพศผู้ตัวที่ 1 ตัวอย่างที่ 2 ในขนาด 0.23 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเนื้อไก่ 5.12 กรัม หรือคิดเป็น 0.045 ไมโครกรัมต่อกรัม (พีพีเอ็ม) และพบระดับการตกค้างต่ำสุดในไก่ทดลองหลังที่ฝังฮอร์โมนมาแล้ว 28 วัน เพศเมียตัวที่ 2 ตัวอย่างที่ 2 ในขนาด 0.20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเนื้อไก่ 5.25 กรัม หรือคิดเป็น 0.038 ไมโครกรัมต่อกรัม (พีพีเอ็ม) ส่วนกล้ามเนื้อคอตรวจไม่พบการตกค้าง ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตัวเลขที่ได้พบว่า ระดับการตกค้างที่ตรวจพบยังไม่สามารถยอมรับได้ในแง่ของการวัดเชิงปริมาณเนื่องจากมี %CV มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้อัตราการคืนกลับของสารจะมีค่าที่ดีก็ตาม นอกจากนี้ในตัวอย่างที่พบการตกค้างทั้ง 3 ตัวอย่าง ไม่มีตัวอย่างใดเลยที่ตรวจพบการตกค้างในตัวอย่างที่วิเคราะห์ซ้ำที่ 2 ซึ่งอาจเนื่องมาจากการกระจายตัวของ Hexoestrol ในตัวอย่างกล้ามเนื้อที่นำมาวิเคราะห์อาจมีไม่เท่ากันเพราะกล้ามเนื้อที่ใช้เป็นกล้ามเนื้อรวม ทำให้เป็นไปได้ว่าในตัวอย่างนั้นๆ มีสัดส่วนของปริมาณกล้ามเนื้อออก น่อง หรือปีกบนไม่

เท่ากัน ส่วนในไก่กลุ่มทดลองส่วนใหญ่ที่ตรวจไม่พบการตกค้างของ Hexoestrol เนื่องจากความไวของวิธีวิเคราะห์มีไม่เพียงพอ ทำให้ตรวจวิเคราะห์ได้เฉพาะตัวอย่างที่มีการตกค้างสูง สำหรับค่า LOD และ LOQ จากการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ 1 และ 2 พบว่ามีค่าสูงกว่า อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมของการทดลองในแต่ละวันที่แตกต่างกัน

ส่วนกล้ามเนื้อคอที่ตรวจไม่พบการตกค้างเลยทั้งที่เป็นตำแหน่งที่น่าจะมีการตรวจพบการตกค้างมากที่สุด อาจเนื่องมาจากในตำแหน่งการฝังฮอร์โมนที่บริเวณคอไก่กับตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างเป็นคนละส่วนกัน กล่าวคือปกติแล้วเกษตรกรจะทำการฝังไว้ที่ตำแหน่งที่ใกล้กับด้านหลังหัวไก่ เพื่อป้องกันการหลุดออกของตัวยา เพราะบริเวณนั้นมีช่องว่างในชั้นใต้ผิวหลังที่น้อยกว่าส่วนกลางลำคอไก่ ทำให้ปริมาณการตกค้างจะสูงสุดในกล้ามเนื้อคอบริเวณที่ฝังฮอร์โมนนี้ ขณะที่การเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อส่วนคอผู้ชำแหละมักจะเก็บกล้ามเนื้อส่วนคอด้านล่าง เนื่องจากบริเวณที่ฝังฮอร์โมนด้านหลังหัวไก่ยากต่อการเก็บเพราะมีกล้ามเนื้อน้อย ซึ่ง Lone (1997) รายงานว่าในตำแหน่งกล้ามเนื้อคอด้านล่างจะมีการตกค้างของ Hexoestrol ในปริมาณที่น้อยกว่าตำแหน่งที่มีการฝังสาร และจากการศึกษาของ Herriman และคณะ (1982) พบว่าการเก็บกล้ามเนื้อจากคอไก่ส่วนบนซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ฝังฮอร์โมนจะมีการตกค้างมากกว่ากล้ามเนื้อคอส่วนล่างประมาณ 179 เท่า ดังนั้นผลการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของ Hexoestrol ในกล้ามเนื้อคอของการทดลองนี้จึงมีโอกาสไม่พบมากขึ้น

5.2 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองทั้ง 3 การทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์แบบ HPLC สามารถระบุชนิดและปริมาณของตัวยาที่มีการลักลอบใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่ได้ จำเป็นต้องมีการพัฒนาต่อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์โดยเฉพาะการเพิ่มความไวของวิธี HPLC โดยขอเสนอแนวทางในการพัฒนาเทคนิคคือ

1) เพิ่มความไวของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ Detector ที่ต่อกับเครื่อง HPLC ที่มีความไวมากกว่า Ultraviolet-Visible detector เช่น Mass-spectrometric detector

2) เพิ่มความไวของวิธีวิเคราะห์ โดยการกำจัด noise และ peak ที่ไม่ต้องการออกจาก Chromatogram ด้วยการใช้ Solid phase extraction C_{18} แบบ purification กล่าวคือในการทดลองนี้ใช้ SepPak® C_{18} ซึ่งเป็น Solid phase extraction เช่นกัน แต่ใช้ในรูปแบบของการกรอง ดังนั้น Chromatogram ที่ได้จึงมี noise และ peak ที่ไม่ต้องการค่อนข้างมาก ทำให้สัดส่วน

signal to noise ใกล้เคียงกันมากเกินไป ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการให้ผลลบเทียม (false negative)

3) เพิ่มปริมาณของน้ำหนักกล้ามเนื้อที่นำมาวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มปริมาณของ Hexoestrol ในตัวอย่าง อาจทำให้เครื่อง HPLC สามารถวิเคราะห์ระดับการตกค้างได้ดีขึ้น ทั้งนี้ การเพิ่มปริมาณกล้ามเนื้อที่นำมาวิเคราะห์ควรศึกษาถึงความเหมาะสมของปริมาณของตัวทำละลายที่นำมาสกัดด้วย

4) ควรแยกตัวอย่างกล้ามเนื้อออก น่อง และปีกบน ในการวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้าง เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้กล้ามเนื้อในส่วนดังกล่าวมารวมกัน ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดความผันแปรของระดับการตกค้างได้

5) ศึกษาและทดลองถึงความเป็นไปได้ในการนำตัวอย่างจากตับมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เนื่องจากตับจะมีการตกค้างของ Hexoestrol สูงสุด (Lone, 1997) อย่างไรก็ดีการตกค้างที่ตับควรพิจารณาถึงเมตาบอไลท์ของ Hexoestrol ด้วยเช่นกัน

6) ประยุกต์วิธีวิเคราะห์ HPLC เข้ากับวิธีวิเคราะห์แบบ ELISA โดยใช้ HPLC เพื่อการ purify สาร ด้วยการทำ Fraction collector แล้วนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย ELISA ที่มีความไวของวิธีวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามควรพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายและความคุ้มค่าในการศึกษา