การวิเคราะห์ปริมาณซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลในเนื้อสุกรโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Determination of Salbutamol and Clenbuterol in Pork by High-Performance Liquid Chromatography

ณัฐพล รอดเรืองธรรม สมศักดิ์ ศิริไชย* และขจัดภัย ทิพยผ่อง
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี 20131
Nattapol Rodruangtum, Somsak Sirichai, and Khajadpai Thipyapong
Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทคัดย่อ

วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและตรวจวัดด้วยยูวีซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วได้พัฒนาขึ้นและตรวจสอบความถูกต้องวิธีในการวิเคราะห์ซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลในตัวอย่างเนื้อหมูโดยใช้คอลัมน์ C_{18} ร่วมกับเมทานอลและสารละลายฟอสเฟตเป็นเฟสเคลื่อนที่สำหรับชะแบบเกรเดียนและใช้ปริมาตรฉีดสาร 20 μL ทำการตรวจวัดซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลที่ 206 nm และ 400 nm ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถวิเคราะห์สารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลได้ภายใน 10 นาที ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณของซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลเท่ากับ 20 μg/L และ 40 μg/L ตามลำดับ ให้ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.05-5.0 mg/L ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.9990

คำสำคัญ: โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซัลบูทามอล เคลนบูเทรอล

Abstract

A rapid and simple high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection of salbutamol and clenbuterol in pork samples is developed and validated. Analysis was carried out on C_{18} column associated with methanol and phosphate solution as mobile phase using gradient elution with 20 μL injection volume. Salbutamol and clenbuterol were detected at 206 nm, and 400 nm, respectively. Under the optimized conditions, the quantitative determination of the salbutamol and clenbuterol was achieved with 10 min. The limit of detection and limit of quantification of salbutamole and clenbuterol were 20.0 μg/L, and 40.0 μg/L, respectively. Linear calibration curves were obtained in the rabge of 0.05-5.0 mg/L with correlation coefficient (r^2) > 0.9990.

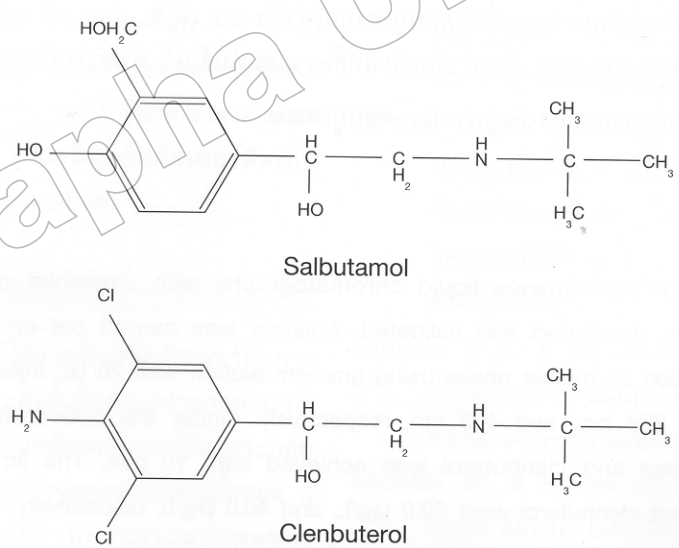
Keywords: high-performance liquid chromatography, salbutamol, clenbuterol

***Corresponding author** E-mail: sirichai@buu.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันมีการรณรงค์ในเรื่องการรักษาสุขภาพกันมากขึ้น ได้แก่ การบริโภคอาหารที่มีประโยชน์และการออกกำลังกายสม่ำเสมอ เนื้อสุกรเป็นอาหารสดที่คนส่วนใหญ่นิยมบริโภคเนื่องจากมีราคาถูกและสามารถนำมาปรุงเป็นอาหารสำเร็จที่มีรสชาติอร่อย แต่ในปัจจุบันวิธีการเลี้ยงสุกรของเกษตรกรเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่นิยมเลือกซื้อเนื้อสุกรที่มีสีแดงหรือชมพูและมีไขมันน้อย ดังนั้นจึงมีการนำสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β-agonist) ผสมกับอาหารสำหรับเลี้ยงสุกร สารกลุ่มนี้จะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ทำให้ไขมันสลายตัวและทำให้กล้ามเนื้อขยายใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้น สารเคมีดังกล่าวจึงมีโอกาสตกค้างในเนื้อสุกรและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่ความไวต่อสารกลุ่มนี้ เมื่อสัตว์ได้รับสารเบต้าอะโกนิสต์แล้วจะสะสมไว้ที่เนื้อและตับประมาณ 25-30 วัน และแสดงอาการต่าง ๆ ประมาณ 70 วันนั้น สารเบต้าอะโกนิสต์ที่นิยมใช้ในประเทศไทย ได้แก่ ซัลบูทามอล (salbutamol) และเคลนบูเทรอล (clenbuterol) ดังโครงสร้างทางเคมีแสดงใน**ภาพที่ 1**

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์สารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลในเนื้อสัตว์จำเป็นต้องใช้วิธีตรวจที่มีประสิทธิภาพสูง ในห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ใช้วิธี enzyme immuno assay (EIA) (Howell *et al.*, 1993) และวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) (Leyssens *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซีส (capillary electrophoresis, CE) (Chevolleau & Tulliez, 1995) ในการวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ EIA เป็นวิธีที่ใช้ตรวจตัวอย่างเบื้องต้นเท่านั้นเพื่อยืนยันว่าตัวอย่างนั้นปลอดภัยสำหรับการบริโภคหรือไม่ แต่ไม่สามารถระบุหาปริมาณสารตกค้างนั้นได้ ส่วน GC-MS เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณสารตกค้างได้ละเอียด มีความเที่ยงและแม่นยำ แต่เทคนิคนี้ใช้เครื่องมือราคาแพงและใช้เวลาวิเคราะห์นานกว่าเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high-performance liquid chromatography, HPLC) (Zhang *et al.*, 2003; Posyniak *et al.*, 2003; López-Erroz *et al.*, 2000; Gigosos *et al.*, 1996; Mälkki & Tammi lehto, 1990; Botterblom *et al.*, 1993) HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมานานแล้ว เป็นวิธีวิเคราะห์ที่สะดวกและรวดเร็ว มีความแม่นและความเที่ยงสูง แต่ยังไม่มีการใช้วิเคราะห์สารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลพร้อมกันในตัวอย่างเนื้อสุกร ดังนั้นในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาและพัฒนาเทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์สารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น



ภาพที่ 1 *โครงสร้างโมเลกุลของซัลบูทามอล (SB) และเคลนบูเทรอล (CB)*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

สารเคมีทุกตัวใช้เกรดวิเคราะห์ ซัลบูทามอล (salbutamol, $C_{12}H_{19}NO_3.HCl$) และเคลนบูเทรอล (clenbuterol, $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O.HCl$) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา เมทานอล (methanol, CH_3OH) ซื้อจากบริษัท Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4) น้ำที่ใช้ในการทดลองคือน้ำปราศจากไอออนจากเครื่อง Water Purification System รุ่น EASYpure LF ของบริษัท Barnstead ประเทศเยอรมนี

ระบบโครมาโทกราฟี

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟของบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1050 ประเทศเยอรมนี ประกอบด้วย ปั๊ม Hewlett-Packard 1050 และ Photodiode Array 1050 วาล์ชนิด Rheodyne ปริมาตรฉีด 20 μL คอลัมน์วิเคราะห์คือ Hypersil BDS C18 มีขนาดอนุภาค 5 μm เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 mm ยาว 125 mm ของบริษัท Hewlett-Packard ประเทศเยอรมนี เฟสเคลื่อนที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ กันระหว่างสารละลายฟอสเฟตกับเมทานอล การชะสารเป็นแบบเกรเดียนที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอล ความเข้มข้น 100.0 mg/L เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานแต่ละตัว 0.0010 g ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 mL ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นอื่น ๆ เตรียมโดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นและเจือจางด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมตัวอย่าง

วิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อสุกรในการทดลองดัดแปลงจากวิธีของ Lawrence และคณะ (Lawrence & Menard, 1997) ดังนี้

ขั้นที่ 1 นำตัวอย่างเนื้อสุกร 500 g โดยตัดส่วนไขมันออก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ชั่งตัวอย่างหนัก 6 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 mL เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10.0 mM ปริมาตร 30 mL นำไปกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก 10 นาที

ขั้นที่ 2 นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในเครื่องอัลตร้าโซนิค 10 นาที นำออกมาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นน้ำและให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่ 80°C นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าพีเอชของสารละลายเท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase extraction

ขั้นที่ 3 การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีสกัดผ่านเฟสของแข็ง โดยใช้คอลัมน์ t-C_{18} ที่ปรับสภาพแล้วด้วยเมทานอลและน้ำกลั่นอย่างละ 3.0 mL จากนั้นผ่านสารละลายที่ได้จากขั้นที่ 2 ลงไปและชะด้วยเมทานอล 3.0 mL ระเหยเมทานอลจนหมดด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วละลายส่วนที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 1.0 mL และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลโดยเทคนิค HPLC นั้นเมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 mL/min ทำการตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 206 nm ในช่วงเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารถึง 7.0 นาที จากนั้นในช่วงเวลา 7.0-9.0 นาที ให้ตรวจวัดสัญญาณที่ 400 nm และหลังจาก 9.0 นาที เป็นต้นไปก็ให้ตรวจวัดสัญญาณที่ 206 nm เหมือนเดิม

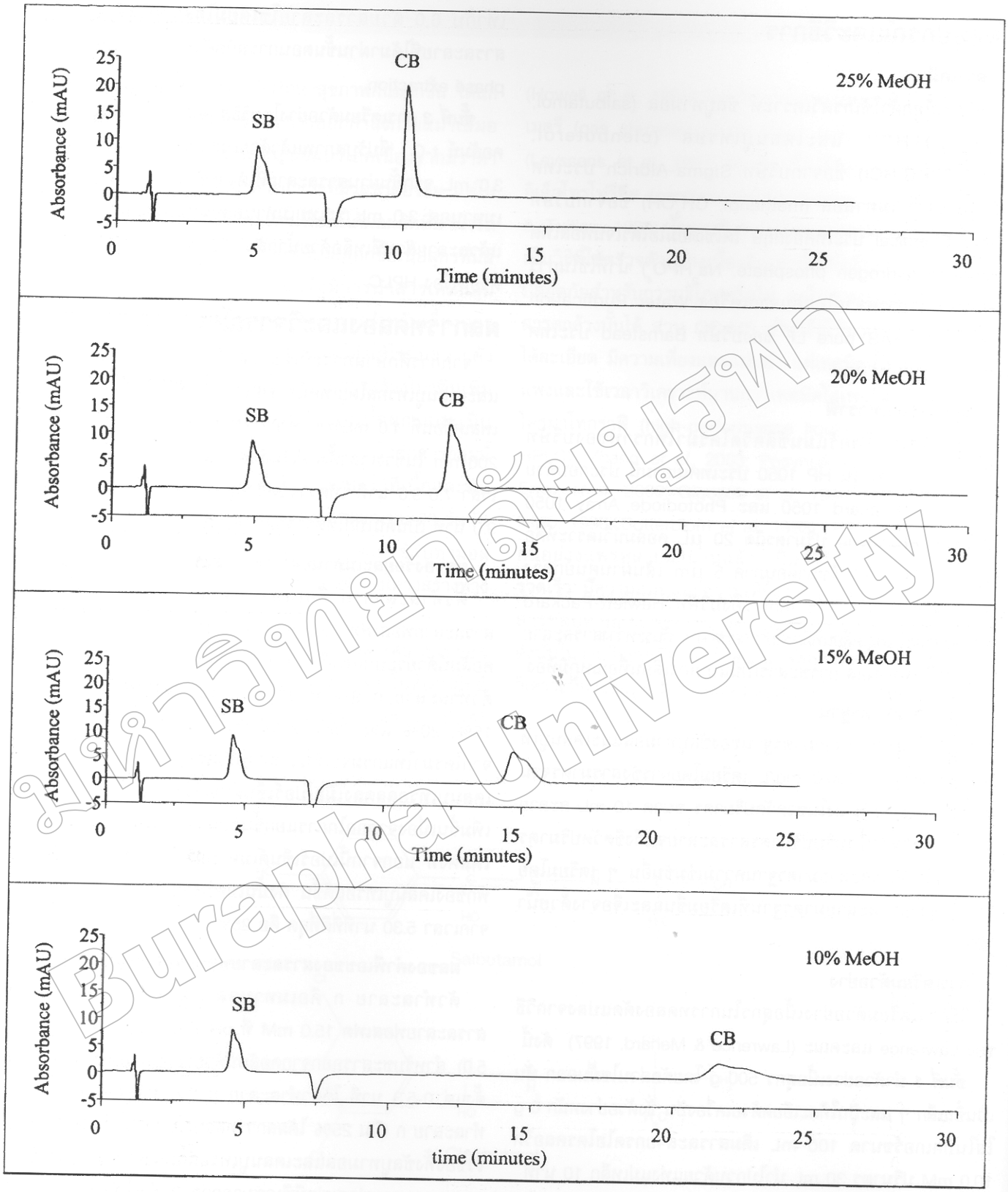
ผลของร้อยละเมทานอลในเฟสเคลื่อนที่

ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือสารละลายฟอสเฟต 15.0 mM (pH 3.0) สำหรับชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยระบบเกรเดียนโดยกำหนดเวลาตั้งแต่ 0-5.3 นาที ใช้ตัวทำละลาย ก 9% หลังจากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลาย ก เป็น 15%, 20% และ 25% ตามลำดับ ได้ผลการทดลองใน**ภาพที่ 2** จากโครมาโทแกรมจะเห็นว่าสภาพไวและค่ารีเทนชันไทม์ของสารเคลนบูเทรอลลดลงเมื่อเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากกลไกการแยกขึ้นกับการพาร์ติชันระหว่างสารกับเฟสคงที่ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์เมทานอลที่เพิ่มขึ้นยังทำให้รูปร่างพีกของเคลนบูเทรอลดีขึ้น ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก หลังจากเวลา 5.30 นาทีที่ดีที่สุด คือ 25%

ผลของค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตในเฟสเคลื่อนที่

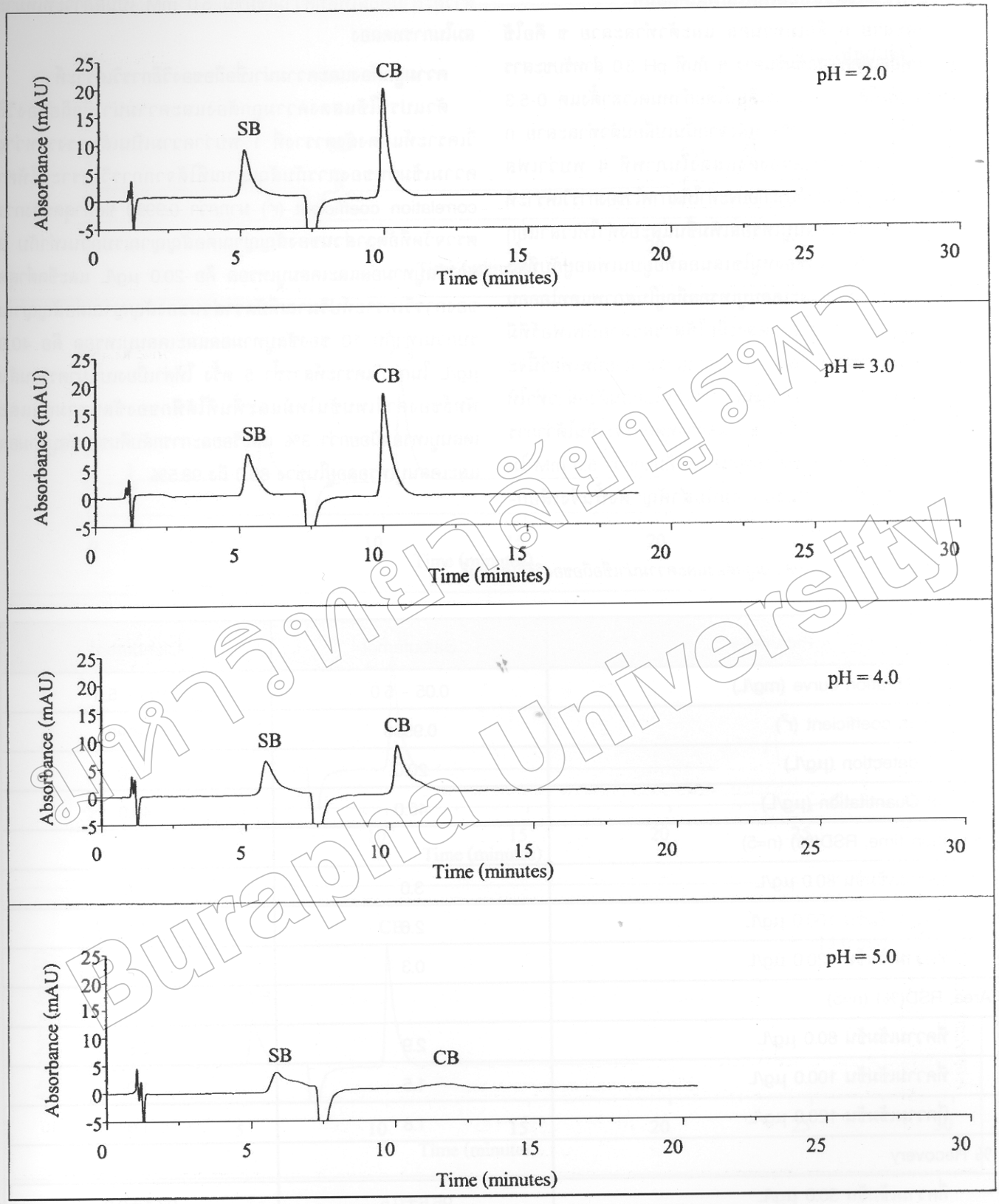
ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือสารละลายฟอสเฟต 15.0 mM ที่ pH ต่าง ๆ (2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0) สำหรับชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยระบบเกรเดียนโดยกำหนดตั้งแต่ 0-5.3 นาที ใช้ตัวทำละลาย ก 9% หลังจากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลาย ก เป็น 25% ได้ผลการทดลองในภาพที่ 3 พบว่าสภาพไวของทั้งซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลลดลงอย่างมากเมื่อพีเอชของสารละลายฟอสเฟตมีพีเอชมากกว่า 3 ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารกับหมู่ไซเลนอลบนเฟสอยู่กับที่ลดลงที่ pH ต่ำ ดังนั้นค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทดลองคือ pH 3.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 2 *ผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของซัลบูทามอล (SB) และเคลนบูเทรอล (CB)*



ภาพที่ 3 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของซัลบูทามอล (SB) และเคลนบูเทรอล (CB)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลของความเข้มข้นฟอสเฟตในเฟสเคลื่อนที่

ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือใช้สารละลายฟอสเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่ pH 3.0 สำหรับชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยระบบเกรเดียนโดยกำหนดเวลาตั้งแต่ 0-5.3 นาที ใช้ตัวทำละลาย ก 9% หลังจากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลาย ก เป็น 25% ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบจะทำให้สภาพไวของการวิเคราะห์สารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลเพิ่มขึ้นและยังทำให้เวลาแยกสั้นลง ทั้งนี้เนื่องจากผลของหมู่ไซเลนอลที่อยู่บนเฟสอยู่กับที่จะช่วยยึดสารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลที่อยู่ในสภาพแคทไอออนซึ่งผลของหมู่ไซเลนอบนี้จะลดลงเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมซึ่งแคทไอออนจากสารละลายบัฟเฟอร์นี้จะเข้ายึดติดแทนสารตัวอย่างที่อยู่ในสภาพแคทไอออนดังกล่าวทำให้สารนั้นเคลื่อนที่ออกมาเร็วขึ้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตในเฟสเคลื่อนที่มากกว่า 5.0 mM ไม่ทำให้สภาพไวเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกสารละลายฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 5.0 mM เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

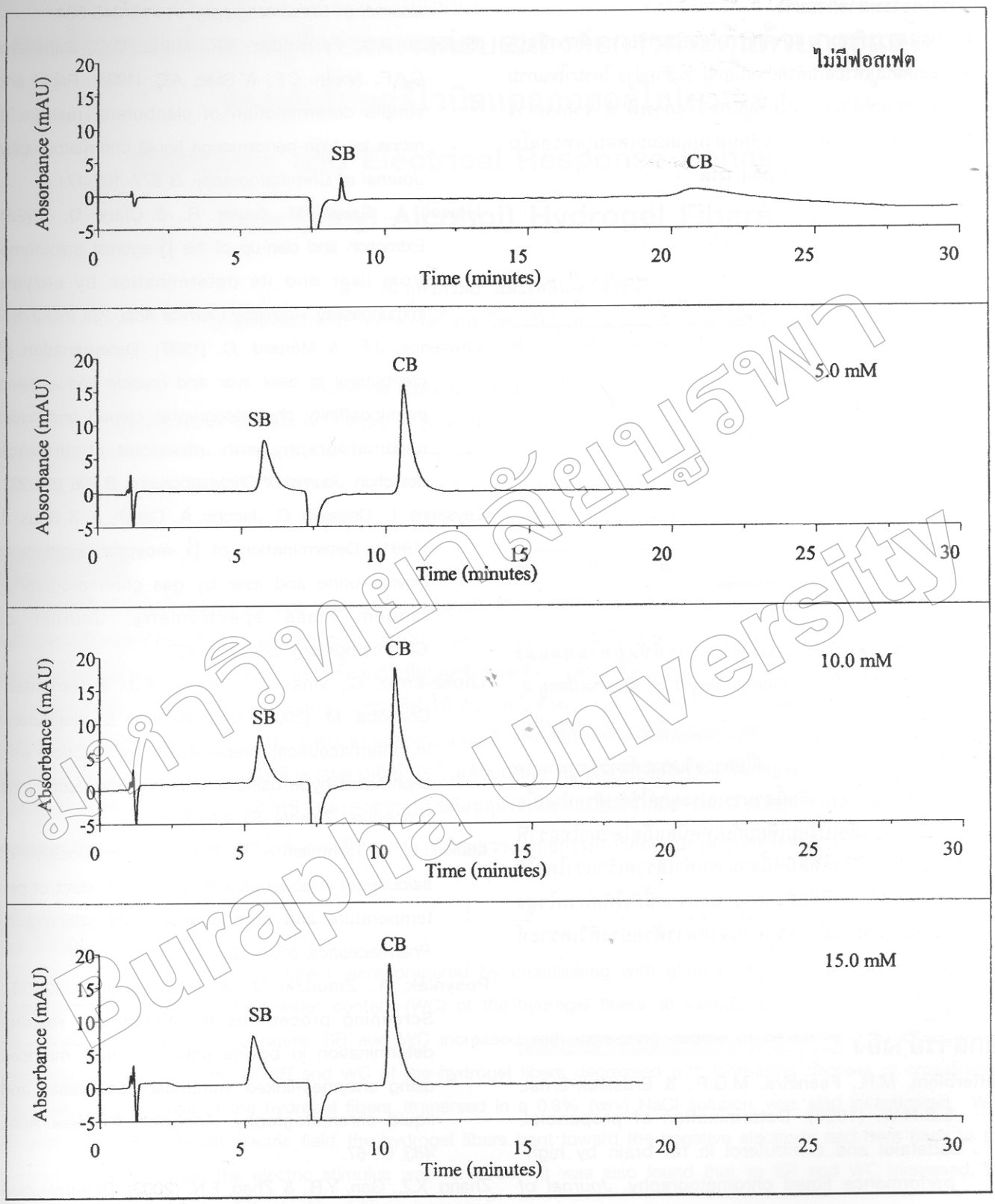
ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์

ตัวแปรที่ใช้แสดงความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ให้ค่า correlation coefficient (r^2) มากกว่า 0.9990 ขีดต่ำสุดของการตรวจวัดที่อัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 ของซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอล คือ 20.0 μg/L และขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณที่อัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 10 ของซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอล คือ 40.0 μg/L ในการวิเคราะห์สารซ้ำ 5 ครั้ง ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่ารีเทนชันไทม์และพื้นที่ใต้พีกของซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลน้อยกว่า 3% และร้อยละการกลับคืนของซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลอยู่ในช่วง 86.0 ถึง 98.5%

ตารางที่ 1 *ผลการตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์*

Parameter	Salbutamol	Clenbuterol
Linear calibration curve (mg/L)	0.05 - 5.0	0.05 - 5.0
Correlation coefficient (r^2)	0.9998	0.9998
Limit of detection (μg/L)	20.0	20.0
Limit of Quantitation (μg/L)	40.0	40.0
Retention time, RSD(%) (n=5)		
ที่ความเข้มข้น 80.0 μg/L	3.0	1.6
ที่ความเข้มข้น 100.0 μg/L	2.6	1.0
ที่ความเข้มข้น 120.0 μg/L	0.3	0.1
Area, RSD(%) (n=5)		
ที่ความเข้มข้น 80.0 μg/L	2.9	2.8
ที่ความเข้มข้น 100.0 μg/L	1.5	1.0
ที่ความเข้มข้น 120.0 μg/L	1.8	1.0
% Recovery		
ที่ความเข้มข้น 50.0 μg/L	96.6±0.5	97.1±0.9
ที่ความเข้มข้น 80.0 μg/L	98.5±0.3	86.0±0.4
ที่ความเข้มข้น 120.0 μg/L	88.2±1.4	92.3±0.2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

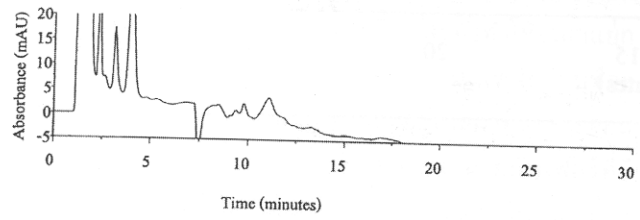


ภาพที่ 4 ผลของความเข้มข้นฟอสเฟตในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของซัลบูทามอล (SB) และเคลนบูเทรอล (CB)

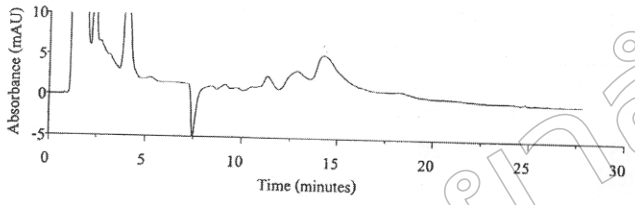
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองมาวิเคราะห์สารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลในตัวอย่างเนื้อหมู 2 ตัวอย่าง โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อหมูแสดงดัง**ภาพที่ 5** จากผลการตรวจวิเคราะห์พบว่าไม่พบสารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลในตัวอย่างเนื้อหมูทั้ง 2 ตัวอย่างแต่อย่างใด



(ก)



(ข)

ภาพที่ 5 *โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลใน (ก) ตัวอย่างเนื้อหมู 1 (ข) ตัวอย่างเนื้อหมู 2*

สรุป

วิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลในงานวิจัยนี้สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเนื้อหมูได้เป็นอย่างดี เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแล้ว การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้สามารถทำได้รวดเร็วกว่าโดยใช้เวลาประมาณ 10 นาทีต่อตัวอย่าง นอกจากนี้ยังให้สภาพไวสูงและการแยกดี และไม่มีการรบกวนจากสารตัวอย่างที่วิเคราะห์อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Botterblom, M.H., Feenstra, M.G.P., & Erdsieck-Ernst, E.B.H.W. (1993). Determination of propanolol, labetalol and clenbuterol in rat brain by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, A 613, 121-123.

Chevolleau, S., & Tulliez, J. (1995). Optimization of the separation of β-agonist by capillary electrophoresis on untreated and C_{18} bonded silica capillaries. *Journal of Chromatography, A 715*, 345-354.

Gigosos, P.G., Fernández, T.F., MarÍz, O.C., Sampayo, C.A.F., AbuÍn, C.F., & Sáez, A.C. (1996). Rapid and simple determination of clenbuterol residue in retina by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, B 677*, 167-171.

Howell, L., Sauer, M., Sayer, R., & Clark, D. (1993). Extraction and clen-up of the β-agonist salbutamol from liver and its determination by enzyme immunoassay. *Analytical Chimica Acta, 275*, 275-278.

Lawrence, J.F., & Ménard, C. (1997). Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic clenup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography, B 696*, 291-297.

Leyssens, L., Driessen, C., Jacobs, A., Czech, J., & Raus, J. (1991). Determination of β_2-recepter agonists in bovine urine and liver by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 564, 515-527

López-Erroz, C., Vinas, P., Cerdán, F.J., & Hernndez-Córdoba, M. (2000). Determination of clenbuterol in pharmaceutical preparations by reaction with *o*-phthaladehyde using a flow-injection fluorimetric procedure. *Talanta, 53*, 47-53.

Mälkki, L., & Tammilehto, S. (1990). Decomposition of salbutamol in aqueous solution. I. The effect of pH, temperature and drug concentration. *Journal of Pharmaceutics, 63*, 17-22.

Posyniak, A., Zmudzki, J., & Niedzielska, J. (2003). Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzymes-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Analytical Chimica Acta, 483*, 61-67.

Zhang, X.Z., Gan, Y.R., & Zhao, F.N. (2003). Determination of clenbuterol in pig liver by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. *Analytical Chimica Acta, 489*, 95-101.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University