ประสิทธิภาพของ *Escherichia coli* DH5α λpir ที่เป็นดัชนีของชุดตรวจฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์

ว่าที่ร้อยตรี หทัยทิพย์ ศรีสวัสดิ์กุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFICIENCY OF *Escherichai coli* DH5α λpir INDEX OF FURAZOLIDONE DETECTION KIT IN FEED

Acting Second Lieutenant Hataithip Srisawatkun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

532171

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของ *Escherichia coli* DH5α λpir ที่เป็นดัชนีของชุดตรวจฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์
โดย	ว่าที่ร้อยตรี หทัยทิพย์ ศรีสวัสดิ์กุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

รองคณ บดีฝ่ายบริหารรักษาการแทน
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลวรรณ พิมพ์พันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิววรรณ พูลพันธุ์)

หทัยทิพย์ ศรีสวัสดิ์กุล : ประสิทธิภาพของ *Escherichia coli* DH5α λpir ที่เป็นดัชนีในชุดตรวจยาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ (EFFICIENCY OF *Escherichai coli* DH5α λpir INDEX OF FURAZOLIDONE DETECTION KIT IN FEED) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, 130 หน้า.

ฟูราโซลิโดนเป็นยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคทางเดินอาหารในสัตว์ โดยที่ฟูราโซลิโดนจะตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์และเมื่อมนุษย์นำมาบริโภคอาจนำไปสู่สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งได้ ดังนั้นประเทศไทยและกลุ่มประเทศยุโรปจึงประกาศห้ามใช้ยาชนิดนี้กับสัตว์ชนิดต่างๆ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาชุดตรวจฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ โดยใช้ *Escherichia coli* DH5α λpir ระดับความเข้มข้น 10^6 CFU/ml พบว่าค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ตรวจได้ คือ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีนี้สามารถติดตามฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ ได้แก่ อาหารไก่เล็ก อาหารไก่ใหญ่ อาหารกุ้ง ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อชุดตรวจสอบ คือ 37 องศาเซลเซียสและอ่านผลได้ที่ 24 ชั่วโมง จากการศึกษาปัจจัยของชุดตรวจ ได้แก่ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อชุดตรวจสอบ ความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม พบว่าในอาหารสัตว์มีส่วนประกอบของสารอาหารที่พอเพียงต่อการเจริญของเชื้อ จึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง pH 4-7 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของเชื้อ และสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลา 1 เดือนที่ 4 องศาเซลเซียส โดยมีค่าความแม่นยำ (relative accuracy) 90.3 % ความไว (relative sensitivity) 84.4 % ความจำเพาะ (relative specificity) 97.5 % และมีค่า Kappa coefficient (k) เท่ากับ 0.77 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่ามีค่าการยอมรับหรือมีความน่าเชื่อถือในระดับดี

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....หทัยทิพย์ ศรีสวัสดิ์กุล.....

สาขาวิชา....จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2553.....

4972611223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : nitrofuran group / furazolidone / test kit / feed

HATAITHIP SRISAWATKUN : EFFICIENCY OF *ESCHERICHIA COLI* DH5α λPIR INDEX OF FURAZOLIDONE DETECTION KIT IN FEED. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANON, Ph.D., 130 pp.

Furazolidone is a widely used antibacterial veterinary drug, effective in the prevention and treatment of gastro-intestinal infections. The occurrence of residues of furazolidone in animal tissue intended for human consumption is of major concern in view of its reported mutagenic and carcinogenic effects. Therefore, the use of furazolidone in food producing animals is banned in Thailand and the European Union (EU). In this work, Furazolidone detection kit in feed by using *Escherichia coli* DH5α λpir at 10^6 CFU/ml has the limit of detection is 0.3 µg/ml. The method was based on the analysis in animal feed and could be applied as small chicken feed, large chicken feed and shrimp feed persisting for 24 hours. The study focused on the factors of the detection kit is carbon source, acidity and temperature .In animal feed it has nutrition for bacteria growth without adding carbon source. Acidity range was optimized in pH4-7. And optimized temperature was 37 ^{o}C. Shelf life of detection kit was limited at 1 months at 4^{o}C. relative accuracy 90.3%, relative sensitivity 84.4%, relative specificity 97.5% and Kappa co-efficiency (k) = 0.77 in premixes 95% respectively value good agreement.

Department : Microbiology Student's Signature Hataithip Srisawatkun

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature C. Kositanont

Academic Year : 2010

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีนและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิววรรณ พูลพันธ์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา ที่คอยให้คำปรึกษา-คำแนะนำ พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนอุดหนุนการศึกษา จากกองทุนบัณฑิตวิทยาลัย สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ และห้องวิจัย 405 ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณคณะบัณฑิตวิทยาลัย สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย รวมทั้งเครื่องมือทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องวิจัย 453 ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง ญาติๆ ทุกคน เพื่อนๆ และรุ่นพี่ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง..... ..... ฑ

สารบัญภาพ..... ต

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... บ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 6

2.1 สารพิษตกค้างในเนื้อสัตว์สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 7

2.1.1 สารต้านจุลชีพ และสารเร่งการเจริญเติบโต.....7

2.1.2 ฮอร์โมนและฮอร์โมนสังเคราะห์ 7

2.1.3 โลหะหนัก 8

2.1.4 ยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าเชื้อรา และยาฆ่าแมลง 8

2.1.5 สารเจือปนในอาหาร.....8

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารต้านจุลชีพ..... 9

2.2.1 คุณสมบัติของสารต้านจุลชีพ.....9

2.2.1.1 สารที่สามารถฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์..... 9

2.2.1.2 สารที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ 9

2.2.2 การแบ่งสารต้านจุลชีพมีได้โดยแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ 10

2.2.2.1.พวกออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ 10

2.2.2.2. พวกออกฤทธิ์รบกวนการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์..... 10

2.2.2.3. พวกออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค..... 10

2.2.2.4. พวกออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน..... 11

2.2.2.5. พวกออกฤทธิ์รบกวนเมตาบอลิสม..... 11

2.3 ความเป็นมาและสภาพปัญหาของสารต้านจุลชีพตกค้าง..... 12

2.4 การใช้สารต้านจุลชีพในอาหารสัตว์ 13

2.5 ผลเสียที่อาจเกิดขึ้นต่อสุขภาพของผู้บริโภคเนื้อสัตว์ที่มีสารต้านจุลชีพตกค้าง... 14

2.5.1 ทำให้เกิดการแพ้ยา 14

2.5.2 เกิดการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ 15

2.5.3. สารต้านจุลชีพมีผลทำให้เกิดมะเร็ง..... 15

2.6 สารไนโตรฟูแรน 16

2.7 ฟูราโซลิโดน 17

2.7.1 ข้อมูลทางชีวภาพ 17

2.7.2 เมแทบอไลซ์ของฟูราโซลิโดน 18

2.7.3 กลไกการทำงานของสารฟูราโซลิโดน 19

2.7.3.1 การยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส 19

2.7.3.2 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 20

2.7.4 ผลกระทบของฟูราโซลิโดน 20

2.7.4.1 ผลกระทบต่อมหมวกไต และต่อมไธรอยด์ 20

2.7.4.2 ผลกระทบต่ออนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ 21

2.7.4.3 ผลกระทบต่อการกลายพันธุ์ 21

2.8 ผลกระทบจากการใช้ฟูราโซลิโดนในการรักษาโรคสัตว์ และสัตว์น้ำ 22

2.8.1 ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต 22

2.8.1.1 ผลกระทบต่อสัตว์และมนุษย์ 22

2.8.1.2 ผลกระทบต่อจุลินทรีย์ 23

2.8.2 ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม 24

2.8.3 ผลกระทบต่อเศรษฐกิจ 24

2.9 การวิเคราะห์ฟูราโซลิโดน 25

2.9.1 การตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดน และอนุพันธ์ของสาร AOZ ด้วยวิธีทางเคมี

..... 25

2.9.1.1 Thin Layer Chromatography (TLC)..... 25

2.9.1.2 High Performance Layer Chromatography (HPLC) 26

2.9.1.3 Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) 27

2.9.2 การตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของสาร AOZ ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา 28

2.9.3 การตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนโดยการทำให้เกิดสี 28

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 30

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 33

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 33

3.2 เคมีภัณฑ์..... 34

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 35

3.4 การเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ 35

แผนผังงานวิจัย..... 36

การดำเนินงานวิจัย 37

3.5 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร..... 37

3.6 ยืนยันและหาความแม่นยำต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ 38

3.7 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบ 42

3.7.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อชุดทดสอบโดยการใช้กลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 42

3.7.2 ผลของอุณหภูมิและค่าพีเอช ที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบ 43

3.8 ผลวิเคราะห์ความแม่นยำของค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ในชุดตรวจสอบโดยใช้อาหารสัตว์ 43

3.9 ผลการยืนยันความแม่นยำของฟูราโซลิโดนโดยใช้ *E.coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง 44

3.10 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบจากการใช้ตรวจสอบอาหารสัตว์เปรียบเทียบกับวิธี UV-Visible spectrophotometry 46

3.11 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 51

3.12 ทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษาชุดตรวจสอบเป็นระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9 เดือนที่เก็บในสภาพอุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส 53

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 54

4.1 ผลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ *E.Coli* DH5αλpir เป็นที่นับได้ (CFU/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600nm 55

4.2 ความเข้มข้นต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้..... 56

4.3 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบ 59

4.3.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อชุดทดสอบโดยการใช้กลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน 59

4.3.2 ผลของอุณภูมิและค่าพีเอช ที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบ.... 62

4.4 ผลวิเคราะห์ความแม่นยำของค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ในชุดตรวจสอบโดยใช้อาหารสัตว์ 69

4.5 ผลการยืนยันความแม่นยำของฟูราโซลิโดนโดยใช้ *E.coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง 72

4.6 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบจากการใช้ตรวจสอบอาหารสัตว์เปรียบเทียบกับวิธี UV-Visible spectrophotometry 73

4.7 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 77

4.8 ทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษาชุดตรวจสอบเป็นระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9 เดือนที่เก็บในสภาพอุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส 83

5. สรุปผลการทดลอง..... 88

5.1 สรุปผลการศึกษา 88

5.2 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย 91

รายการอ้างอิง..... 92

ภาคผนวก 97

ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 98

ภาคผนวก ข สูตรอาหารสัตว์ กุ้ง ไก่เล็ก ไก่ใหญ่ และสุกร 99

ภาคผนวก ค สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 108

ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน 110

ภาคผนวก จ ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานฟูราโซลิโดน

ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.01-10 ppm 124

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 130

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 การตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของสาร AOZ ด้วยวิธีทางเคมี 27

3.1 แสดงอัตราส่วนประกอบที่ใช้ในชุดตรวจสอบ..... 40

3.2 แสดงตำแหน่งหาความแม่นยำต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λ*pir* ทนได้ ในถาดหลุมพลาสติก.....41

3.3 แสดงอัตรส่วนประกอบที่ใช้ในชุดตรวจสอบโดยแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส และซูโครส..... 42

3.4 แสดงอัตรส่วนประกอบที่ใช้ในชุดตรวจสอบโดยใช้อาหารสัตว์ 44

3.5 แสดงการเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีทาง UV-Visible spectrophotometry กับชุดตรวจสอบเพื่อตรวจหาค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบโดยใช้ *E.coli* DH5α λpir เป็นดัชนีที่พัฒนาขึ้น 52

4.1 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ หลังผ่านการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 57

4.2 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของชุดตรวจสอบอาหารสัตว์โดยใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร 70

4.3 แสดงผลการตรวจฟูราโซลิโดนใน spiked samples ด้วยชุดตรวจสอบ 77

4.4 ผลที่ให้ผลบวกจริง (True positives) และปริมาณยาที่ตรวจพบ ของฟูราโซลิโดน ในอาหารสัตว์ระหว่างการตรวจด้วยชุดตรวจสอบและวิธี UV-Visible spectrophotometry 78

4.5 แสดงการเปรียบเทียบผลตรวจฟูราโซลิโดนในอาหารกุ้งระหว่างวิธีทาง UV-Visible spectrophotometry กับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น..... 79

ตารางที่ หน้า

4.6 แสดงการเปรียบเทียบผลตรวจฟูราโซลิโดนในอาหารไก่เล็กระหว่างวิธีทาง UV-Visible spectrophotometry กับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น 79

4.7 แสดงการเปรียบเทียบผลตรวจฟูราโซลิโดนในอาหารไก่ใหญ่ระหว่างวิธีทาง UV-Visible spectrophotometry กับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น..... 80

4.8 แสดงผลรวมการเปรียบเทียบผลตรวจฟูราโซลิโดนในอาหารกุ้ง ไก่เล็กและไก่ใหญ่ระหว่างวิธีทาง UV-Visible spectrophotometry กับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น 81

ตารางที่ หน้า

ข-1 แสดงความต้องการโภชนะของไก่ไข่..... 99

ข-2 แสดงความต้องการโภชนะของไก่เนื้อ..... 100

ข-3 แสดงความต้องการโภชนะของสุกร 101

ข-4 แสดงสูตรอาหารกุ้ง 102

ข-5 แสดงวิตามินที่ใช้ผสมในอาหารกุ้งทะเลจำนวน 1 ตัน 103

ข-6 แสดงสูตรอาหารไก่เล็กอายุ 0-6 สัปดาห์ 104

ข-7 แสดงสูตรอาหารไก่เนื้อ..... 106

ข-8 แสดงสูตรอาหารสุกร 107

ง-1 แสดงผลการศึกษาการละลายของฟูราโซลิโดน..... 110

ง-2 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเจริญของ *E.coli* DH5α λpir กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร..... 111

ง-3 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ *E.coli* DH5α λpir กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร..... 114

ง-4 กราฟแสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *E.Coli* DH5α λpir ที่ความเข้มข้น 10^6 CFUต่อมิลลิลิตรกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600นาโนเมตร ในหลอดทดลอง 116

ง-5 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบโดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร..... 118

ง-6 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของชุดตรวจสอบอาหารกุ้งโดยใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..... 119

ง-7 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของชุดตรวจสอบอาหารไก่เล็กโดยใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..... 120

ง-8 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของชุดตรวจสอบอาหารไก่ใหญ่โดยใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..... 121

ง-9 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของชุดตรวจสอบอาหารหมูโดยใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..... 122

ง-10 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของชุดตรวจสอบอาหารสัตว์โดยใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..... 123

จ-1 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานฟูราโดนโดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometry..... 124

จ-2 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายฟูราโดนในอาหารกุ้งโดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometry..... 125

จ-3 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายฟูราโดนในอาหารไก่เล็กโดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometry..... 126

จ-4 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายฟูราโดนในอาหารไก่ใหญ่โดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometry..... 127

จ-5 ผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายฟูราโดนในอาหารหมูโดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometry..... 128

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารฟูราโซลิโดน 2

1.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิโดน 3

2.1 โครงสร้างของสารไนโตรฟูแรนและเมแทบอไลซ์ของสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน 16

2.2 แสดงสูตรโครงสร้างของฟูราโซลิโดน (FZ) 17

2.3 แสดงเมแทบอไลซ์ของฟูราโซลิโดนในสุกร 18

2.4 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของสารฟูราโซลิโดน 25

2.5 แสดงการเปลี่ยนอนุพันธ์ของฟูราโซลิโดน เพื่อใช้วิเคราะห์ HPLC 26

2.6 รูปแสดงโครงสร้างและปฏิบัติการรีดักชันของTTC 30

3.1 แสดงการเจือจาง *E.Coli* DH5α λpir ใน normal saline..... 37

3.2 แสดงถาดหลุมพลาสติก 38

3.3 แสดงสารฟูราโซลิโดนที่ใช้ในการวิจัย 39

3.4 แสดง2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ที่ใช้ในการวิจัย..... 39

3.5 แสดงเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ รุ่น ELX 800 ที่ใช้ในการวิจัย 41

3.6 แสดงเครื่อง Lyophilization 46

3.7 แสดงเครื่อง UV-Visible spectrophotometry 46

3.8 แสดงตัวอย่างอาหารกุ้งที่ใช้ในการทดลอง 47

3.9 แสดงตัวอย่างอาหารไก่เล็กที่ใช้ในการทดลอง 48

รูปที่ หน้า

3.10 แสดงตัวอย่างอาหารไก่ใหญ่ที่ใช้ในการทดลอง..... 49

3.11 แสดงตัวอย่างอาหารหมูที่ใช้ในการทดลอง 50

4.1 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร...55

4.2 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในหลอดทดลอง..... 56

4.3 กราฟแสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *E.Coli* DH5α λpir ที่ความเข้มข้น 10^6 CFUต่อมิลลิลิตรกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600นาโนเมตร ในหลอดที่มีฟูราโซลิโดนเข้มข้น 0.1-1.0 ppm..... 58

4.4 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อชุดทดสอบกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร.....59

4.5 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบโดยการใช้กลูโคส1–10%เป็นแหล่งคาร์บอนกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร..... 60

4.6 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบโดยการใช้กซูโครส1–10%เป็นแหล่งคาร์บอนกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร..... 62

4.7 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 4 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 63

4.8 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 5 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 63

4.9 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 6 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 64

รูปที่ หน้า

4.10 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 7 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 64

4.11 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 4 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมง..... 65

4.12 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 5 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมง..... 65

4.13 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 6 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมง..... 66

4.14 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 7 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมง..... 66

4.15 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 4 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 67

4.16 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 5 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 67

4.17 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 6 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 68

4.18 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบที่ pH 7 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 68

รูปที่ หน้า

4.19 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแม่นยำต่ำสุดของฟูราโซลิโดนโดยทดสอบด้วยอาหารสัตว์กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร..... 69

4.20 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งทนได้..... 72

4.21 แสดงผลการหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานฟูราโดนที่ความเข้มข้นในช่วง 10 ppm.....73

4.22 แสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานฟูราโดนที่ 365 นาโนเมตรโดยใช้ UV-Visible spectrophotometry..... 74

4.23 แสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานฟูราโดนที่ 365 นาโนเมตรในอาหารกุ้งโดยใช้ *UV-Visible spectrophotometry*..... 75

4.24 แสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานฟูราโดนที่ 365 นาโนเมตรในอาหารหมูโดยใช้ UV-Visible spectrophotometry 75

4.25 แสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานฟูราโดนที่ 365 นาโนเมตรในอาหารไก่เล็กโดยใช้ UV-Visible spectrophotometry.....76

4.26 แสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายมาตรฐานฟูราโดนในอาหารไก่ใหญ่ที่ 365 นาโนเมตรโดยใช้ UV-Visible spectrophotometry..... 76

4.27 แสดงประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบหลังการเก็บรักษา 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9 เดือน..... 83

4.28 แสดงประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบหลังการเก็บรักษา 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9 เดือน..... 84

รูปที่ หน้า

4.29 แสดงผลวิเคราะห์ความแม่นยำของค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ตรวจได้จากตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบหลังการเก็บรักษา *E.coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9..... 85

4.30 แสดงผลวิเคราะห์ความแม่นยำของค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ตรวจได้จากตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบหลังการเก็บรักษา *E.coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9..... 86

ง-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาการเจริญของ *E.coli* DH5α λpir กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร..... 113

ง-2 แสดงการเกิดสีของ TTC ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBโดยเชื้อ *E.coli* DH5α λpir เมื่อผ่านการบ่มที่ 37 องศาเซลเซสที่ 12 24 และ 48 ชั่วโมง 117

จ-1 แสดงผลการยืนยันค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.coli* DH5α λpir ทนได้ในถาดหลุมทดสอบ... 129

คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

AOZ	3-amino-2-oxazolidinone
FZ	Furazolidone
GC	Gas Chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
LC-MS-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy-Mass Spectroscopy
MRPL	Minimum Required Performance Limits
ppb	Part per billion
ppm	Part per million
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultraviolet