บทที่ 4

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

จากขั้นตอนและวิธีการดำเนินการศึกษาที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ในบทนี้จะได้แสดงผลการศึกษาการพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์ ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก โดยจะแสดงผลการทดลองได้ตามลำดับขั้นดังนี้

1. ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยวิธีต่างๆ ที่สภาวะเหมาะสม
2. การตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน
3. การสร้างแถบสีมาตรฐาน
4. การเปรียบเทียบการเกิดสีของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน
5. การตรวจสอบความใช้ได้ (Validation) และประเมินผลชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างชนิดต่างๆ เทียบกับเทคนิค HPLC
6. การศึกษาการเกิดสีกับสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ชนิดต่างๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน
7. การศึกษาสิ่งที่รบกวน ที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบ
8. การปรับปรุง แก้ไข ข้อผิดพลาดที่อาจมีขึ้น เช่น กรณีพบผลบวกลวง (False positive)

4.1 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยวิธีต่างๆ ที่สภาวะเหมาะสม

4.1.1 ผลการทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยตรงกับสารกลุ่มไนโตรฟูแรน โดยเลือกใช้ Solvent และ Complexing agent ที่เหมาะสม

4.1.1.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารกลุ่มไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด โดยใช้ Dimethylsulfoxide (DMSO), Dimethylformamide (DMF), Methanol, Acetronitrile และ Ethylacetate ตามลำดับ

ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาหาตัวทำละลายที่สามารถละลายไนโตรฟูแรนได้ดีที่สุด ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงความสามารถในการละลายสารไนโตรฟูแรนของ DMSO, DMF, Methanol, Acetronitrile และ Ethylacetate ตามลำดับ

No.	สารตัวอย่าง 0.1 mg	ชนิดของ Solvent				
		DMSO	DMF	Methanol	Acetronitrile	Ethylacetate
1	Nitrofurazone	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดี	ไม่ละลาย
2	Nitrofurantoin	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดี	ไม่ละลาย
3	Furazolidone	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดี	ไม่ละลาย
4	Furaltadone	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี	ละลายได้ค่อนข้างดี	ละลายได้ค่อนข้างดี	ไม่ละลาย

เนื่องจากสารกลุ่มไนโตรฟูแรนไม่ละลายน้ำเพราะฉะนั้นจึงต้องหาตัวทำละลายที่ดีที่สุดที่จะสามารถละลายสารไนโตรฟูแรนได้ จึงเลือกใช้สาระลายทั้ง 5 ชนิดข้างต้นซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดีมาทำการทดลอง ซึ่งจากการทดลองดังตารางตารางที่ 4.1 สรุปได้ว่า DMSO และ DMF เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด เพราะสามารถละลายสารไนโตรฟูแรนได้ดีทั้ง 4 ชนิด รองลงมา คือ Acetronitrile และ Methanol ตามลำดับ ส่วน Ethylacetate นั้น เป็นตัวทำละลายที่ไม่ควรเลือกใช้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือก DMSO, DMF, Methanol และ Acetronitrile มาใช้เพื่อหา Reagent ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา
คัลเลอริเมตริกต่อไป

4.1.1.2 ผลการศึกษาการเกิดสีโดยใช้ DMSO, DMF, Methanol และ Acetronitrile เป็นตัวทำละลาย และใช้ร่วมกับ Ethanolic Potassiumhydroxide (KOH/EtOH) เป็น Complexing agent

ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาเพื่อหา Solvent และ Complexing agent ที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีได้ดีที่สุด และสีที่เกิดขึ้นต้องสามารถบ่งชี้ชนิดของสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดได้

ตารางที่ 4.2 แสดงสีที่เกิดขึ้นของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนโดยใช้ Solvent ชนิดต่างๆและ KOH/EtOH

No.	สารตัวอย่าง 0.1 mg	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น			
		DMSO	DMF	Methanol	Acetronitrile
1	Nitrofurazone				
2	Nitrofurantoin				
3	Furazolidone				
4	Furaltadone				
5	Blank	ไม่เปลี่ยนแปลง			

จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าการทดลองที่ใช้ DMF และ DMSO เป็นตัวทำละลายจะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสามารถละลายสารกลุ่มไนโตรฟูแรนได้ดี ซึ่งจะสังเกตได้จากการทดลองที่ใช้ DMF และ DMSO เป็นตัวทำละลายจะให้สีของสารละลายตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดได้แตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งดีกว่าตัวทำละลายอื่นๆที่ให้สีของสารไนโตรฟูแรนบางตัวได้ใกล้เคียงกันมาก อาจจะเป็นผลทำให้การวิเคราะห์ผลเกิดการผิดพลาดได้ ส่วนการทดลองที่ใช้ Acetronitrile เป็นตัวทำละลายนั้นให้สีใกล้เคียงกับ DMF แต่ความเข้มของสีไม่ชัดเจนเท่ากับการทดลองที่ใช้ DMF และ DMSO อีกทั้งสารละลายที่เกิดขึ้นจะขุ่นมีตะกอน ส่วนในการทดลองที่ใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย นอกจากจะไม่สามารถแยกสีออกจากกันได้ชัดเจนแล้ว สารละลายที่เกิดขึ้นมีลักษณะขุ่นมีตะกอน ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสารไนโตรฟูแรนละลายใน Methanol ได้ค่อนข้างน้อย เพราะฉะนั้น DMF และ DMSO จึงเป็น Solvent ที่เหมาะสมที่สุด เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า

ดังนั้นจึงมีการยืนยันผลการทดลองด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer โดยเลือกตัวทำละลายที่ให้สีชัดเจนที่สุด คือ DMSO กับ DMF มาทำการทดลองต่อเท่านั้น เพราะการทดลองที่ใช้ Methanol และ Acetronitrile เป็นตัวทำละลาย สารละลายที่ได้มีลักษณะขุ่นมีตะกอนไม่สามารถนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงได้ ผลการวัดแสดงได้ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุด และ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 20 ppm โดยใช้ DMSO และ DMF เป็นตัวทำละลาย ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

สารละลายมาตรฐาน 20 ppm	DMSO		DMF	
	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
NFZ	560.0	1.314	540.0	1.413
NFT	349.0	0.618	480.0	0.646
FZD	598.0	1.039	580.0	1.179
FTD	600.0	0.310	596.0	0.794

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

หมายเหตุ : NFZ คือ Nitrofurazone, NFT คือ Nitrofurantoin, FZD คือ Furazolidone, FTD คือ Furaltadone

จากตารางที่ 4.3 พบว่า การทดลองที่ใช้ DMF เป็นตัวทำละลาย ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดที่ดีกว่า การทดลองที่ใช้ DMSO และจะเห็นได้ว่า ในสาร Furazolidone และ Furaltadone ให้ค่าความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกันมากคือ 598.0 และ 600.0 nm อีกทั้งสีที่เกิดขึ้นเมื่อมองด้วยตาเปล่ายังมีสีน้ำเงินที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งอาจจะทำให้ไม่สามารถแยกชนิดของสารไนโตรฟูแรนด้วยตาเปล่าได้ เพราะฉะนั้น จึงเลือกใช้ DMF ในการทำเป็นน้ำยาทดสอบ

4.1.1.3 ผลการศึกษาการเกิดสีโดยใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ ดังนี้ 1M Ethanolic Potassiumhydroxide (1M KOH/EtOH), 1M Methanolic Potassiumhydroxide (1M KOH/MeOH), 1M Ethanolic Sodiumhydroxide (1M NaOH/EtOH), 1M Methanolic Sodiumhydroxide (1M NaOH/MeOH), 1M Potassiumhydroxide (1M KOH) และ 1M Sodiumhydroxide (1M NaOH)

ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาเพื่อทดสอบการเกิดสีหลังจากการเติมComplexing agent ชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 4.4 ลงไปในสารไนโตรฟูแรน เพียงอย่างเดียว โดยไม่ใช้ DMF เป็นตัวทำละลาย ว่าจะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงสีได้ดีหรือไม่ โดยใช้การสังเกตสีที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 4.4 แสดง Complexing agent ชนิดต่างๆ ที่นำมาทดลอง

No.	Complexing agent
1	1M Ethanolic Potassiumhydroxide (1M KOH/EtOH)
2	1M Methanolic Potassiumhydroxide (1M KOH/MeOH)
3	1M Ethanolic Sodiumhydroxide (1M NaOH/EtOH)
4	1M Methanolic Sodiumhydroxide (1M NaOH/MeOH)
5	1M Potassiumhydroxide (1M KOH)
6	1M Sodiumhydroxide (1M NaOH)

ตารางที่ 4.5 แสดงสีที่เกิดขึ้นของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน เมื่อใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น					
	1M KOH/EtOH	1M KOH/MeOH	1M NaOH/EtOH	1M NaOH/MeOH	1M KOH	1M NaOH
NFZ				มีตะกอนสีดำ	มีตะกอนสีดำ	มีตะกอนสีดำ
NFT		มีตะกอนสีดำ		มีตะกอนสีดำ		มีตะกอนสีดำ
FZD				มีตะกอนสีดำ		
FTD						มีตะกอนสีดำ
Blank	ไม่เปลี่ยนแปลง					

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 4.5 พบว่า เมื่อเติม 1M KOH/EtOH ลงในสารไนโตรฟูแรน จะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด เนื่องจากว่าสีของสารตัวอย่างนั้นที่เกิดขึ้นนั้นสามารถมองเห็นได้ชัดเจนที่สุดแต่สีที่เกิดขึ้นก็ยังไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนในการทดลองอื่นๆนั้นนอกจากสีที่มองเห็นจะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนแล้ว ยังทำให้สารไนโตรฟูแรนบางตัวไหม้จนกลายเป็นตะกอนสีดำ เพราะฉะนั้นจึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็นน้ำยาทดสอบ การทดลองต่อไปจึงนำ Complexing agent ที่ให้ผลดีจาก 4.1.1.3 และนำมาใช้ร่วมกับ Solvent จาก 4.1.1.2

4.1.1.4 ผลศึกษาการเกิดสีโดยใช้ DMF ร่วมกับ 1M Ethanolic Potassiumhydroxide (1M KOH/EtOH), 1M Methanolic Potassiumhydroxide (1M KOH/MeOH), 1M Ethanolic Sodiumhydroxide (1M NaOH/EtOH), 1M Methanolic Sodiumhydroxide (1M NaOH/MeOH), 1M Potassiumhydroxide (1M KOH) และ 1M Sodiumhydroxide (1M NaOH)

ตารางที่ 4.6 แสดงสีที่เกิดขึ้นของ Nitrofurazone โดยใช้ DMF ร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่างๆ

ปริมาณ NFZ	การเปลี่ยนแปลง					
	1M KOH/EtOH	1M KOH/MeOH	1M NaOH/EtOH	1M NaOH/MeOH	1M KOH	1M NaOH
100 µg						
10 µg						
1 µg						
0.1 µg		ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
0.01 µg	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ : NFZ คือ Nitrofurazone

จากตารางที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ DMF ร่วมกับ 1M KOH/EtOH จะสามารถให้สีของ Nitrofurazone ได้ชัดเจนที่สุดเมื่อมองด้วยตาเปล่า คือ ได้สีบานเย็น และสามารถอ่านค่าปริมาณของ Nitrofurazone ได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 0.1 μg ซึ่งดีกว่า Complexing agent ชนิดอื่นๆ ที่สามารถอ่านค่าปริมาณของ Nitrofurazone ได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 1 μg

ตารางที่ 4.7 แสดงสีที่เกิดขึ้นของ Nitrofurantoin โดยใช้ DMF ร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่างๆ

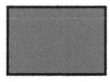
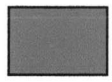
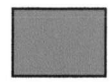
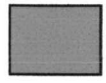
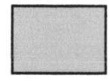
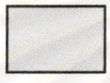
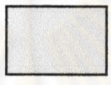
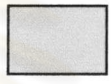
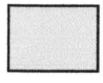
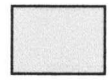
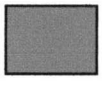
ปริมาณ NFT	การเปลี่ยนแปลง					
	1M KOH/EtOH	1M KOH/MeOH	1M NaOH/EtOH	1M NaOH/MeOH	1M KOH	1M NaOH
100 μg						
10 μg						
1 μg						
0.1 μg		ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
0.01 μg	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ : NFT คือ Nitrofurantoin

จากตารางที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ DMF ร่วมกับ 1M KOH/EtOH จะสามารถให้สีของ Nitrofurantoin ได้ชัดเจนที่สุด และให้สีที่แตกต่างกับ Complexing agent ชนิดอื่นๆ เมื่อมองด้วยตาเปล่า คือ ได้สีน้ำตาลเข้ม และสามารถอ่านค่าปริมาณของ Nitrofurantoin ได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 0.1 μg ซึ่งดีกว่า Complexing agent ชนิดอื่นๆ ที่สามารถอ่านค่าปริมาณของ Nitrofurantoin ได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 1 μg

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.8 แสดงสีที่เกิดขึ้นของ Furazolidone โดยใช้ DMF ร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่างๆ

ปริมาณ FZD	การเปลี่ยนแปลง					
	1M KOH/EtOH	1M KOH/MeOH	1M NaOH/EtOH	1M NaOH/MeOH	1M KOH	1M NaOH
100 µg						
10 µg						
1 µg						
0.1 µg		ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
0.01 µg	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ : FZD คือ Furazolidone

จากตารางที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ DMF ร่วมกับ 1M KOH/EtOH จะสามารถให้สีของ Furazolidone ได้ชัดเจนที่สุด และให้สีที่แตกต่างกับ Complexing agent ชนิดอื่นๆ เมื่อมองด้วยตาเปล่า คือ ได้สีม่วงเข้ม และสามารถอ่านค่าปริมาณของ Furazolidone ได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 0.1 µg ซึ่งดีกว่า Complexing agent ชนิดอื่นๆ ที่สามารถอ่านค่าปริมาณของ Furazolidone ได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 1 µg

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.9 แสดงสีที่เกิดขึ้นของ Furaltadone โดยใช้ DMF ร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่างๆ

ปริมาณ FTD	การเปลี่ยนแปลง					
	1M KOH/EtOH	1M KOH/MeOH	1M NaOH/EtOH	1M NaOH/MeOH	1M KOH	1M NaOH
100 µg						
10 µg						
1 µg						
0.1 µg		ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
0.01 µg	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ : FTD คือ Furaltadone

จากตารางที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ DMF ร่วมกับ 1M KOH/EtOH จะสามารถให้สีของ Furaltadone ได้ชัดเจนที่สุด และให้สีที่แตกต่างกับ Complexing agent ชนิดอื่นๆ เมื่อมองด้วยตาเปล่า คือ ได้สีน้ำเงิน และสามารถอ่านค่าปริมาณของ Furaltadone ได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 0.1 µg ซึ่งดีกว่า Complexing agent ชนิดอื่นๆ ที่สามารถอ่านค่าปริมาณของ Furaltadone ได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 1 µg

ดังนั้นจากตารางที่ 4.6 ถึง ตารางที่ 4.9 พบว่าเมื่อใช้ DMF กับ 1M KOH/EtOH จะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าตะกอนสีดำที่เกิดขึ้นในการทดลองที่ 4.1.1.3 นั้น สามารถละลายได้ใน DMF และให้สีที่ชัดเจนขึ้น และสามารถอ่านค่าได้ในระดับที่ต่ำมากที่สุดคือถึง 0.1 µg ส่วน Complexing agent ชนิดอื่นๆนั้น สีที่เกิดขึ้นจะใกล้เคียงกันมาก เมื่อมองด้วยตาเปล่า เมื่อนำทดสอบกับสารไนโตรฟูแรนหลายชนิดพร้อมกันทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารไนโตรฟูแรนชนิดใด จึงไม่เหมาะสมจะนำมาทำเป็นน้ำยาทดสอบ

4.1.1.5 ผลการศึกษาการเกิดสีโดยใช้ DMF และ KOH/EtOH ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม

เป็นการศึกษาต่อจากการทดลองที่ 4.1.1.4 คือ เมื่อทราบว่า KOH/EtOH เป็น Complexing agent ที่ดีที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นน้ำยาทดสอบ จึงต้องทำการทดลองต่อไปว่า KOH/EtOH ที่ความเข้มข้นระดับใด จะให้ผลการเปลี่ยนแปลงสีที่ดีที่สุด โดยจะต้องนำไปยืนยันผลความถูกต้องด้วยเครื่อง UV-Visible Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.10 แสดงการเกิดสีของสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm หลังการเติม KOH/EtOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลายมาตรฐาน 20 ppm	การเปลี่ยนแปลงหลังเติม KOH/EtOH						
	0.1 M	0.5 M	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M
NFZ	สีบานเย็น	สีบานเย็น	สีบานเย็น	สีบานเย็น	สีบานเย็น	สีบานเย็น มีตะกอน	สีบานเย็น มีตะกอน
NFT	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลอมส้ม	สีน้ำตาล	สีน้ำตาล มีตะกอน	สีน้ำตาล มีตะกอน	สีน้ำตาล มีตะกอน	สีน้ำตาล มีตะกอน
FZD	สีม่วงอมน้ำเงิน	สีม่วงอมน้ำเงิน	สีม่วงเข้ม	สีม่วงอมน้ำเงิน	สีม่วงอมน้ำเงิน	สีม่วงอมน้ำเงิน มีตะกอน	สีม่วงอมน้ำเงิน มีตะกอน
FTD	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงิน มีตะกอน	สีน้ำเงิน มีตะกอน
Blank	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ : NFZ คือ Nitrofurazone, NFT คือ Nitrofurantoin, FZD คือ Furazolidone, FTD คือ Furaltadone

จากตารางที่ 4.10 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ KOH/EtOH ไม่มีผลต่อการเกิดสีของสารไนโตรฟูแรน เนื่องจากสีที่เกิดขึ้นหลังจากการเติม KOH/EtOH ที่ทุกความเข้มข้นจะให้สีที่ใกล้เคียงกัน เมื่อมองด้วยตาเปล่า เพราะฉะนั้นจึงต้องมีการยืนยันผลค่าการดูดกลืนแสง ซึ่ง

จำเป็นต้องใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ในการอ่านผลความแตกต่าง แต่ในการเติม KOH/EtOH ที่ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 M ลงไปในสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด พบว่าจะมีตะกอนเกิดขึ้นด้วย จึงไม่สามารถนำไปยืนยันผลค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ได้ ดังนั้นในการทดลองเพื่อยืนยันผลค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer จึงจะใช้ KOH/EtOH ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 M เท่านั้น

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 20 ppm หลังการเติม KOH/EtOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลายมาตรฐาน 20 ppm	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง หลังการเติม KOH/EtOH			
		0.1 M	0.5 M	1 M	2 M
NFZ	540.0	1.176	1.211	1.413	0.613
NFT	480.0	0.537	0.560	0.646	0.206
FZD	580.0	1.145	1.168	1.269	1.106
FTD	596.0	0.614	0.720	0.794	0.683

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

หมายเหตุ : NFZ คือ Nitrofurazone, NFT คือ Nitrofurantoin, FZD คือ Furazolidone, FTD คือ Furaltadone

จากตารางที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าเมื่อเติม 1M KOH/EtOH ลงในสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้น 20 ppm จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด เมื่อนำไปวัดด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

จากการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า Solvent และ Complexing agent ที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้เป็นน้ำยาทดสอบเพื่อตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรน คือ การใช้ DMF ร่วมกับ 1M KOH/EtOH

4.1.1.6 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง DMF กับ 1 M KOH/EtOH

เป็นการศึกษาเพื่อหาปริมาณ DMF ต่อ 1M KOH/EtOH ที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้อัตราส่วนเป็น 1:1, 2:1, 4:1, 10:1, 20:1 และ 40:1 โดยที่สีของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ที่เกิดขึ้นจะต้องมีความเข้มสีที่ดีที่สุด ซึ่งจะสามารถยืนยันผลความถูกต้องได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ จากเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer

1) สารละลายมาตรฐาน Nitrofurazone 20 ppm

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Nitrofurazone 20 ppm โดยใช้อัตราส่วนของ DMF :1M KOH/EtOH ต่างๆกัน

No.	สารลายมาตรฐาน NFZ ใน DMF	1M KOH/EtOH	อัตราส่วน	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2 ml	2 ml	1:1	505.0	0.681
2	2 ml	1 ml	2:1	515.0	0.681
3	2 ml	500 µl	4:1	527.0	1.050
4	2 ml	200 µl	10:1	545.0	1.636
5	2 ml	100 µl	20:1	550.0	1.511
6	2 ml	50 µl	40:1	566.0	1.436

จากตารางที่ 4.12 จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของ DMF : 1M KOH/EtOH ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด คือ 10 : 1 เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม กับสารละลายมาตรฐาน Nitrofurazone

2) สารละลายมาตรฐาน Nitrofurantoin 20 ppm

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Nitrofurantoin 20 ppm โดยใช้อัตราส่วนของ DMF :1M KOH/EtOH ต่างๆกัน

No.	สารละลายมาตรฐาน NFT ใน DMF	1M KOH/EtOH	อัตราส่วน	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2 ml	2 ml	1:1	465.8	0.164
2	2 ml	1 ml	2:1	472.0	0.155
3	2 ml	500 µl	4:1	482.0	0.166
4	**2 ml**	**200 µl**	**10:1**	**480.0**	**0.203**
5	2 ml	100 µl	20:1	480.0	0.182
6	2 ml	50 µl	40:1	477.0	0.101

จากตารางที่ 4.13 จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของ DMF : 1M KOH/EtOH ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด คือ 10 : 1 เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม กับสารละลายมาตรฐาน Nitrofurantoin

3) สารละลายมาตรฐาน Furazolidone 20 ppm

ตารางที่ 4.14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Furazolidone 20 ppm โดยใช้อัตราส่วนของ DMF :1M KOH/EtOH ต่างๆกัน

No.	สารละลายมาตรฐาน FZD ใน DMF	1M KOH/EtOH	อัตราส่วน	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2 ml	2 ml	1:1	528.0	0.360
2	2 ml	1 ml	2:1	563.0	1.010
3	2 ml	500 µl	4:1	564.0	1.200
4	**2 ml**	**200 µl**	**10:1**	**580.0**	**1.602**
5	2 ml	100 µl	20:1	580.0	1.597
6	2 ml	50 µl	40:1	580.0	1.489

จากตารางที่ 4.14 จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของ DMF : 1M KOH/EtOH ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด คือ 10 : 1 เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม กับสารละลายมาตรฐาน Furazolidone

4) สารละลายมาตรฐาน Furaltadone 20 ppm

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Furaltadone 20 ppm โดยใช้อัตราส่วนของ DMF :1M KOH/EtOH ต่างๆกัน

No.	สารละลายมาตรฐาน FTD ใน DMF	1M KOH/EtOH	อัตราส่วน	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2 ml	2 ml	1:1	587.0	0.759
2	2 ml	1 ml	2:1	587.0	0.542
3	2 ml	500 µl	4:1	591.0	0.716
4	2 ml	200 µl	10:1	596.0	0.778
5	2 ml	100 µl	20:1	601.0	0.761
6	2 ml	50 µl	40:1	605.0	0.702

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

จากตารางที่ 4.15 จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของ DMF : 1M KOH/EtOH ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด คือ 10 : 1 เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม กับสารละลายมาตรฐาน Furaltadone

ดังนั้น จากตารางที่ 4.12 ถึง 4.15 สามารถสรุปได้ว่า อัตราส่วนของ DMF : 1M KOH/EtOH ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนมีค่าสูงที่สุด คือ 10:1 เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนนี้ไปใช้กับน้ำยาทดสอบต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 ผลการทำปฏิริยาการเกิดสีโดยวิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน

เป็นการศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน โดยใช้หลักการของการทดสอบหมู่ฟังก์ชันที่อยู่ในโครงสร้างหลักของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน ซึ่งก็คือหมู่ไนโตรอะโรมาติก เราสามารถใช้วิธีทดสอบหมู่ไนโตรได้ผลดังนี้

4.1.2.1 ผลการทดสอบสารประกอบไนโตรอะโรมาติก

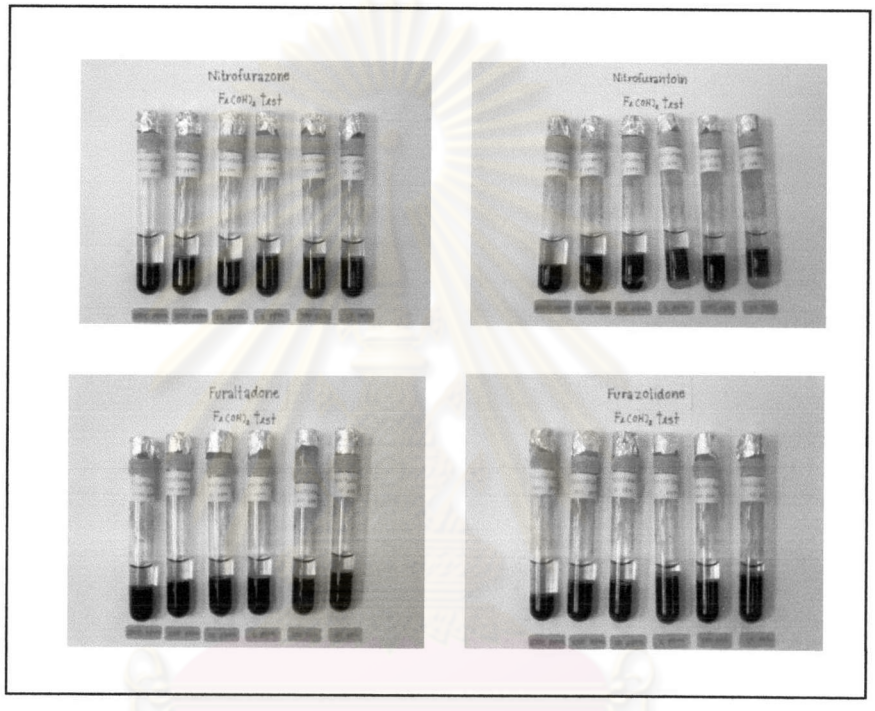
4.1.2.1.1 ผลการศึกษาโดยใช้วิธี Ferrous hydroxide test ($Fe(OH)_2$ test)

เป็นการศึกษาว่าสารที่ต้องการจะทดสอบนั้น มีหมู่ไนโตรอะโรมาติก อยู่ในโครงสร้างของสารชนิดนั้นหรือไม่ โดยที่ถ้ามีสารประกอบไนโตรอะโรมาติกอยู่ในโครงสร้างของสารนั้น หลังจากการทดสอบจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นตะกอนสีน้ำตาลแดงหรือสีแดงของ $Fe(OH)_3$ เนื่องจาก $Fe(OH)_2$ถูกออกซิไดซ์โดยสารประกอบไนโตร และถ้าไม่มีสารประกอบไนโตรก็จะเปลี่ยนเป็นตะกอนสีเขียมเข้ม

ตารางที่4.16 แสดงผลการศึกษาโดยใช้วิธี Ferrous hydroxide test ($Fe(OH)_2$ test)

No.	ความเข้มข้น	การเปลี่ยนแปลง			
		Nitrofurazone	Nitrofurantoin	Furazolidone	Furaltadone
1	10 mg	เกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงเข้ม	เกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงเข้ม	เกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงเข้ม	เกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงเข้ม
2	1000 ppm	เกิดตะกอนสีน้ำตาลเข้ม	เกิดตะกอนสีน้ำตาลเข้ม	เกิดตะกอนสีน้ำตาลเข้ม	เกิดตะกอนสีน้ำตาลเข้ม
3	100 ppm	เกิดตะกอนสีน้ำตาลอมเขียว	เกิดตะกอนสีน้ำตาลอมเขียว	เกิดตะกอนสีน้ำตาลอมเขียว	เกิดตะกอนสีน้ำตาลอมเขียว
4	10 ppm	เกิดตะกอนสีน้ำตาลอมเขียว	เกิดตะกอนสีน้ำตาลอมเขียว	เกิดตะกอนสีน้ำตาลอมเขียว	เกิดตะกอนสีน้ำตาลอมเขียว
5	1 ppm	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว
6	100 ppb	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว
7	10 ppb	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว
8	1 ppb	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว	เกิดตะกอนสีเขียว
9	Blank	เกิดตะกอนสีเขียว			

สารประกอบไนโตร จะให้ตะกอนสีน้ำตาลแดงหรือสีแดงของ $Fe(OH)_3$ เนื่องจาก $Fe(OH)_2$ถูกออกซิไดซ์โดยสารประกอบไนโตร จากตารางที่ 4.15 พบว่าเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 1000 ppm (0.1% w/w) ในสารไนโตรฟูแรนทั้งทั้ง 4 ชนิด ดังรูปที่ 4.1 ส่วนในความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ppm จะเกิดตะกอนสีเขียวขึ้น ก็แสดงว่าวิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชันไนโตรโดยวิธีนี้เหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนในระดับ %w/w และมีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นชุดตรวจสอบในภาคสนามที่ต้องการการทดสอบที่รวดเร็วและว่องไว



<u>รูปที่ 4.1</u> ผลการศึกษาโดยใช้วิธี Ferrous hydroxide test ($Fe(OH)_2$ test)

4.1.2.1.2 ผลการศึกษาโดยใช้วิธี Zn/NH_4Cl test

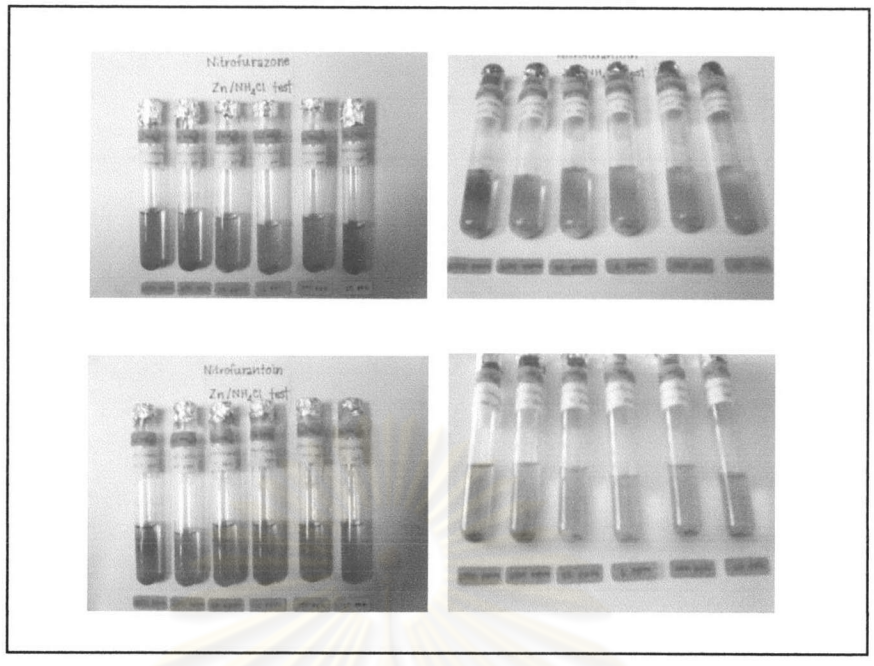
เป็นการศึกษาว่าสารที่ต้องการจะทดสอบนั้น มีหมู่ไนโตรอะโรมาติก อยู่ในโครงสร้างของสารชนิดนั้นหรือไม่ โดยหมู่ไนโตรจะถูกรีดิวซ์จนกลายเป็น hydrazine, hydroxyl amine หรือ amino phenol ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะถูกออกซิไดซ์ต่อได้โดย Tollen's reagent ซึ่งถ้าผลที่ได้มี silver mirror ฉาบอยู่ข้างหลอดทดลองแสดงว่ามีหมู่ไนโตรอะโรมาติกอยู่ในโครงสร้างของสารนั้น

ตารางที่4.17 แสดงผลการศึกษาโดยใช้วิธี Zn/NH_4Cl test

No	ความเข้มข้น	การเปลี่ยนแปลง			
		Nitrofurazone	Nitrofurantoin	Furazolidone	Furaltadone
1	10 mg	มีตะกอนสีเงินของ Ag ฉาบอยู่ก้นหลอด	มีตะกอนสีเงินของ Ag ฉาบอยู่ก้นหลอด	มีตะกอนสีเงินของ Ag ฉาบอยู่ก้นหลอด	มีตะกอนสีเงินของ Ag ฉาบอยู่ก้นหลอด
2	1000 ppm	”	”	”	”
3	100 ppm	”	”	”	”
4	10 ppm	”	”	”	”
5	1 ppm	”	”	”	”
6	100 ppb	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
7	10 ppb	”	”	”	”
8	1 ppb	”	”	”	”
8	Blank	ไม่เปลี่ยนแปลง			

สารประกอบไนโตร อะโรมาติกจะให้ตะกอนสีเงินของ Ag ฉาบอยู่ก้นหลอด จากตารางที่ 4.17 พบว่าเกิดตะกอนสีเงินที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 1 ppm ในสารไนโตรฟูแรนทั้งทั้ง 4 ชนิด ดังรูปที่ 4.2 ส่วนในความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ppb จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จะเห็นได้ว่าวิธีนี้มีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นชุดตรวจสอบในภาคสนามที่ต้องการการทดสอบที่รวดเร็วและว่องไว และนอกจากนี้เรายังไม่สามารถยืนยันผลได้ว่าเป็นสารกลุ่มไนโตรฟูแรนหรือไม่ เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีทดสอบว่ามีหมู่ไนโตร อะโรมาติก หรือไม่เท่านั้นเอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ผลการศึกษาโดยใช้วิธี Zn/NH_4Cl test

ดังนั้นจากผลการทดลองที่ 4.1.1 และ 4.1.2 สามารถสรุปได้ว่าการทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยตรงกับสารกลุ่มไนโตรฟูแรนโดยใช้ Solvent คือ DMF ร่วมกับ Complexing agent คือ 1M KOH/EtOH ในอัตราส่วน 10:1 เป็นวิธีการที่ให้ผลการทดสอบดีที่สุด และสามารถบ่งชี้ชนิดของสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ได้อย่างชัดเจน ส่วนที่วิธีการทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชันนั้นมีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นชุดตรวจสอบในภาคสนามที่ต้องการการทดสอบที่รวดเร็วและว่องไว และนอกจากนี้ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าสารที่นำมาทดสอบเป็นสารกลุ่มไนโตรฟูแรนหรือไม่ เนื่องจากสามารถระบุได้ว่ามีหมู่ไนโตรอยู่ในโครงสร้างเท่านั้น

4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูแรน ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก

4.2.1 ผลการศึกษาช่วงการตรวจวัดปริมาณสารไนโตรฟูแรนที่เหมาะสม

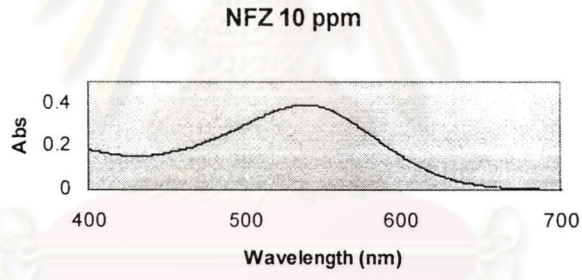
ในการศึกษานี้ เป็นการตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Visual test) หลังจากการใช้น้ำยาทดสอบว่าสามารถมองเห็นได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ระดับใด โดยจะทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 100 ppb ถึง 100 ppm และ ทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-

800 นาโนเมตร ซึ่งพบว่าไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด สามารถดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นดังแสดงในตารางที่ 4.18 และ รูปที่ 4.3-4.6

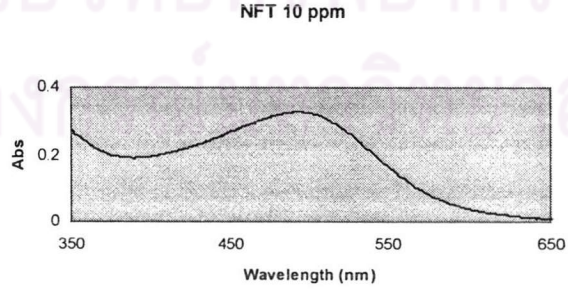
ตารางที่ 4.18 แสดงสีที่มองเห็น และ ความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ 10 ppm หลังจากใช้น้ำยาทดสอบ (ซึ่งประกอบด้วย DMF:1M KOH/EtOH = 10:1)

ชนิดของสาร ไนโตรฟูแรน ที่ความเข้มข้น 10 ppm	ความยาวคลื่น สูงสุด (nm)	สีที่เกิดขึ้น
Nitrofurazone	540	สีม่วงแดง
Nitrofurantoin	480	สีน้ำตาล
Furazolidone	580	สีม่วงเข้ม
Furaltadone	596	สีน้ำเงิน

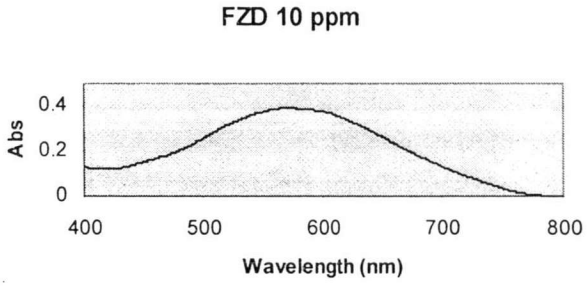
ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer และ visual test



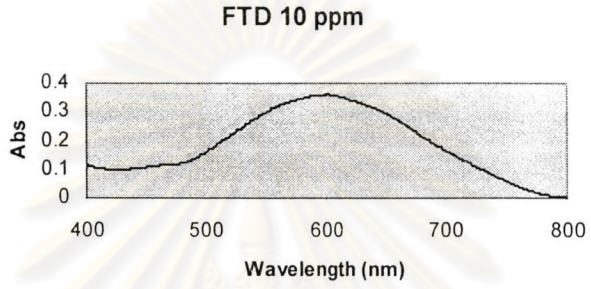
รูปที่ 4.3 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของ Nitrofurazone ความเข้มข้น 10 ppm



รูปที่ 4.4 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของ Nitrofurantoin ความเข้มข้น 10 ppm



รูปที่ 4.5 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของ Furazolidone ความเข้มข้น 10 ppm



รูปที่ 4.6 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของ Furaltadone ความเข้มข้น 10 ppm

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer

ค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จากการวิเคราะห์ และสีที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันความถูกต้องโดยนำมาเทียบกับข้อมูลในตารางที่ 14.19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น สีที่ถูกดูดกลืน (Color Transmitted) และ สีที่เกิดขึ้นจริง (Complementary Color)

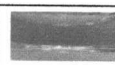
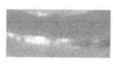
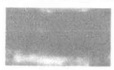
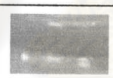
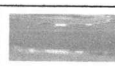
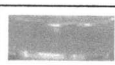
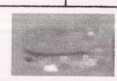
Wave Length (nm)	Color Transmitted	Complementary Color
400 - 435	สีม่วง	สีเขียวอมเหลือง
435 - 480	สีน้ำเงิน	สีเหลือง
480 - 490	สีน้ำเงินอมเขียว	สีส้ม
490 - 500	สีเขียวอมน้ำเงิน	สีแดง
500 - 560	สีเขียว	สีม่วงแดง
560 - 580	สีเขียวอมเหลือง	สีม่วง
580 - 595	สีเหลือง	สีน้ำเงิน
595 - 610	สีส้ม	สีน้ำเงินอมเขียว
610 - 750	สีแดง	สีเขียวอมน้ำเงิน

ที่มา : Colorimetric methods of analysis, 1948

จะเห็นได้ว่า ผลการทดลองตามตารางที่ 4.18 มีความสอดคล้องกับ ข้อมูลในตารางที่ 4.19 คือ หลังใช้น้ำยาทดสอบ Nitrofurazone จะเกิดเป็นสีม่วงแดง และมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 540นาโนเมตร, Nitrofurantoin จะเกิดเป็นสีน้ำตาล และมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 480นาโนเมตร, Furazolidone จะเกิดเป็นสีม่วง และมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 580นาโนเมตร, Furaltadone จะเกิดเป็นสีม่วงแดง และมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 540นาโนเมตร

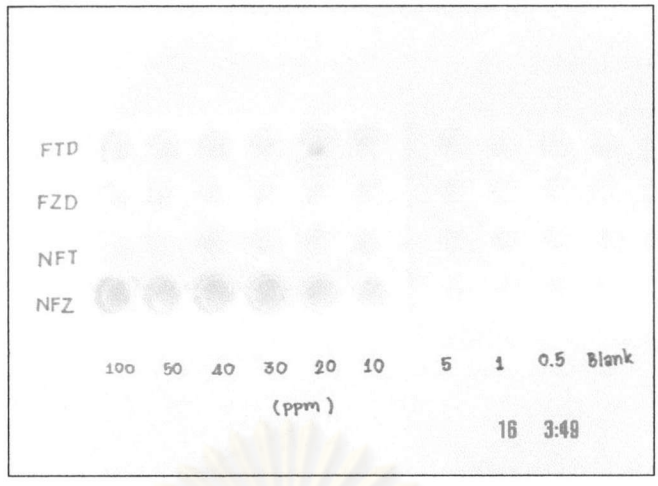
จากนั้นจึงทำการเตรียมสาระลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ppb ถึง 100 ppm และสังเกตความเข้มของสีที่เกิดขึ้นหลังใช้น้ำยาทดสอบ และยืนยันผลค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ได้ผลดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 แสดงผลการตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้น 100 ppb ถึง 100 ppm และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ หลังใช้น้ำยาทดสอบ

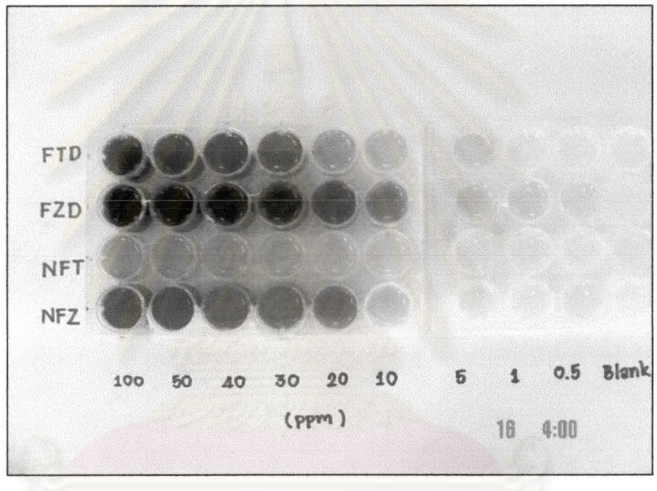
ความเข้มข้น (ppm)	Furaltadone		Furazolidone		Nitrofurantoin		Nitrofurazone	
	Visual test	Abs	Visual test	Abs	Visual test	Abs	Visual test	Abs
100		3.524		4.236		3.064		5.760
50		2.218		3.066		1.550		3.825
40		1.869		2.369		1.3		3.047
30		1.363		1.869		0.957		2.222
20		0.799		1.269		0.646		1.413
10		0.379		0.527		0.324		0.617
5		0.201		0.277		0.177		0.284
1		0.034		0.034		0.091		0.052
0.5		0.016		0.015		0.012		0.028
0.1		0.007		0.009		0.003		0.016
Blank								

หมายเหตุ : สีที่เห็นเป็นสีที่ได้จากรูปถ่าย อาจไม่ชัดเจนเหมือนกับสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 แสดงสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนก่อนใช้น้ำยาทดสอบ



รูปที่ 4.8 แสดงสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนหลังใช้น้ำยาทดสอบ

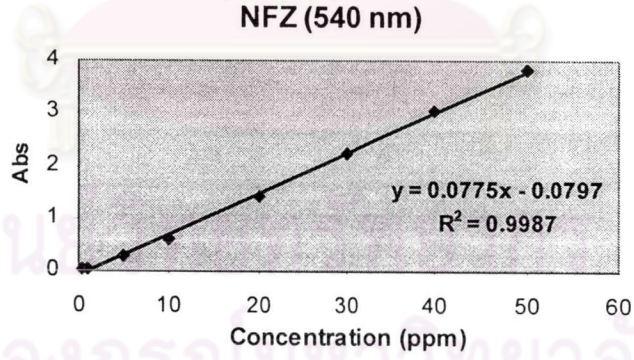
จากตารางที่ 4.20 และรูปที่ 4.8 พบว่าความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Visual test) คือ 0.5 ppm และจะเห็นได้ว่าความเข้มของสีจะลดลงเมื่อลดระดับความเข้มข้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบนี้สามารถวิเคราะห์หาสารไนโตรฟูแรนได้ คือ 0.5 ppm

จากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของไนโตรฟูแรน กับ ค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณหาค่า Linear regression ของ Calibration curve โดยจะทำการวัดทุก 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ตารางที่4.21 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Nitrofurazone ที่ 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Nitrofuazone (n=5)	RSD
0.5	0.028 ± 0.009	5.89
1	0.052 ± 0.006	4.53
5	0.284 ± 0.012	4.23
10	0.617 ± 0.030	4.94
20	1.413 ± 0.112	7.89
30	2.222 ± 0.130	5.86
40	3.047 ± 0.167	5.48
50	3.825 ± 0.199	5.20
y=ax+b	y=0.0775x-0.0797	
R^2	0.9987	

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

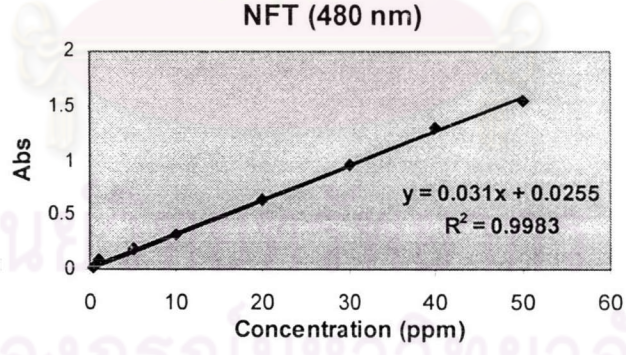


รูปที่ 4.9 Calibration range ของ Nitrofurazone ที่ความเข้มข้น 50 ppm ถึง 500 ppb

ตารางที่4.22 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Nitrofurantoin ที่ 480 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Nitrofurantoin (n=5)	RSD
0.5	0.012 ± 0.004	7.08
1	0.091 ± 0.007	7.69
5	0.177 ± 0.014	7.91
10	0.324 ± 0.016	4.94
20	0.646 ± 0.036	5.50
30	0.957 ± 0.043	4.47
40	1.3 ± 0.050	3.78
50	1.550 ± 0.032	2.07
y=ax+b	y = 0.031x+0.0255	
R^2	0.9983	

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

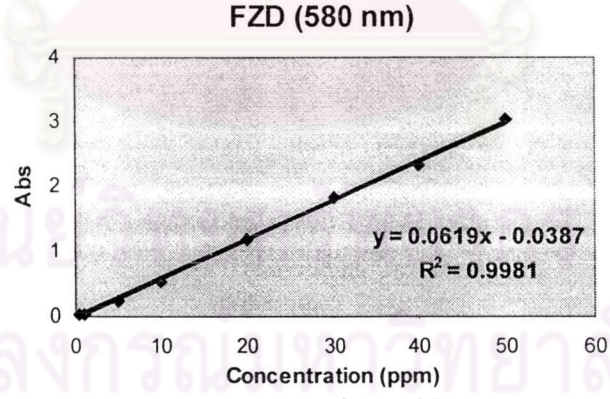


รูปที่ 4.10 Calibration range ของ Nitrofurantoin ที่ความเข้มข้น 50 ppm ถึง 500 ppb

ตารางที่4.23 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Furazolidone ที่ 580 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Furazolidone (n=5)	RSD
0.5	0.015 ± 0.004	26.67
1	0.034 ± 0.009	26.47
5	0.277 ± 0.023	8.30
10	0.527 ± 0.020	3.79
20	1.269 ± 0.132	10.40
30	1.869 ± 0.049	2.62
40	2.369 ± 0.046	1.94
50	3.066 ± 0.058	1.89
y=ax+b	Y=0.0619x-0.0387	
R^2	0.9981	

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

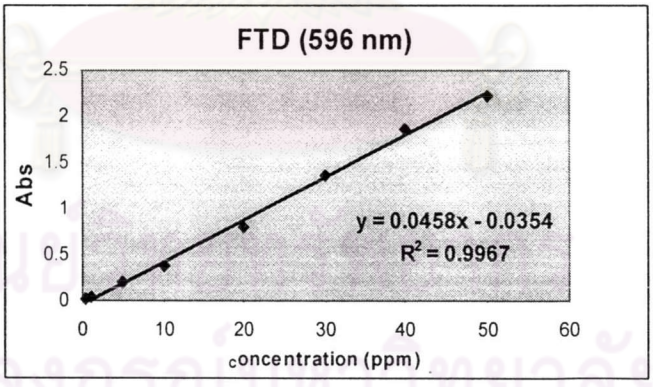


รูปที่ 4.11 Calibration range ของ Furazolidone ที่ความเข้มข้น 50 ppm ถึง 500 ppb

ตารางที่ 4.24 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Furaltadone ที่ 596 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Furaltadone (n=5)	RSD
0.5	0.016 ± 0.004	25
1	0.034 ± 0.003	8.82
5	0.201 ± 0.023	11.44
10	0.379 ± 0.023	6.07
20	0.799 ± 0.004	0.50
30	1.363 ± 0.060	4.40
40	1.869 ± 0.012	0.64
50	2.218 ± 0.022	0.99
y=ax+b	Y=0.0458x-0.0354	
R^2	0.9967	

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

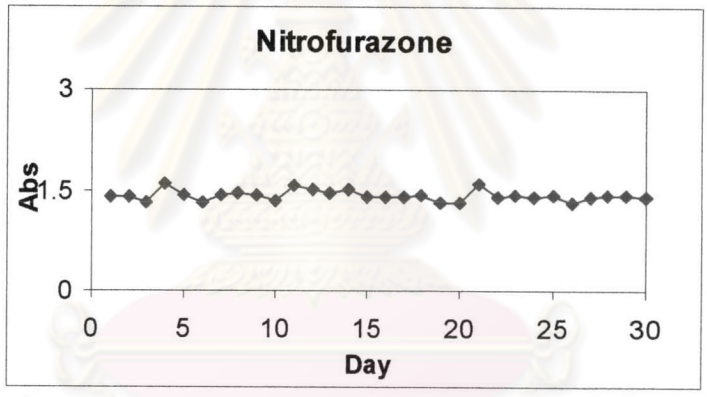


รูปที่ 4.12 Calibration range ของ Furaltadone ที่ความเข้มข้น 50 ppm ถึง 500 ppb

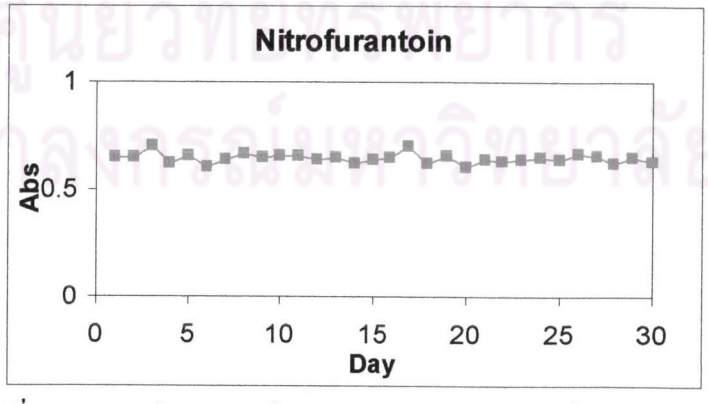
จากตารางที่ 4.21 ถึง 4.24 และรูปที่ 4.9 ถึง 4.12 จะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Nitrofurazone, Nitrofurantoin, Furazolidone และ Furaltadone หลังหยดน้ำยาทดสอบ ที่ความเข้มข้น 0.5 ppm ถึง 50 ppm เมื่อทำการวัดทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า มีค่าสมการเชิงเส้นถดถอยเฉลี่ย คือ $y = 0.0775x-0.0797$, $y = 0.031x+0.0255$, $y = 0.0619x-0.0387$, $y = 0.0458x-0.0354$ ตามลำดับ และ ค่า $r^2 = 0.9987, 0.9983, 0.9981, 0.9967$ ตามลำดับ

4.2.2 การทดสอบเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ

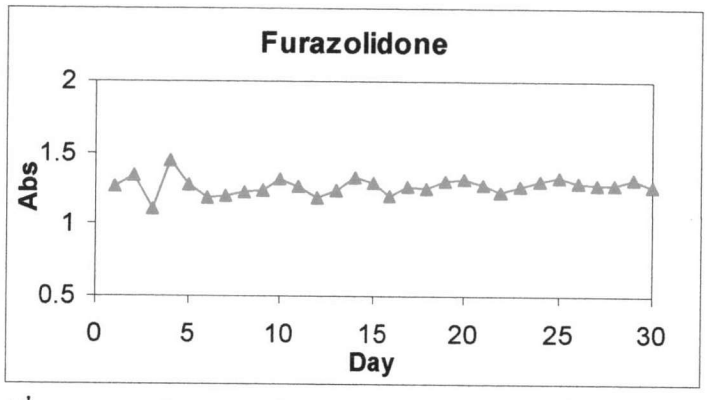
การทดสอบเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ ทำได้โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการหยดน้ำยาทดสอบของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 20 ppm โดยทำการวัดทุกวัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน และทำการเก็บรักษาสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนและน้ำยาทดสอบ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.13 ถึง 4.16



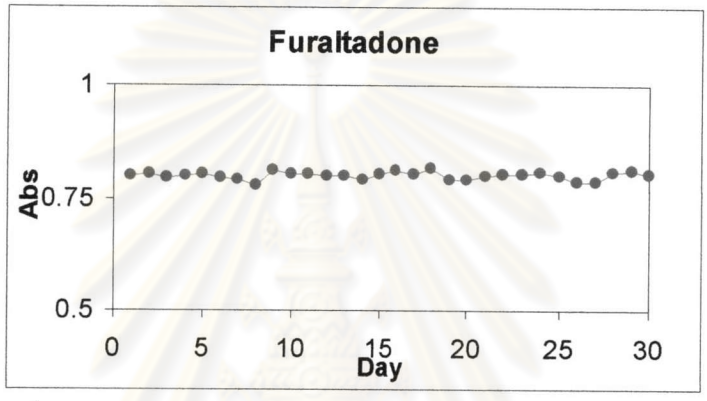
รูปที่ 4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Nitrofurazone เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Nitrofurantoin เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Furazolidone เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Furaltadone เป็นเวลา 1 เดือน

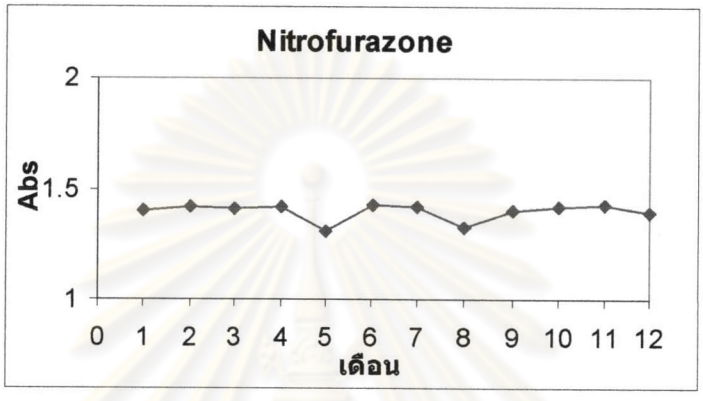
ตารางที่ 4.25 แสดงค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 20 ppmหลังหยดน้ำยาทดสอบเป็นระยะเวลา 1 เดือน

(n=30 วัน)	Nitrofurazone	Nitrofurantoin	Furazolidone	Furaltadone
ค่าเฉลี่ย	1.422	0.645	1.269	0.799
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0738	0.0216	0.0612	0.0088
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)	5.19	3.35	4.82	1.00

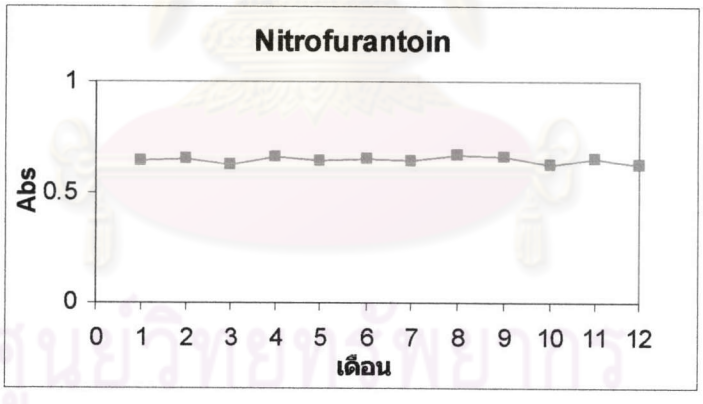
ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย UV-Visible spectrophotometer

จากรูปที่ 4.13 ถึง 4.16 และจากตารางที่ 4.25 จะเห็นได้ว่า ในระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือนในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส น้ำยาทดสอบมีเสถียรภาพสูงเนื่องจากมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต่ำกว่า 10 โดยดูจากผลการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างคงที่

เพื่อการยืนยันเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ จึงทำการทดลองต่อไปเป็นระยะเวลา 12 เดือน โดยทำการวัดเดือนละ 1 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.17 ถึง 4.20

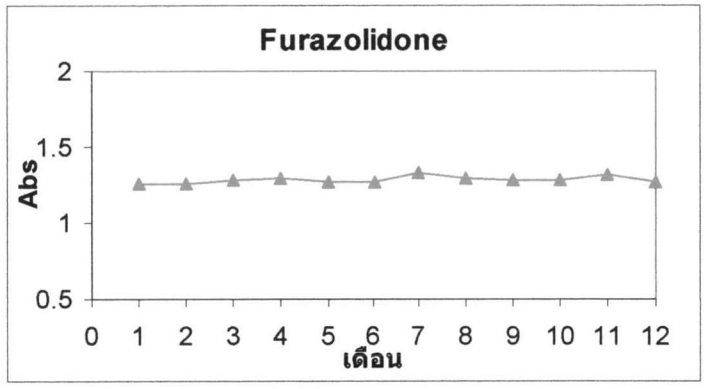


รูปที่ 4.17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Nitrofurazone เป็นเวลา 1 เดือน

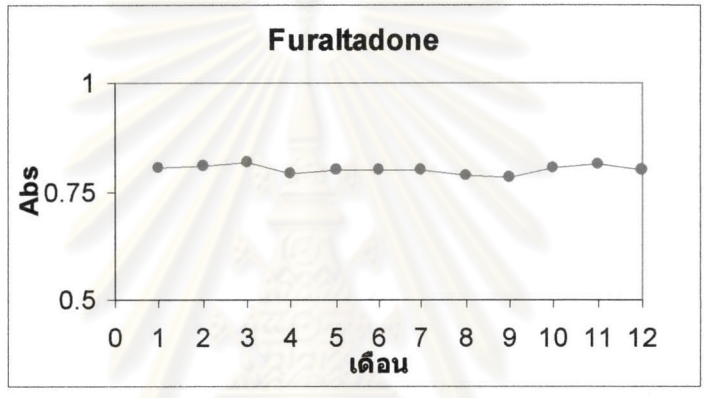


รูปที่ 4.18 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Nitrofurantoin เป็นเวลา 1 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Furazolidone เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.20 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Furaltadone เป็นเวลา 1 เดือน

ตารางที่ 4.26 แสดงค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 20 ppmหลังหยดน้ำยาทดสอบเป็นระยะเวลา 12 เดือน

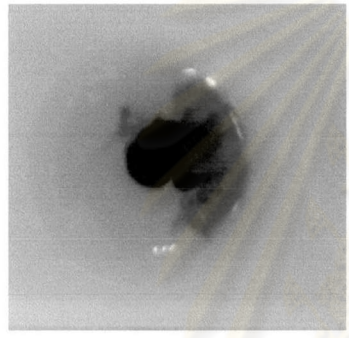
(n=12 เดือน)	Nitrofurazone	Nitrofurantoin	Furazolidone	Furaltadone
ค่าเฉลี่ย	1.398	0.642	1.272	0.803
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.047	0.010	0.012	0.009
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)	3.36	1.56	0.96	1.12

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย UV-Visible spectrophotometer

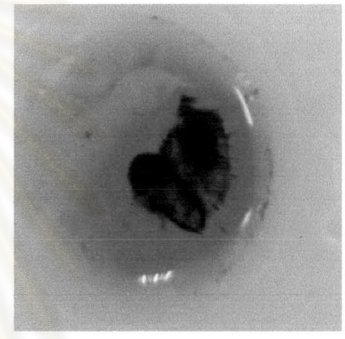
จากรูปที่ 4.17 ถึง 4.20 และจากตารางที่ 4.26 จะเห็นได้ว่า ในระยะเวลาการเก็บรักษา 12 เดือนในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส น้ำยาทดสอบมีเสถียรภาพสูงเนื่องจากมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต่ำกว่า 10 โดยดูจากผลการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างคงที่

4.3 การสร้างแถบสีมาตรฐาน

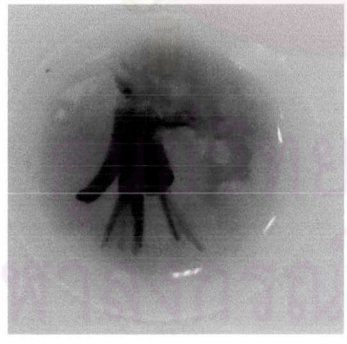
เป็นการสร้างแถบสีที่จำลองจากสีที่เกิดขึ้นจริงหลังการใช้น้ำยาทดสอบกับสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง 100 ppm ซึ่งสร้างขึ้นเพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความเข้มข้นของไนโตรฟูแรนเมื่อนำไปใช้ในภาคสนามและต้องการทราบความเข้มข้นของไนโตรฟูแรนที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างชนิดต่างๆ



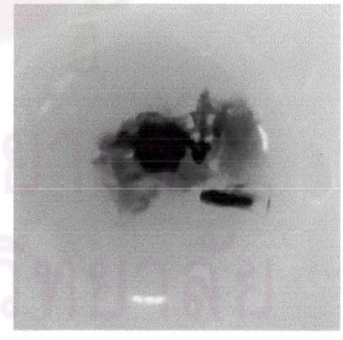
รูปที่ 4.21 แสดงสีที่เกิดขึ้นของ Nitrofurazone หลังหยดน้ำยาทดสอบ



รูปที่ 4.22 แสดงสีที่เกิดขึ้นของ Nitrofurantoin หลังหยดน้ำยาทดสอบ

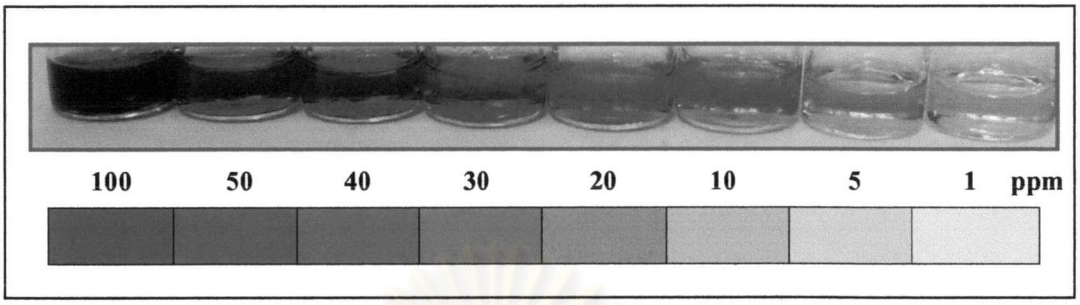


รูปที่ 4.23 แสดงสีที่เกิดขึ้นของ Furazolidone หลังหยดน้ำยาทดสอบ

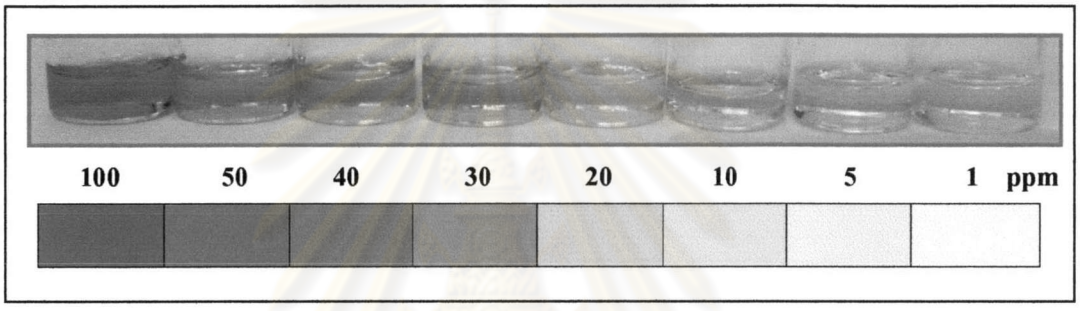


รูปที่ 4.24 แสดงสีที่เกิดขึ้นของ Furaltadone หลังหยดน้ำยาทดสอบ

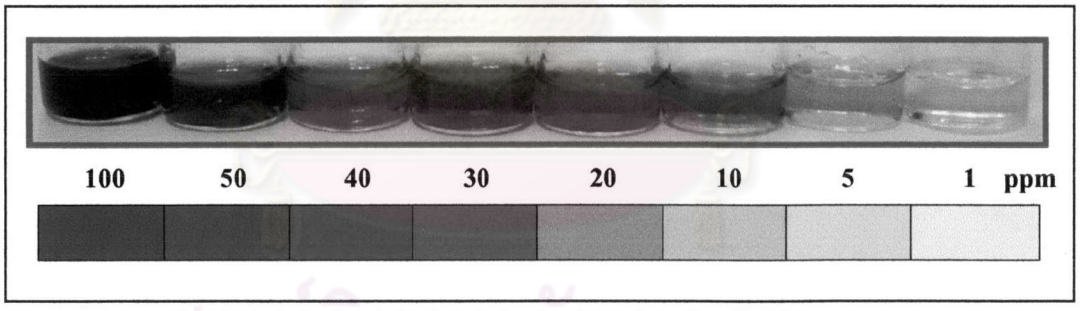
แถบสีมาตรฐานนี้สร้างจากภาพถ่ายของสีที่เกิดขึ้นจริง และได้มีการสร้างแถบสีมาตรฐานจำลองขึ้นด้วยเนื่องจากว่าสีที่ได้จากภาพถ่ายมีความผิดเพี้ยนจากความเป็นจริงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.25 - 4.28



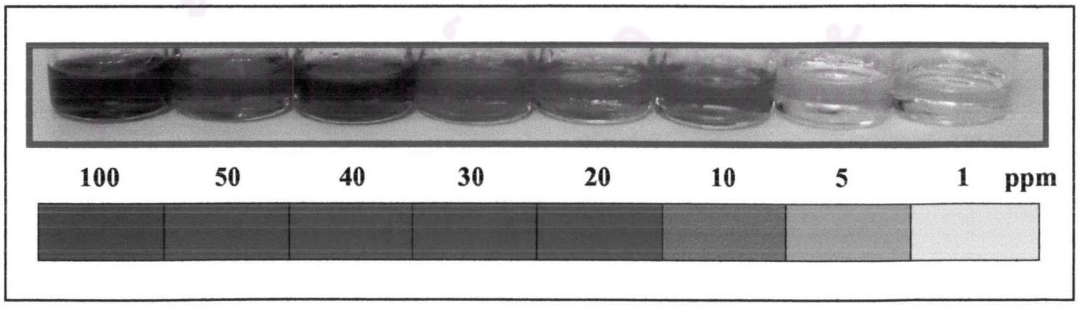
รูปที่4.25 แถบสีมาตรฐานของ Nitrofurazone



รูปที่4.26 แถบสีมาตรฐานของ Nitrofuratoin



รูปที่4.27 แถบสีมาตรฐานของ Furazolidone



รูปที่4.28 แถบสีมาตรฐานของ Furaltadone

4.4 ผลการทดลองเปรียบเทียบชุดตรวจสอบสารไนโตรฟูแรนที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจสอบสารไนโตรฟูแรนที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน

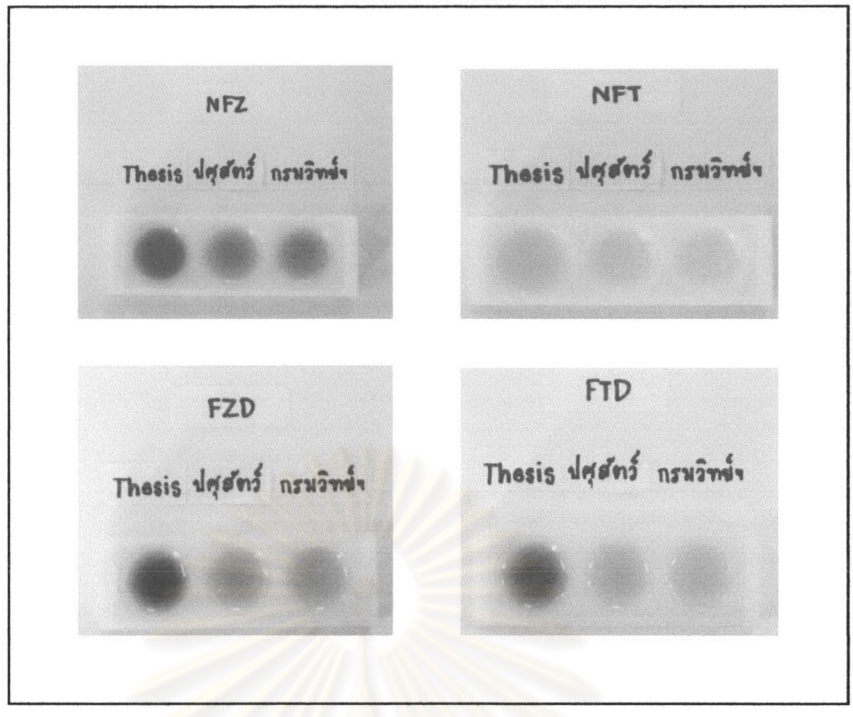
การศึกษาในขั้นตอนนี้ เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบลักษณะการใช้ และคุณภาพของชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่พัฒนาขึ้น กับชุดตรวจสอบสารไนโตรฟูแรนที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน นั่นก็คือ ชุดตรวจสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และของกรมปศุสัตว์ รวมทั้งเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นโดยนำไปหาค่าการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของชุดตรวจสอบทั้ง 3 ชนิด ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

รูปที่ 4.29 แสดงชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่พัฒนาขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.27 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะการใช้ และคุณภาพของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, ชุดตรวจสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และชุดตรวจสอบของ กรมปศุสัตว์

การเปรียบเทียบลักษณะการใช้และคุณภาพ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรมปศุสัตว์	ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น
การใช้ชุดตรวจสอบ			
• วิธีการใช้	• เป็น spot test หยดน้ำยาบนสารตัวอย่าง	• เป็น spot test โดยต้องโรยสารตัวอย่างลงในน้ำยา	• เป็น spot test หยดน้ำยาบนสารตัวอย่าง
• ปริมาณน้ำยาที่ใช้	• น้ำยาไนโตรฟูแรน1 1 ml : น้ำยาไนโตรฟูแรน2 2-3 หยด	• น้ำยา Fura1 18 หยด : น้ำยา Fura2 2 หยด	• Solvent 1 ml : Complexing agent 0.1 ml
• สีที่เกิดขึ้น	• สีไม่เหมือนในคู่มือ	• สีเหมือนกับในคู่มือ	• สีเหมือนกับแถบสีมาตรฐาน
• ความยาก-ง่ายในการใช้	• ใช้ง่าย สะดวก รวดเร็ว อ่านผลได้ทันทีหลังใช้น้ำยาทดสอบ	• ใช้ง่าย สะดวก รวดเร็ว อ่านผลได้ทันทีหลังใช้น้ำยาทดสอบ	• ใช้ง่าย สะดวก รวดเร็ว อ่านผลได้ทันที หลังใช้น้ำยาทดสอบ
คุณภาพของชุดตรวจสอบ			
• ระดับต่ำสุดที่วัดได้	• 10 ppm	• 10 ppm	• 0.5 ppm
• การอ่านปริมาณสารไนโตรฟูแรน	• ไม่สามารถอ่านปริมาณได้ บอกได้เพียงแต่มีหรือไม่มี	• ไม่สามารถอ่านปริมาณได้ บอกได้เพียงแต่มีหรือไม่มี	• สามารถอ่านได้ตั้งแต่ระดับ 1-100 ppm
• ความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น	• สีเปลี่ยนไปภายใน 1 นาที และจางหายไปอย่างรวดเร็ว	• สีเปลี่ยนไปภายใน 1 นาที และสีจะถูกน้ำยากัดไหม้	• สีเปลี่ยนไปภายใน 10 นาที และค่อยๆจางไปอย่างช้าๆ
• ความคงทนต่อสภาพการใช้	• เก็บไว้ได้นาน 6 เดือน	• เก็บไว้ได้นาน 6 เดือน	• เก็บไว้ได้นานอย่างน้อย 12 เดือน โดยที่คุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง
• ความคงทนด้านการเก็บรักษาและการใช้ที่อุณหภูมิต่างๆ	• คงทนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 C ควรเก็บรักษาในตู้เย็น	• คงทนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 C ควรเก็บรักษาในตู้เย็น	• คงทนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 C ควรเก็บรักษาในตู้เย็น



รูปที่ 4.30 แสดงสีที่เกิดขึ้นของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์ และ ชุดตรวจสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จากตารางที่ 4.27 พบว่าวิธีการใช้ชุดตรวจสอบทั้ง 3 ชนิดนั้นจะใช้น้ำยาทดสอบร่วมกัน 2 ชนิด ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีวิธีการใช้ที่สะดวก รวดเร็วเหมือนกัน แต่ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์หลังจากหยดน้ำยาทดสอบจะต้องนำไปอ่านผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ด้วย ซึ่งนับว่าเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากมาก และเมื่อทำการทดสอบกับสารกลุ่มไนโตรฟูแรน พบว่าสีที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกัน แต่สีที่ได้จากชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจะได้สีที่มีความเข้มดีที่สุด และยังสามารถทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างได้อย่างแม่นยำเมื่อนำไปเทียบกับแถบสีมาตรฐานที่สร้างขึ้น ส่วนชุดตรวจสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นั้นพบว่าสีที่เกิดขึ้นผิดไปจากสีในคู่มือที่แนบมา สำหรับระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้พบว่า ชุดตรวจสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และกรมปศุสัตว์นั้นสามารถวัดได้ที่ระดับต่ำสุด 10 ppm และชุดตรวจสอบทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่สามารถระบุปริมาณสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างได้บอกได้เพียงแต่มีหรือไม่มีเท่านั้น ส่วนชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถวัดได้ที่ระดับต่ำสุด 0.5 ppm และสามารถระบุปริมาณสารกลุ่มไนโตรฟูแรนได้ตั้งแต่ 1-100 ppm โดยนำมาเทียบกับแถบสีมาตรฐาน ในด้านของความคงตัวของสี ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจะให้ความคงตัวสีของได้นานที่สุดคือ 10 นาที และสีไม่ถูกน้ำยากัดไหม้ ในด้านของความคงทนของน้ำยาทดสอบในวิธีการใช้ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถเก็บไว้นานอย่าง

น้อย 12 เดือนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยที่คุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนชุดตรวจสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และกรมปศุสัตว์ระบุไว้ว่าสามารถเก็บไว้ได้นานอย่างน้อย 6 เดือนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเหมือนกัน แต่พบว่าน้ำยาทดสอบของกรมปศุสัตว์ เมื่อเก็บไว้นานมักให้ผลที่เป็น false positive คือ สีน้ำยาทดสอบจะเปลี่ยนไป โดยที่น้ำยา Fura 2 จะมีสีเข้มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ดังรูป 4.21 เมื่อนำไปใช้จะทำให้ประสิทธิภาพในการอ่านผลต่ำลง โดยเฉพาะจะไม่สามารถใช้อ่านผลกับ Nitrofurantoin ได้เลย เพราะ สาร Nitrofurantoin จะเกิดสีน้ำตาลหลังหยดน้ำยาทดสอบ แต่น้ำยาทดสอบ Fura 2 เกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมส้ม ซึ่งใกล้เคียงกับสีของ Nitrofurantoin จึงไม่สามารถอ่านผลที่ถูกต้องได้ เพราะสีที่เกิดขึ้นจะผิดไปจากความเป็นจริง และยังมีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถใช้ตรวจสอบยาชนิดน้ำได้ เพราะน้ำยาทดสอบซึ่งเป็นของเหลว และยาน้ำจะรวมตัวกันเป็นเนื้อเดียว จึงไม่สามารถอ่านผลได้

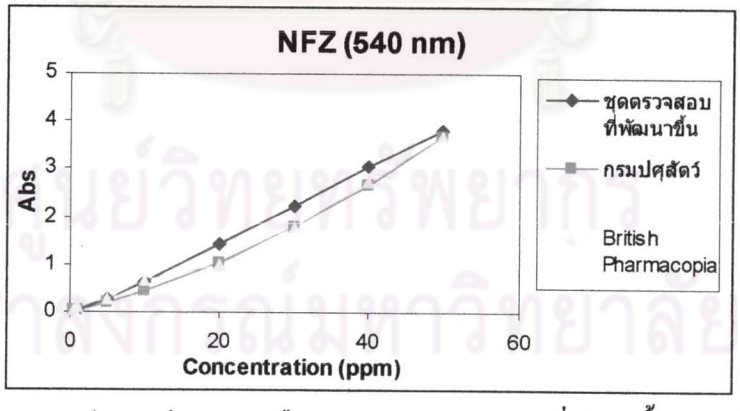
รูปที่ 4.31 แสดงสีของน้ำยาทดสอบของกรมปศุสัตว์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง

จะเห็นได้ว่าผลการเปรียบเทียบข้างต้นเป็นเพียงการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพเท่านั้น หรือทางด้านปริมาณวิเคราะห์เท่านั้น เพราะเนื่องจากว่าชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์ และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีขอบเขตในการตรวจสอบที่เป็นปริมาณวิเคราะห์เพียงอย่างเดียว ไม่ได้ทำการตรวจสอบแบบคุณภาพวิเคราะห์ แต่ในที่นี้ได้ทดลองนำมาทำการตรวจสอบแบบคุณภาพวิเคราะห์ด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความยาวคลื่นสูงสุดและค่าการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 200- 800 นาโนเมตร ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์ และชุดตรวจสอบตามวิธีของหนังสือ British Pharmacopia โดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของไนโตรฟูแรน กับ ค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณหาค่า Linear regression ของ Calibration curve ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.28 ถึง 4.31 และรูปที่ 4.32 ถึง 4.35

ตารางที่ 4.28 แสดงผลการเปรียบค่าการดูดกลืนแสงของ Nitrofurazone ระหว่างชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์ และจากหนังสือ British Pharmacopia

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงของ Nitrofurazone ที่ความยาวคลื่น 540 nm		
	ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น	ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์	ชุดตรวจสอบตามวิธีของ British Pharmacopia
0.5	0.028	0.026	0.026
1	0.052	0.032	0.124
5	0.284	0.195	0.275
10	0.617	0.421	0.658
20	1.413	1.013	0.986
30	2.222	1.79	1.77
40	3.047	2.67	2.743
50	3.825	3.694	3.694
Y =ax +b	Y = 0.0775x - 0.0797	Y = 0.0723x – 0.1841	Y = 0.0707x – 0.099
r^2	0.9987	0.982	0.9784

ที่มา : British Pharmacopia (2003)

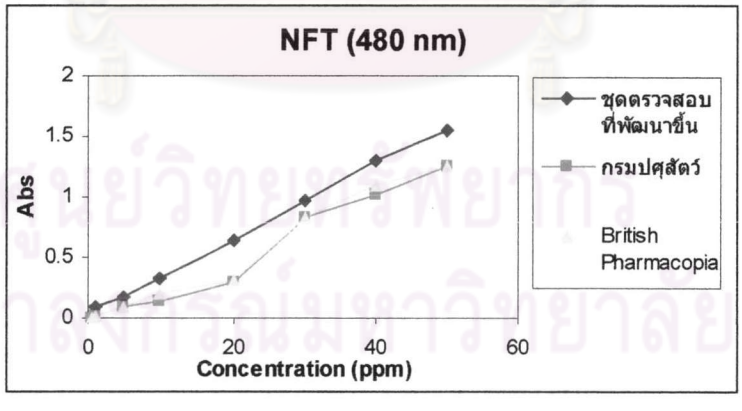


รูปที่ 4.32 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, กรมปศุสัตว์ และ British Pharmacopia ของ Nitrofurazone

ตารางที่ 4.29 แสดงผลการเปรียบค่าการดูดกลืนแสงของ Nitrofurantoin ระหว่างชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์ และจากหนังสือ British Pharmacopia

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงของ Nitrofurantoin ที่ความยาวคลื่น 480 nm		
	ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น	ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์	ชุดตรวจสอบตามวิธีของ British Pharmacopia
0.5	0.012	0.007	0.007
1	0.091	0.011	0.016
5	0.177	0.098	0.088
10	0.324	0.141	0.197
20	0.646	0.3	0.32
30	0.975	0.821	0.821
40	1.3	1.008	1.101
50	1.550	1.248	1.248
Y =ax +b	Y = 0.031x – 0.0255	Y = 0.026x – 0.0551	Y = 0.0266x – 0.0459
r^2	0.9983	0.9734	0.9755

ที่มา : British Pharmacopia (2003)

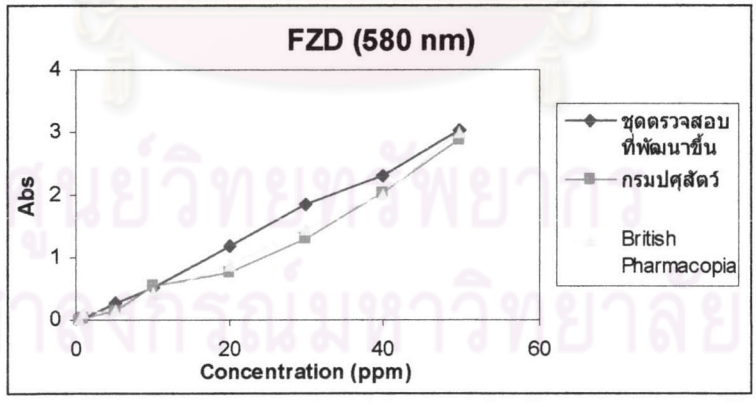


รูปที่ 4.33 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, กรมปศุสัตว์ และ British Pharmacopia ของ Nitrofurantoin

ตารางที่ 4.30 แสดงผลการเปรียบค่าการดูดกลืนแสงของ Furazolidone ระหว่างชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์ และจากหนังสือ British Pharmacopia

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงของ Furazolidone ที่ความยาวคลื่น 580 nm		
	ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น	ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์	ชุดตรวจสอบตามวิธีของ British Pharmacopia
0.5	0.015	0.008	0.002
1	0.034	0.028	0.116
5	0.277	0.137	0.149
10	0.527	0.558	0.432
20	1.179	0.75	0.874
30	1.837	1.301	1.463
40	2.314	2.021	2.001
50	3.039	2.876	3.012
Y =ax +b	Y = 0.0619x – 0.0387	Y = 0.0547x – 0.1096	Y = 0.0567x – 0.1029
r^2	0.9981	0.973	0.9775

ที่มา : British Pharmacopia (2003)

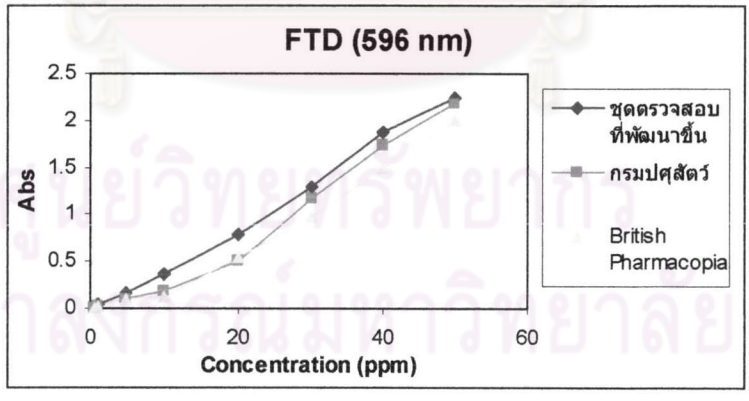


รูปที่ 4.34 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, กรมปศุสัตว์ และ British Pharmacopia ของ Furazolidone

ตารางที่ 4.31 แสดงผลการเปรียบค่าการดูดกลืนแสงของ Furaltadone ระหว่างชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์ และจากหนังสือ British Pharmacopia

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงของ Furaltadone ที่ความยาวคลื่น 596 nm		
	ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น	ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์	ชุดตรวจสอบตามวิธีของ British Pharmacopia
0.5	0.011	0.009	0.009
1	0.035	0.026	0.029
5	0.168	0.091	0.098
10	0.359	0.178	0.116
20	0.794	0.512	0.54
30	1.281	1.168	0.96
40	1.876	1.736	1.49
50	2.231	2.185	2.001
Y =ax +b	Y = 0.0458x – 0.0354	Y = 0.044x – 0.1099	Y = 0.0399x – 0.1254
r^2	0.9967	0.9752	0.9753

ที่มา : British Pharmacopia (2003)



รูปที่ 4.35 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, กรมปศุสัตว์ และ British Pharmacopia ของ Furaltadone

จากตารางที่ 4.28 ถึง 4.31 และรูปที่ 4.32 ถึง 4.35 จะเห็นได้ว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจะให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่ดีที่สุด ในทุกระดับความเข้มข้น และชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจะให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ให้ผลเป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่า correlation coefficient (r^2)เข้าใกล้ 1 มากที่สุด ดังตารางที่ 4.32

ตารางที่ 4.32 แสดงค่า r^2 ของ ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น, กรมปศุสัตว์ และ British Pharmacopia

สาร	ค่า correlation coefficient (r^2)		
	ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น	ชุดตรวจสอบของกรมปศุสัตว์	ชุดตรวจสอบตามวิธีของ British Pharmacopia
Nitrofurazone	0.9987	0.982	0.9784
Nitrofurantoin	0.9983	0.9734	0.9755
Furazolidone	0.9981	0.973	0.9775
Furaltadone	0.9967	0.9752	0.9753

จากการทดลองเปรียบเทียบลักษณะการใช้ และคุณภาพของชุดตรวจสอบสารไนโตรฟูแรนที่พัฒนาขึ้น กับชุดตรวจสอบสารไนโตรฟูแรนที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน พบว่าปัญหาของชุดตรวจสอบสารไนโตรฟูแรนที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน คือ ไม่สามารถอ่านค่าในระดับความเข้มข้นต่ำๆได้ รวมทั้งความไม่แม่นยำ ไม่คงทน ได้ถูกแก้ไขและพัฒนาให้สามารถแก้ปัญหาต่างๆจากชุดตรวจสอบชนิดอื่นๆได้ โดยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจะมีคุณสมบัติที่ดีกว่าชุดตรวจสอบที่เคยใช้กันอยู่เดิม ดังนี้

1. ในด้านความแม่นยำและคงทน ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้วัดปริมาณสารไนโตรฟูแรน ในช่วง 1-100 ppm ได้อย่างแม่นยำ สม่ำเสมอ สีที่เกิดขึ้นเป็นสีที่ชัดเจนแยกได้ง่ายด้วยตาเปล่า (Visual test) โดยความเข้มของสีเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณสารไนโตรฟูแรนที่เพิ่มขึ้น และสีที่เกิดขึ้นนี้จะมีความเสถียรอยู่ได้ประมาณ 10 นาที จากนั้นสีจะค่อยๆจางลงเรื่อยๆ

2. ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มาพร้อมกับแถบเทียบสีมาตรฐานที่ความ

เข้มข้นตั้งแต่ 1-100 ppm ที่ทำขึ้นจากรูปถ่ายของสิ่งที่เกิดขึ้นจริง ที่มีพื้นสีเหมือนของจริงทุกประการ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบชนิดอื่นๆจะแสดงให้เพียงสีตัวอย่างที่จะเกิดขึ้นหลังหยดน้ำยาทดสอบเท่านั้น จึงไม่สามารถระบุว่ามีปริมาณไนโตรฟูแรนอยู่ในระดับใด

3. ความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถวัดได้อย่างแม่นยำ คือ 1 ppm แต่สามารถวัดได้ต่ำสุดถึง 0.5 ppm ส่วนในชุดตรวจสอบชนิดอื่นๆนั้นสามารถอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดได้เพียง 10 ppm เท่านั้น และยังมีข้อจำกัดอื่นๆอีกคือไม่สามารถใช้วัดกับตัวอย่างที่เป็นของเหลวได้ และชุดตรวจสอบบางชนิดยังมีขั้นตอนในการอ่านผลที่ยุ่งยาก คือต้องนำไปตรวจผลกับกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตริโอ (Stereomicroscope) กำลังขยาย 20-40 เท่า ทันทีหลังจากที่โรยสารตัวอย่างไปบนน้ำยาทดสอบ ซึ่งวิธีนี้ในภาคสนามไม่สามารถนำไปใช้งานได้จริง

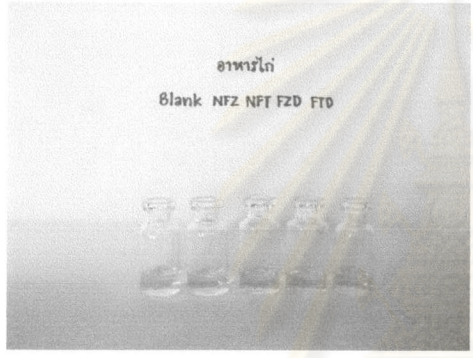
4. ในด้านความคงทน จากการทดสอบความคงทนภายใต้สภาวะต่างๆ น้ำยาสามารถใช้งานได้เหมือนเดิม เป็นเวลาอย่างน้อย 12 เดือน โดยน้ำยาจะคงสภาพ และคงคุณสมบัติในการทดสอบหลังจากการเก็บรักษา ซึ่งจะดีกว่าชุดตรวจสอบชนิดอื่นๆเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน หรือเก็บไว้นอกตู้เย็นน้ำยาจะมีการเปลี่ยนแปลงสี และบางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ก่อนเปิดใช้งาน ซึ่งจะทำให้การอ่านผลการทดสอบผิดพลาดได้

5. ในด้านความเป็นอันตราย น้ำยาของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมากคือมีระดับมลพิษต่อแหล่งน้ำ ในระดับ 1 คือถือว่าเป็นสารก่อมลพิษระดับต่ำ มีแนวโน้มในการสะสมทางชีวภาพต่ำ สามารถกำจัดได้โดยง่าย ไม่ส่งผลอันตรายต่อระบบบำบัดน้ำทิ้ง และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบนิเวศน์ หากมีการใช้และจัดการกับสารเคมีและผลิตภัณฑ์อย่างเหมาะสม แต่น้ำยาทดสอบจะเป็นอันตรายต่อผู้ใช้งานโดยอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อเด็กในครรภ์ อันตรายเมื่อสูดดม เมื่อถูกผิวหนัง และอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อตา ดังนั้นผู้ใช้จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวังไม่ควรสูดดมไอระเหยของน้ำยาทดสอบ (เอกสารข้อมูลความปลอดภัย ตามระเบียบ EC, 1991)

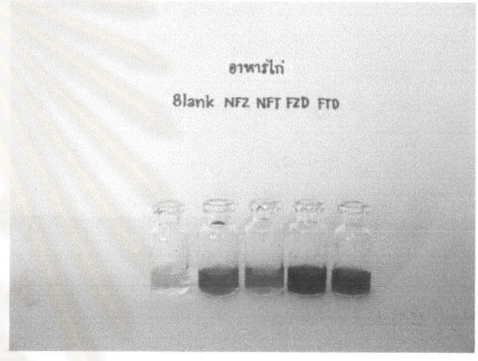
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลตรวจสอบความใช้ได้ (Validation) และประเมินชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างชนิดต่างๆ และหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (%Recovery) เทียบกับเทคนิค HPLC

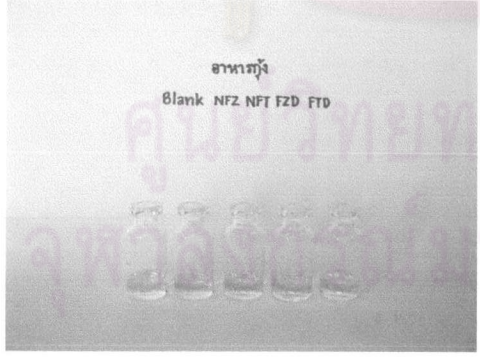
ในการศึกษานี้เป็นการนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมาใช้กับตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่ทำการ Spike สารไนโตรฟูแรนลงไป 0.1 มิลลิกรัม (จะมีสารไนโตรฟูแรนปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างคิดเป็น 50 ppm) ซึ่งพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงสีและมีตะกอนขุ่นเกิดขึ้นหลังเติม 1M KOH/EtOH ซึ่งเกิดจากไขมันในตัวอย่างทำปฏิริยากับ 1M KOH/EtOH จึงต้องนำตัวอย่างมาทำการสกัดด้วย Hexane เพื่อกำจัดไขมันที่มีอยู่ในตัวอย่างชนิดต่างๆให้ออกมาก่อนที่จะหยดน้ำยาทดสอบ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบแสดงได้ดังรูปที่ 4.36 ถึง 4.45 (หมายเหตุ : ทุกตัวอย่างเป็นการตรวจหาสารไนโตรฟูแรนที่เป็น parent drug เท่านั้น)



รูปที่4.36 อาหารไก่เนื้อ
(ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)

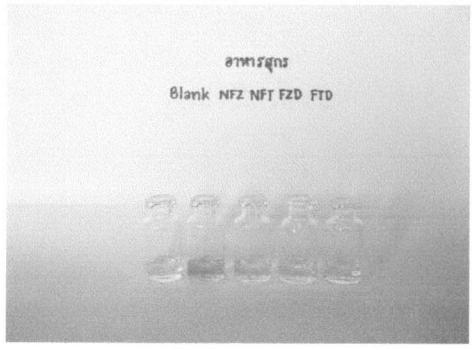


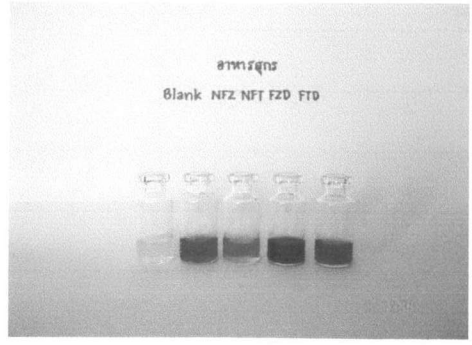
รูปที่4.37 อาหารไก่เนื้อ
(หลังหยดน้ำยาทดสอบ)



รูปที่4.38 อาหารกุ้งกุลาดำ
(ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)

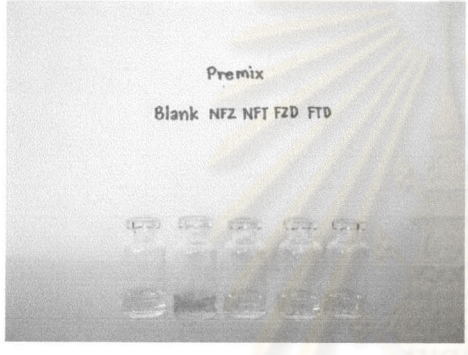
รูปที่4.39 อาหารกุ้งกุลาดำ
(หลังหยดน้ำยาทดสอบ)

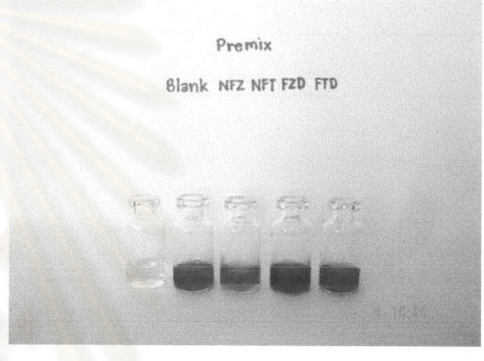




รูปที่4.40 อาหารสุกร
(ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)

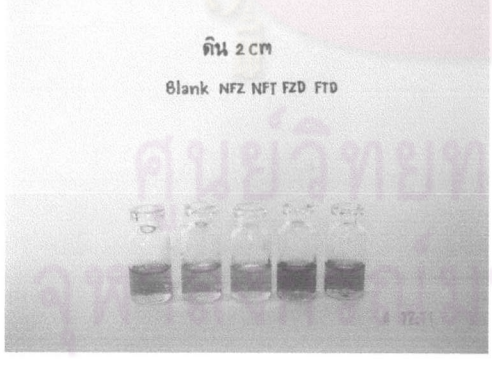
รูปที่4.41 อาหารสุกร
(หลังหยดน้ำยาทดสอบ)

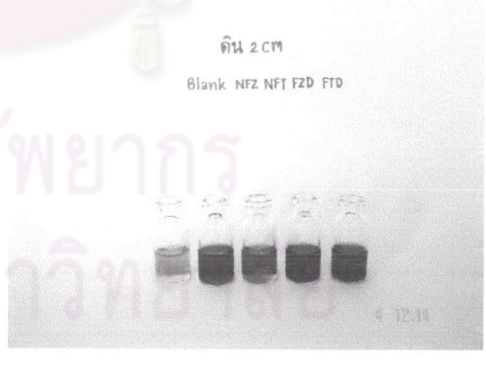




รูปที่ 4.42 Mineral Premix
(ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)

รูปที่ 4.43 Mineral Premix
(หลังหยดน้ำยาทดสอบ)





รูปที่4.44 ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้งระดับความลึก 2 cm
(ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)

รูปที่4.45 ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้งระดับความลึก 2 cm
(หลังหยดน้ำยาทดสอบ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 4.36 ถึง 4.45 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้น้ำยาทดสอบทดลองกับตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่ spike สารกลุ่มไนโตรฟูแรนลงไป 50 ppm จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี โดยสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสีเดียวกับสีของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ได้ทำการศึกษามาแล้วข้างต้น ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้กับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนได้จริง แต่มีข้อจำกัดคือ ถ้าไม่ได้ทำการสกัดด้วย Hexane จะมีตะกอนเกิดขึ้น เนื่องจากน้ำยาทดสอบจะไปทำปฏิกิริยาไขมันและส่วนผสมอื่นๆของตัวอย่างซึ่งสีที่เกิดขึ้นอาจผิดเพี้ยนไปจากความเป็นจริง อีกทั้งยังใช้ตรวจหาสารไนโตรฟูแรนได้เฉพาะที่เป็น parent drug เท่านั้น ไม่สามารถนำไปตรวจหาในรูป metabolite form ได้ เนื่องจากการ metabolite ทำให้เกิดการ Hydrolysis เพื่อตัดหมู่ไนโตรออกไป ซึ่งเป็นจุดที่ Active กับน้ำยาทดสอบ และข้อจำกัดอีกข้อหนึ่งก็คือไม่ควรนำไปใช้กับตัวอย่างที่เป็นดินเพราะสารไนโตรฟูแรนมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นอาจตรวจไม่พบสารไนโตรฟูแรนที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้

4.5.1 ผลการวิเคราะห์หาค่าความแม่นยำ (RSD) และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ด้วยวิธี UV-Visible Spectroscopy

การศึกษานี้เพื่อหาความแม่นยำ (RSD)และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของการสกัดไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ในตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่ spike สารกลุ่มไนโตรฟูแรนลงไป 0.1 มิลลิกรัม แสดงผลการวิเคราะห์ไว้ในตารางที่ 4.33 ถึง 4.36 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4.33 ค่าความแม่นยำ (RSD)และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของ Nitrofurazone ในตัวอย่างชนิดต่างๆด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

No.	ตัวอย่าง	ปริมาณ Nitrofurazone ที่ spike (ppm)	ปริมาณ Nitrofurazone ที่ตรวจพบ (ppm)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	50	47.80±0.09	0.19	95.6
2	อาหารกุ้ง	50	47.63±0.10	0.21	95.26
3	อาหารสุกร	50	47.35±0.06	0.13	94.7
4	Mineral premix	50	48.40±0.06	0.12	96.8
5	ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (2 cm)	50	46.15±0.09	0.21	92.3

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย UV-Visible Spectrophotometer

ตารางที่ 4.34 ค่าความแม่นยำ (RSD)และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของ Nitrofurantoin ใน ตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

No.	ตัวอย่าง	ปริมาณ Nitrofurantoin ที่ spike (ppm)	ปริมาณ Nitrofurantoin ที่ตรวจพบ (ppm)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	50	40.76±0.11	0.27	81.52
2	อาหารกุ้ง	50	45.60±0.05	0.11	91.2
3	อาหารสุกร	50	45.30±0.42	0.95	90.6
4	Mineral premix	50	45.66±0.07	0.14	91.32
5	ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (2 cm)	50	42.56±0.07	0.17	85.12

ตารางที่ 4.35 ค่าความแม่นยำ (RSD)และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของ Furazolidone ใน ตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

No.	ตัวอย่าง	ปริมาณ Furazolidone ที่ spike (ppm)	ปริมาณ Furazolidone ที่ตรวจพบ (ppm)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	50	49.12±0.14	0.28	98.24
2	อาหารกุ้ง	50	49.04±0.12	0.25	98.05
3	อาหารสุกร	50	49.14±0.13	0.27	98.28
4	Mineral premix	50	49.09±0.16	0.32	98.18
5	ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (2 cm)	50	48.74±0.12	0.24	97.48

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย UV-Visible Spectrophotometer

หมายเหตุ : ตัวอย่างก่อนการ spike ตรวจไม่พบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนปนเปื้อนอยู่ เพราะฉะนั้น ปริมาณของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike สารมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0

ตารางที่ 4.36 ค่าความแม่นยำ (RSD)และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของ Furaltadone ใน ตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

No.	ตัวอย่าง	ปริมาณ Furaltadone ที่ spike (ppm)	ปริมาณ Furaltadone ที่ตรวจพบ (ppm)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	50	45.10±0.06	0.12	90.20
2	อาหารกุ้ง	50	46.80±0.07	0.15	93.59
3	อาหารสุกร	50	45.53±0.13	0.28	91.07
4	Mineral premix	50	47.19±0.10	0.22	94.39
5	ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (2 cm)	50	44.79±0.09	0.21	89.58

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย UV-Visible Spectrophotometer

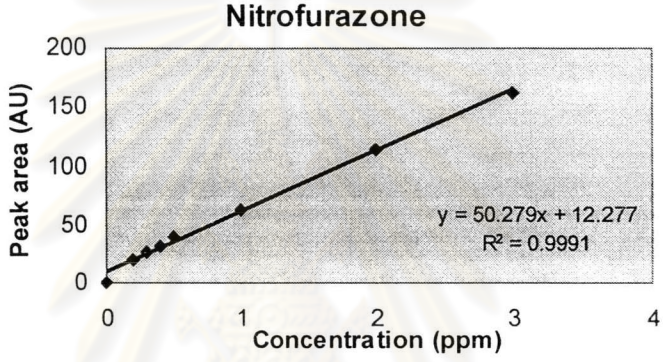
หมายเหตุ : ตัวอย่างก่อนการ spike ตรวจไม่พบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนปนเปื้อนอยู่ เพราะฉะนั้น ปริมาณของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike สารมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0

จากการ spike ไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Nitrofurazone, Nitrofurantoin, Furazolidone และ Furaltadone ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม (คิดเป็น 50 ppm) ลงไปในตัวอย่างชนิดละ 2 กรัม ได้แก่ อาหารไก่, อาหารสุกร, อาหารกุ้ง, พรีมิกซ์, และ ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง ความลึก 2 เซนติเมตร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวัด ของชุดตรวจสอบ (โดยทำการตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมดก่อนทำการ spike และไม่พบการปนเปื้อนไนโตรฟูแรนในตัวอย่าง (Limit of quantitation 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)) พบว่าชุดตรวจสอบเมื่อ spike ไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ลงไปให้ % Recovery อยู่ในช่วง 81-98 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคืออยู่ในช่วง 70-110 % (official journal of the European Communities) โดยที่มี %RSD $\leq$ 10 แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มี Accuracy ดี

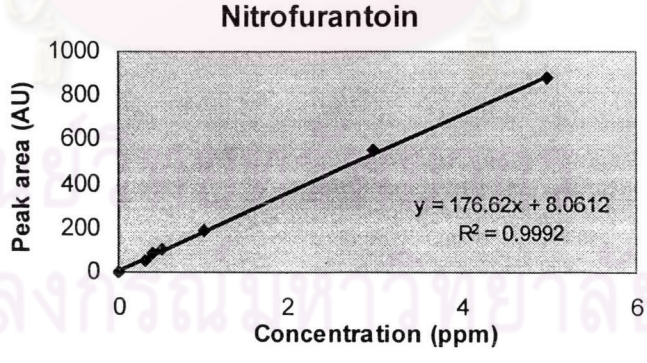
4.5.2 ผลการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดไนโตรฟูแรนด้วย HPLC

4.5.2.1 ผลการศึกษาช่วงการตรวจวัดปริมาณไนโตรฟูแรนที่เหมาะสม

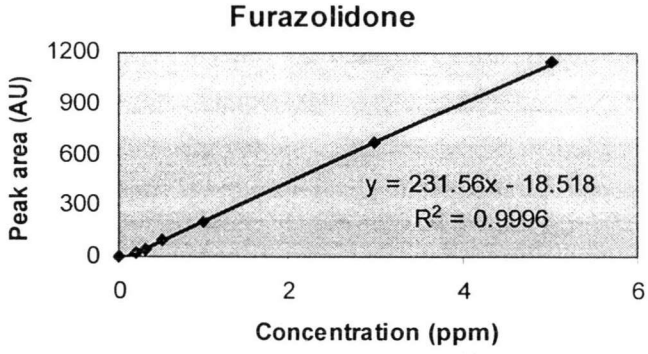
การศึกษานี้เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ที่สามารถตรวจวัดได้ โดยใช้ HPLC พบว่า ที่ความเข้มข้นจาก 0.1–5 ppm สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนได้ โดยกราฟที่ได้เป็นเส้นตรง มีค่า r^2 ดังต่อไปนี้ คือ Nitrofurazone มีค่า r^2 = 0.9991, Nitrofurantoin มีค่า r^2 = 0.9992, Furazolidone มีค่า r^2 = 0.9996 และ Furaltadone มีค่า r^2 = 0.9994 ผลดังแสดงในรูปที่ 4.46 ถึง 4.49



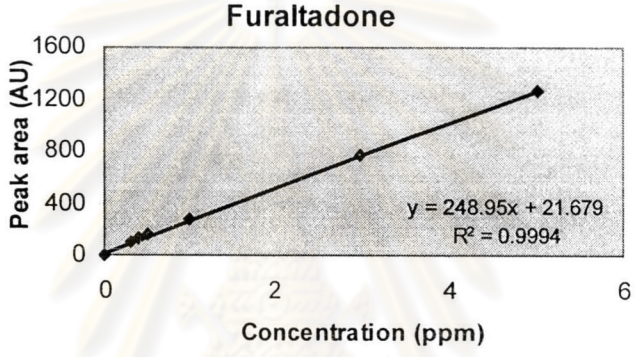
รูปที่ 4.46 Calibration range ของ Nitrofurazone ที่ความเข้มข้น 0.1–5 ppm



รูปที่ 4.47 Calibration range ของ Nitrofurantoin ที่ความเข้มข้น 0.1–5 ppm



รูปที่ 4.48 Calibration range ของ Furazolidone ที่ความเข้มข้น 0.1–5 ppm



รูปที่ 4.49 Calibration range ของ Furaltadone ที่ความเข้มข้น 0.1–5 ppm

4.5.2.2 ผลการวิเคราะห์หาค่าความแม่นยำ (RSD) และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ด้วย HPLC

การศึกษานี้จะนำเอาสารตัวอย่างที่สกัดไว้ จากข้อ 4.5.1 มาปรับความเข้มข้นของสารไนโตรฟูแรนในตัวอย่างให้เป็น 5 ppm ด้วยเมทานอล แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อหาค่าความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ ในรูปของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) และค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ จากค่า %Recovery โดยจะสามารถหาปริมาณสารไนโตรฟูแรนที่วิเคราะห์ได้จากสมการ Linear of regression ที่ได้จากข้อ 4.5.2.1 แสดงผลการวิเคราะห์ไว้ในตารางที่ 4.37 ถึง 3.40

ตารางที่ 4.37 ค่าความแม่นยำ (RSD) และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของ Nitrofurazone ใน ตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วย HPLC

No.	ตัวอย่าง	ปริมาณ Nitrofurazone ที่ spike (ppm)	ปริมาณ Nitrofurazone ที่ตรวจพบ (ppm)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	5	4.02±0.25	6.10	80.44
2	อาหารกุ้ง	5	4.59±0.14	3.07	91.84
3	อาหารสุกร	5	4.29±0.15	3.45	85.76
4	Mineral premix	5	4.66±0.09	1.97	93.24
5	ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (2 cm)	5	4.02±0.17	4.12	80.44

ตารางที่ 4.38 ค่าความแม่นยำ (RSD) และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของ Nitrofurantoin ใน ตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วย HPLC

No.	ตัวอย่าง	ปริมาณ Nitrofurantoin ที่ spike (ppm)	ปริมาณ Nitrofurantoin ที่ตรวจพบ (ppm)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	5	3.95±0.22	5.58	78.96
2	อาหารกุ้ง	5	4.42±0.14	3.14	88.48
3	อาหารสุกร	5	4.06±0.13	3.23	81.13
4	Mineral premix	5	4.54±0.16	3.54	90.72
5	ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (2 cm)	5	4.04±0.20	4.90	80.80

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : ตัวอย่างก่อนการ spike ตรวจไม่พบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนปนเปื้อนอยู่ เพราะฉะนั้น ปริมาณของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike สารมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0

ตารางที่ 4.39 ค่าความแม่นยำ (RSD) และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของ Furazolidone ใน ตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วย HPLC

No.	ตัวอย่าง	ปริมาณ Furazolidone ที่ spike (ppm)	ปริมาณ Furazolidone ที่ตรวจพบ (ppm)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	5	4.40±0.18	4.19	88.08
2	อาหารกุ้ง	5	4.45±0.16	3.67	88.96
3	อาหารสุกร	5	4.37±0.19	4.27	87.4
4	Mineral premix	5	4.65±0.18	3.92	93.0
5	ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (2 cm)	5	4.28±0.16	3.85	85.6

ตารางที่ 4.40 ค่าความแม่นยำ (RSD) และค่าความถูกต้อง (%Recovery) ของ Furaltadone ใน ตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วย HPLC

No.	ตัวอย่าง	ปริมาณ Furaltadone ที่ spike (ppm)	ปริมาณ Furaltadone ที่ตรวจพบ (ppm)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	5	3.62±0.13	3.51	73.76
2	อาหารกุ้ง	5	3.90±0.17	4.36	78.04
3	อาหารสุกร	5	3.74±0.22	5.75	74.76
4	Mineral premix	5	4.20±2.78	2.78	83.96
5	ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (2 cm)	5	3.88±0.19	4.98	77.64

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : ตัวอย่างก่อนการ spike ตรวจไม่พบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนปนเปื้อนอยู่ เพราะฉะนั้น ปริมาณของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike สารมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0

จากการ spike ไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด คือ Nitrofurazone, Nitrofurantoin, Furazolidone และ Furaltadone ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม (คิดเป็น 50 ppm) ลงไปในตัวอย่างชนิดละ 2 กรัม ได้แก่ อาหารไก่, อาหารสุกร, อาหารกุ้ง, พรีมิกซ์, และ ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง ความลึก 2 เซนติเมตร แล้วนำปรับความเข้มข้นจาก 50 ppm ให้เป็น 5 ppm ด้วยเมทานอล เพื่อนำไปหาความสามารถในการตรวจวัด ด้วยวิธี HPLC (โดยทำการตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมดก่อนทำการ spike และไม่พบการปนเปื้อนไนโตรฟูแรนในตัวอย่าง (Limit of quantitation 0.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)) พบว่าเมื่อ spike ไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ลงไปให้ % Recovery อยู่ในช่วง 73-93% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคืออยู่ในช่วง 70-110 % (official journal of the European Communities) โดยที่ %RSD $\leq$ 10 แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มี Accuracy ดี

และเมื่อนำค่า % Recovery ที่ได้การวิเคราะห์ด้วยการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นและด้วยวิธี HPLC มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ค่า % Recovery ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมีค่าสูงกว่า ค่า% Recovery ของ HPLC ซึ่งผลที่ได้นี้อาจเนื่องมาจากสารไนโตรฟูแรนที่ spike ลงในตัวอย่าง อาจมีการสลายตัวก่อนจะนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC เพราะมีการเก็บไว้นาน แต่การวิเคราะห์ด้วยการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนั้นได้ทำการวิเคราะห์ทันทีหลังการสกัด

4.6 ผลการศึกษาปริมาณสารไนโตรฟูแรนในสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive)ที่นำมาผสมในอาหารกุ้ง ตามอัตราส่วนที่เกษตรกรใช้จริง

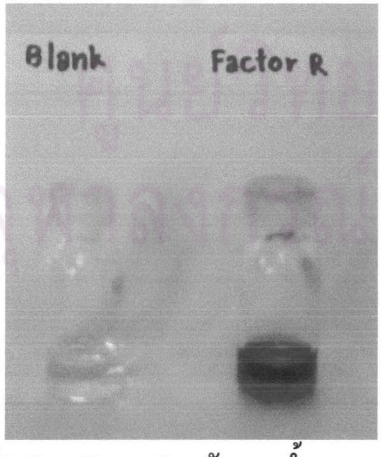
4.6.1 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณไนโตรฟูแรน ที่ผสมอยู่ในสารเติมในอาหารกุ้งชนิดต่างๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน

การศึกษานี้เป็นการนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นไปใช้กับสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ชนิดต่างๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน ว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบยาไนโตรฟูแรนที่ปนเปื้อนอยู่ในยาเหล่านั้นได้หรือไม่ โดยสังเกตด้วยตาเปล่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer และวัดค่าpeak area ด้วย HPLC เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรฟูแรนที่ผสมอยู่ในยาเหล่านั้น ผลที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงได้ ดังตารางที่ 4.41 และดังรูป 4.50และ 4.51

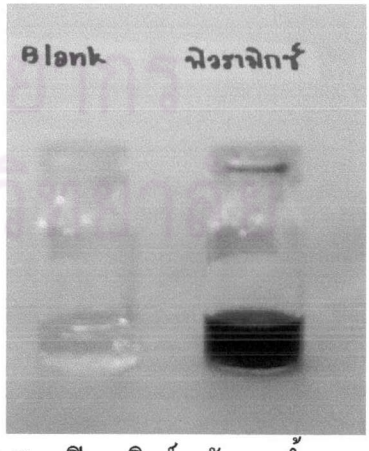
ตารางที่4.41 แสดงสีที่เกิดขึ้นกับสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ชนิดต่างๆ และความเข้มข้นของไนโตรฟูแรนที่คำนวณได้ หลังหยดน้ำยาทดสอบ

No.	ชื่อของยา	สีที่เกิดขึ้น (Visual test)	ความเข้มข้นของสารไนโตรฟูแรน	
			วิเคราะห์ด้วย UV-Vis (ppm)	วิเคราะห์ด้วย HPLC (ppm)
1	Factor R	สีม่วงอมน้ำเงิน	23	29
2	เบต้ามิน	ไม่เปลี่ยนแปลง	ND	ND
3	ซีแมกซ์	”	ND	ND
4	NEU-Prawn1	”	ND	ND
5	แคลฟอร์ต	”	ND	ND
6	LPS	”	ND	ND
7	พาวเวอร์วิท-ซี	”	ND	ND
8	ไฮ-ซัลฟา	”	ND	ND
9	ดูโอซิน	”	ND	ND
10	NEU-Prawn2	”	ND	ND
11	ฟีวรามิกซ์	สีม่วงอมน้ำเงิน	297	280
12	ทอปเปอร์มิน	ไม่เปลี่ยนแปลง	ND	ND

หมายเหตุ : ND = not detected



รูปที่4.50 ยา Factor R หลังหยดน้ำยาทดสอบ



รูปที่4.51 ยาฟีวรามิกซ์ หลังหยดน้ำยาทดสอบ

จากการทดสอบจะเห็นได้ว่ามีสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) 2 ชนิดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีหลังหยดน้ำยาทดสอบ โดยสีที่เกิดขึ้นคือ สีม่วงอมน้ำเงิน ซึ่งก็คือ Factor R และ ฟิวรามิกซ์ จากสีที่เกิดขึ้นพบว่าเป็นสีเดียวกับสีของ Furazolidone เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ายาทั้ง 2 ชนิดนี้ มี Furazolidone ผสมอยู่ เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer พบว่าค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นสูงสุดตรงกับสารละลายมาตรฐานของ Furazolidone และเมื่อนำไปวัดวิเคราะห์ด้วย HPLC ก็สามารถยืนยันได้ว่า Factor R และ ฟิวรามิกซ์ มี Furazolidone ผสมอยู่จริง โดยดูได้ว่า Retention time จะตรงกับสารละลายมาตรฐานของ Furazolidone และเมื่อนำไปคำนวณหาปริมาณ Furazolidone ที่ผสมอยู่ในยา Factor R และ ฟิวรามิกซ์ ด้วยการใช้ UV-Visible Spectrophotometer และ HPLCพบว่า ยา Factor R 100 mgจะมี Furazolidone ผสมอยู่ 23 ppm และ 29 ppm ตามลำดับ และ ฟิวรามิกซ์ 100 mg จะมี Furazolidone ผสมอยู่ 297 ppm และ 280 ppm ตามลำดับ

4.6.2 ผลการศึกษาปริมาณไนโตรฟูแรนที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้ง ตามอัตราส่วนที่เกษตรกรใช้จริง

จากผลการศึกษาปริมาณไนโตรฟูแรนที่ผสมอยู่ในยา Factor R และ ฟิวรามิกซ์ ในข้อ 4.6.1 จึงนำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรฟูแรนที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้งได้โดยใช้อัตราส่วนที่เกษตรกรใช้จริง

การผสมยา Factor R และ ฟิวรามิกซ์ ลงในอาหารกุ้ง ตามอัตราส่วนที่เกษตรกรใช้จริง

- **Factor R**

ในการป้องกันโรคในกุ้ง เกษตรกรใช้ Factor R 500 กรัม ต่ออาหารกุ้ง 50-100 kg (0.01 :1)

ในการรักษาโรคในกุ้ง เกษตรกรใช้ Factor R 500 กรัม ต่ออาหารกุ้ง 50-100 kg (0.02 :1)

หมายเหตุ : อัตราส่วนดังกล่าวมาจากวิธีการใช้ที่ฉลากยา

- **ฟิวรามิกซ์**

ในการป้องกันโรคในกุ้ง เกษตรกรใช้ ฟิวรามิกซ์ 2 กรัม ต่ออาหารกุ้ง 1 kg (0.002 :1)

ในการรักษาโรคในกุ้ง เกษตรกรใช้ ฟิวรามิกซ์ 4 กรัม ต่ออาหารกุ้ง 1 kg (0.004 :1)

หมายเหตุ : อัตราส่วนดังกล่าวมาจากวิธีการใช้ที่ฉลากยา

ปริมาณของฟูราโซลิโดนที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้งที่ถูกใช้ไปในการป้องกันและรักษาโรคในกุ้งจะมีค่าแสดงดังตารางที่ 4.42

ตารางที่4.42 แสดงปริมาณของ Furazolidoneที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้งเพื่อการป้องกันและรักษาโรคกุ้ง โดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer และ HPLC

ชนิดของยา	ความเข้มข้นของ Furazolidone ในอาหารกุ้ง (ppm)	
	โดยใช้ UV-Vis.	โดยใช้ HPLC
Factor R		
- ป้องกัน	0.23	0.29
- รักษา	0.46	0.58
ฟิวรามิกซ์		
- ป้องกัน	0.594	0.560
- รักษา	1.188	1.120

จากตารางทำให้ทราบว่าปริมาณ Furazolidone ใน Factor ที่นำมาผสมในอาหารกุ้งเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในกุ้งโดยใช้ UV-Visible S Spectrophotometer จะมีปริมาณเท่ากับ 0.23 และ 0.46 ppm ตามลำดับ และโดยใช้ HPLC จะมีปริมาณเท่ากับ 0.29 และ 0.58 ppm ตามลำดับ ส่วนในฟิวรามิกซ์โดยใช้ UV-Visible S Spectrophotometer จะมีปริมาณเท่ากับ 0.594 และ 1.188 ppm ตามลำดับ และโดยใช้ HPLC จะมีปริมาณเท่ากับ 0.560 และ 1.120 ppm ตามลำดับ

4.7 การศึกษาการรบกวนที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบ

4.7.1 ผลการหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

เป็นการศึกษาเพื่อหาความผิดพลาด (False positive) ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับสารในหมู่ฟังก์ชันต่างๆ โดยหมู่ฟังก์ชันที่เกิด False positive กับชุดตรวจสอบ คือ Acetaldehyde (Aldehyde) เปลี่ยนเป็น สารละลายสีแดง และ Acetone (Ketone) เปลี่ยนเป็น สารละลายใสสีเขียวอ่อน ส่วนผลการทดสอบกับหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ แสดงได้ดังตารางที่ 4.43

ตารางที่4.43 แสดงผลการหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

No.	ชื่อสาร	หมู่ฟังก์ชัน	การเปลี่ยนแปลง
1	Metanol	Alcohol	ไม่เปลี่ยนแปลง
2	Ethanol		"
3	Phenol	Phenol	"
4	β-napthol		"
5	Chloroform	Alkly halide	"
6	Acetaldehyde	Aldehyde	สารละลายสีแดง
7	Acetone	Ketone	สารละลายใสสีเขียวอ่อน
8	Acetic acid	Carboxylic acid	ไม่เปลี่ยนแปลง
9	Ethylacetate	Ester	"
10	Ethylamine	1°amine	"
11	n-butylamine		"
12	Aniline		"
13	Diethylamine	2°amine	"
14	n-methylaniline		"
15	N,n-dimethylaniline	3°amine	"
16	Ethylenediamine	1°amine	"
17	Pyridine	3°amine	"
18	Urea	amide	"
19	Acetonitrile	R-nitrile	"
20	น้ำตาลทราย (disaccharide)	Carbohydrate	"

จากตารางที่ 4.43 พบว่าเมื่อหยดน้ำยาทดสอบลงไปจะมีสารที่อยู่ในหมู่ฟังก์ชัน Aldehyde และ Ketone เท่านั้นที่มีการเปลี่ยนสี แต่จะเห็นได้ว่าสีที่เกิดขึ้นนั้นจะต่างกับสีที่เกิดขึ้นหลังหยดน้ำยาทดสอบของสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด เพราะฉะนั้นสีที่เกิดขึ้นจึงไม่ใช่ข้อผิดพลาดของชุดตรวจสอบ หรืออาจกล่าวได้ว่าสารตามหมู่ฟังก์ชันต่างๆไม่เกิด False positive กับน้ำยาทดสอบ

4.7.2 ผลการหา False positive กับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

เป็นการศึกษาเพื่อหาความผิดพลาด (False positive) ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล และยาปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ซึ่งเมื่อทดสอบแล้วพบว่า ยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดนี้ไม่เกิด False positive กับชุดตรวจสอบ

ตารางที่4.44 แสดงผลการหา False positive กับปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

No.	ชื่อสาร (0.1 mg)	การเปลี่ยนแปลงหลังหยดน้ำยาทดสอบ
1	• กลุ่มคลอแรมฟินิคอล - คลอแรมฟินิคอล	ไม่เปลี่ยนแปลง
2	• กลุ่มฟลูออโรควิโนโลน - นอฟล็อกซาซิน - ฟลูมิควิน	ไม่เปลี่ยนแปลง "

4.7.3 ผลการหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

เป็นการศึกษาเพื่อหาความผิดพลาด (False positive) ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา โดยผลที่สังเกตได้หลังการใช้น้ำยาทดสอบพบว่ายาทุกชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลง แต่จะมียาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาเพียง 3 ชนิด ที่ให้ผลเช่นเดียวกับไนโตรฟูแรน นั่นคือ Ocean free ,ยาฆ่าเชื้อโรคสำหรับสัตว์น้ำ จะเกิดสีน้ำตาล ซึ่งเป็นสีที่เปลี่ยนไปของ Nitrofurantoin หลังหยดน้ำยาทดสอบ และ Super Ich จะเกิดสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นสีที่เปลี่ยนไปของ Furatadone หลังหยดน้ำยาทดสอบ นั่นก็แสดงว่ายาทั้ง 3 ชนิดนี้ เกิด False positive กับน้ำยาทดสอบ ผลที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังตารางที่ 4.45 และ รูปที่ 4.52 ถึง4.53

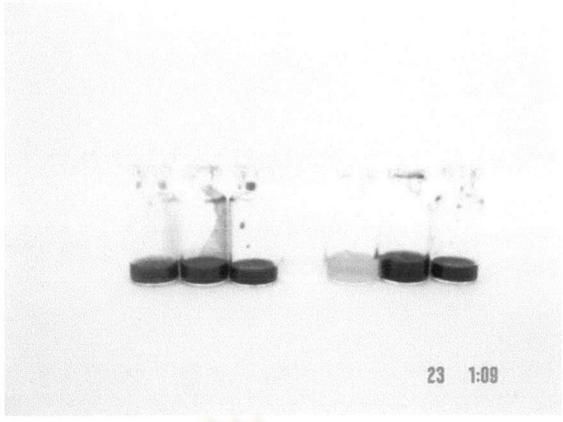
ตารางที่4.45 แสดงผลการหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

No.	ชื่อยา	สีของยาก่อนการหยดน้ำยาทดสอบ	การเปลี่ยนแปลงหลังหยดน้ำยาทดสอบ	False positive
1	Ocean free	สารละลายสีเขียวอ่อน	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน	Yes
2	Rot stop	สารละลายสีเขียวเข้ม	สารละลายใส ไม่มีสี	No
3	Super Ich	สารละลายสีเขียวเข้ม	สารละลายสีน้ำเงิน	Yes
4	Nalixin	สารละลายใส ไม่มีสี	ไม่เปลี่ยนแปลง	No
5	เยลโรว์ ลิควิด	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีส้ม	No
6	มาลาไคท์ กรีน เอฟ	สารละลายสีเขียวเข้ม	ไม่เปลี่ยนแปลง	No
7	ยาฆ่าเชื้อโรคสำหรับสัตว์น้ำ	สารละลายสีเขียวเข้ม	สารละลายสีน้ำตาล	Yes

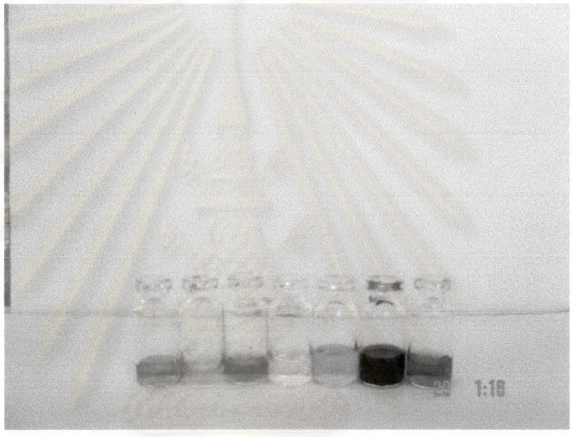
ที่มา : จากการสังเกตด้วยตาเปล่า (Visual test)

จากผลที่เกิดขึ้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าจะมีสารไนโตรฟูแรนผสมอยู่จริงหรือไม่ นอกจากนี้สำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาเหล่านั้นมีการเติมสีลงไป ซึ่งสีเหล่านั้นอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีหลังหยดน้ำยาทดสอบได้ ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาทางปรับปรุงแก้ไข ข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้น ต่อไป เนื่องจากยาเหล่านี้มีการเติมสีลงไปด้วย ซึ่งอาจทำให้ไปรบกวนน้ำยาทดสอบ จนทำให้การอ่านสีผิดพลาดไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.52 สีของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาก่อนการหยดน้ำยาทดสอบ



รูปที่ 4.53 สีของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาหลังการหยดน้ำยาทดสอบ

4.8 การปรับปรุง แก้ไข ข้อผิดพลาดที่อาจมีขึ้น เช่น กรณีพบผลบวกลวง (False positive)

จากการศึกษาการรบกวนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ชุดตรวจสอบ จากข้อ 4.7 พบว่ามีสารตัวอย่างบางชนิดที่เกิดผลเป็นFalse positive กับน้ำยาทดสอบ ดังนั้นจึงต้องใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งมี Silica gel เป็นตัวดูดซับ และมี Acetronitrile เป็นตัวชะ (eluent phase) และใช้ UV เข้ามาช่วยในการอ่านผล โดยนำค่า R_f (Relative of the front) ที่วัดได้มาเทียบกับค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้น 1000 ppm ดังตารางที่ 4.46 และ 4.47

ตารางที่ 4.46 แสดงค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้น 1000 ppm

ครั้งที่	ค่า R_f ที่วัดได้ (cm)			
	Nitrofurazone	Nitrofurantoin	Furazolidone	Furaltadone
1	0.75	0.85	0.8	0.7
2	0.75	0.95	0.9	0.75
3	0.75	0.9	0.85	0.75
ค่าเฉลี่ย	0.75	0.9	0.85	0.73
SD	0	0.05	0.05	0.03
RSD	0	5.56	5.88	4.11

ตารางที่ 4.47 แสดงค่า R_f ของสารตัวอย่างที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีหลังหยดน้ำยาทดสอบ

No.	ชื่อสารตัวอย่าง	ค่า R_f ที่วัดได้ (cm) (n=3)
1	Acetone	-
2	Acetaldehyde	-
3	Ocean free	0.85
4	Rot stop	-
5	Super Ich	0.70
6	Nalixin	-
7	เยลโรว์ ลิควิด	-
8	มาลาไคท์ กรีน เอฟ	-
9	ยาฆ่าเชื้อโรคสำหรับสัตว์น้ำ	0.85

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย TLC

เมื่อนำค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน มาเทียบกับ ค่า R_f ของสารตัวอย่างที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีหลังหยดน้ำยาทดสอบ พบว่า ค่า R_f ของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา ได้แก่ Ocean free, Rot stop, Super Ich,เยลโรว์ ลิควิด และยาฆ่าเชื้อโรคสำหรับสัตว์น้ำ มีค่า

ใกล้เคียงกับค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน เป็นการยืนยันว่ายาดังกล่าวมีอาจจะสารกลุ่มไนโตรฟูแรนผสมอยู่ด้วย

จากการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่ายาที่นำมาทดสอบให้ผล positive กับ ชุดตรวจสอบแม้ว่าสีที่เกิดขึ้นจะเพี้ยนไปบ้าง และการทดสอบด้วย TLC ก็ยืนยันผล positive เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ได้ทำการใช้ถ่านกัมมันต์ (Activated Carbon) เพื่อกำจัด Interference จากสีที่เติมแต่งลงไปในยาดังกล่าวก่อนที่จะนำมาหยดน้ำยาทดสอบ แต่พบว่าเมื่อกำจัดสีหมดไป และนำมาหยดน้ำยาทดสอบก็ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสี เพราะฉะนั้นจึงอาจจะกล่าวได้ว่าข้อจำกัดของน้ำยาทดสอบนี้คือไม่สามารถใช้ได้กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาที่มีการเติมสีลงไป เนื่องจากจะไปรบกวนสีที่เกิดขึ้นทำให้สีที่เกิดขึ้นผิดเพี้ยนไป ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดของสารไนโตรฟูแรนได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย