บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการศึกษา

จากข้อจำกัดของชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 งานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรน ด้วยวิธีคัลเลอริเมริก ซึ่งสามารถใช้ตรวจหาสารกลุ่มไนโตรฟูแรนได้ในระดับที่ต่ำ ใช้งานได้ง่าย และมีความเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการศึกษา ดังต่อไปนี้

3.1 ขั้นตอนการศึกษา

3.1.1 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยวิธีต่างๆ ที่สภาวะเหมาะสม

3.1.2 การตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน

3.1.3 การสร้างแถบสีมาตรฐาน

3.1.4 การเปรียบเทียบการเกิดสีของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน

3.1.5 การตรวจสอบความใช้ได้ (Validation) และประเมินผลชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างชนิดต่างๆ และหาเปอร์เซ็นต์กลับคืน (% recovery) เทียบกับเทคนิค HPLC

3.1.6 การศึกษาการเกิดสีกับยาสำหรับสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ชนิดต่างๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน

3.1.7 การศึกษาสิ่งที่รบกวน ที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบ

3.1.8 การปรับปรุง แก้ไข ข้อผิดพลาดที่อาจมีขึ้น เช่น กรณีพบผลบวกลวง (False positive)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่

- Nitrofurazone
- Nitrofurantoin
- Furazolidone
- Furaltadone
- Potassium hydroxide
- Sodium hydroxide
- *N,N* - Dimethylformamide (AR grade)
- Acetronitrile (HPLC grade)
- Ethanol (HPLC grade)
- Methanol (HPLC grade)
- n-Hexane (AR grade)
- Sodiun acetate (AR grade)
- Acetic acid (AR grade)
- Ethylenediamine (AR grade)
- Ethyl Acetate (HPLC grade)
- Chloroform (HPLC grade)
- Dimethylsulfoxide (AR grade)
- Ferrous sulfate reagent
- Ammonium Chloride (NH_4Cl)
- Zn Powder
- Tollen's reagent

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.3.1 อุปกรณ์

- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25, 50, 100 มิลลิลิตร

- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5, 10, 25, 100 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- กระดาษกรอง (Filter paper) Whatman เบอร์ 1
- กรวยกรอง (Funnel filter)
- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10 มิลลิลิตร
- ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต (Micro pipette) ขนาด 20-200 µl, 100-1000 µl
- ทิปสำหรับไมโครปิเปต
- โกร่งบดยา
- หลอดเหวี่ยง (centrifuge tube) ชนิด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร
- กระจกนาฬิกา (Watch glass dish)
- หลอดหยด (Droper)
- แผ่น TLC aluminium sheets, Silica gel 60 F_{254} ของ Merck

3.3.2 เครื่องมือวิจัย

- เครื่องชั่งชนิดละเอียด AB204-S ของ Mettler Toledo
- เครื่องชั่งชนิดละเอียดรุ่น BP211D ของ Sartorius
- เครื่อง UV-Visible spectrophotometer ของ Varian รุ่น Cary 50 Probe
- เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น IEC : SER 42900961
- เครื่อง HPLC ชนิด Photodiode Array Detecter ของ Varian พร้อมด้วย คอลัมน์ Hypersil BDS C18 ของ Thermo Hypersil-Keystone
- เครื่อง Vortex รุ่น Vortex-2 Genie
- เครื่องเขย่า (Shacker) ของ GFL®3015

3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย มีขั้นตอนดังนี้

3.4.1 การเตรียมการทดลอง

3.4.1.1 การเตรียมสารละลาย

3.4.1.1.1 1 M Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 5.611 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.2 1 M Ethanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 5.611 กรัม ละลายในเอทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.3 0.5 M Ethanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 2.8055 กรัม ละลายในเอทานอลปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.4 0.1 M Ethanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 0.5611 กรัม ละลายในเอทานอลปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.5 2 M Ethanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 11.222 กรัม ละลายในเอทานอลปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.6 3 M Ethanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 16.833 กรัม ละลายในเอทานอลปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.7 4 M Ethanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 22.444 กรัม ละลายในเอทานอลปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.1.1.8 5 M Ethanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 28.055 กรัม ละลายในเอทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.9 1 M Methanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่ง โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 5.611 กรัม ละลายในเมทานอลปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.10 1 M Sodium Hydroxide

ชั่ง โซเดียม ไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.11 1 M Methanolic Sodium Hydroxide

ชั่ง โซเดียม ไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.12 น้ำกลั่น สำหรับ HPLC

นำน้ำดีไอออไนซ์มากรองผ่านพอลิเมอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และไล่อากาศออกภายใต้ระบบสุญญากาศนาน 15 นาทีก่อนใช้

3.4.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน (Standard solution) สำหรับใช้ทดสอบการเกิดสี และใช้กับเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

3.4.1.2.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 1,000 ppm

ชั่งสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด คือ Furaltadone (FTD), Furazolidone (FZD), Nitrofurantoin (NFT), Nitrofurazone (NFZ) ชนิดละ 0.025 กรัม นำมาละลายด้วย Dimethylformamide(DMF) แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm

ปิเปตสารละลายสต็อกไนโตรฟูแรน 1,000 ppm ทั้ง 4 ชนิด คือ Furaltadone (FTD), Furazolidone (FZD), Nitrofurantoin (NFT), Nitrofurazone (NFZ) ชนิดละ 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Dimethylformamide(DMF) ให้ได้ 25 มิลลิลิตร

3.4.1.2.2 Working standard solution ความเข้มข้น 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 และ 0.01 ppm

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 50 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 40 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 30 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 20 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 10 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 0.5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 10 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 0.1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 10 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMF

3.4.1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน (Standard solution) สำหรับใช้กับเครื่อง HPLC

3.4.1.3.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 1,000 ppm

ชั่งสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด คือ Furaltadone (FTD), Furazolidone (FZD), Nitrofurantoin (NFT), Nitrofurazone (NFZ) ชนิดละ 0.025 กรัม นำมาละลายด้วย Dimethylformamide (DMF) 1 มิลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm

ปิเปตสารละลายสต็อกไนโตรฟูแรน 1,000 ppm ทั้ง 4 ชนิด คือ Furaltadone (FTD), Furazolidone (FZD), Nitrofurantoin (NFT), Nitrofurazone (NFZ) ชนิดละ 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ให้ได้ 25 มิลลิลิตร

3.4.1.3.2 Working standard solution ความเข้มข้น 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 ppm

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 10 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 100 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 10 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 4 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 10 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 3 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 10 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 2 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 10 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 5 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 0.5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 1 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 0.4 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 1 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 0.3 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 1 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 0.2 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 1 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

- สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 0.1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 0.5 ppm ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

3.4.2 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยวิธีต่างๆ ที่สภาวะเหมาะสม

3.4.2.1 การทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยตรงกับสารกลุ่มไนโตรฟูแรน

โดยเลือกใช้ Reagent และ Complexing agents ที่เหมาะสม ที่สามารถเกิดการเปลี่ยนสีได้ดีที่สุด ดังการทดลองต่อไปนี้

3.4.2.1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารกลุ่มไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด

ชั่งสารตัวอย่างไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 0.1 mg ลงในหลอดทดลอง และเติม DMSO, DMF, Methanol, Acetronitrile และ Ethylacetate ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการละลาย

3.4.2.1.2 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยใช้ DMSO, DMF, Methanol และ Acetronitrile เป็นตัวทำละลาย และเติม Ethanolic Potassiumhydroxide (KOH/EtOH)

นำสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดมาชนิดละ 0.1 mg เติม DMSO, DMF, Methanol และ Acetronitrile 1 ml และเติม 1M KOH/EtOH ลงไป100 µl สังเกตการเปลี่ยนแปลง

จากนั้นทำการยืนยันผล โดยทำการเตรียมสารลายไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 20 ppm โดยใช้ DMSO, DMF, Methanol และ Acetronitrile เป็นตัวทำละลาย และนำสารลายตัวอย่างที่เตรียมไว้มาชนิดละ 2 ml และเติม 1M KOH/EtOH ลงไป 200 µl นำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

3.4.2.1.3 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ complexing agent ต่อไปนี้ 1 M Ethanolic Potassiumhydroxide (1M KOH/EtOH), 1 M Methanolic Potassiumhydroxide (1M KOH/MeOH), 1 M Ethanolic Sodiumhydroxide (1M NaOH/EtOH), 1 M Methanolic Sodiumhydroxide (1M NaOH/MeOH), 1 M Potassiumhydroxide (1M KOH) และ 1M Sodiumhydroxide (1M NaOH)

นำสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดมาชนิดละ 0.1 mg และเติม 1 M KOH/EtOH, 1M KOH/MeOH, 1 M NaOH/EtOH, 1 M NaOH/MeOH, 1 M KOH และ 1M NaOH ลงไปชนิดละ 1 ml สังเกตการเปลี่ยนแปลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2.1.4 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ 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)

ชั่งสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดชนิดละ 100-0.01 ug เติม DMF ลงไป 1 ml และเติม 1 M KOH/EtOH, 1 M KOH/MeOH, 1 M NaOH/EtOH, 1 M NaOH/MeOH และ 1 M KOH และ 1M NaOH ลงไป100 µl สังเกตการเปลี่ยนแปลง และเลือก complexing agent ที่ดีที่สุด เพื่อนำไปศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

3.4.2.1.5 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ DMF และ KOH/EtOH ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม

ทำการเตรียมสารทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 20 ppm โดยใช้ DMF เป็นตัวทำละลาย และนำสารลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 20 ppm ที่เตรียมได้มา 2 ml และเติม KOH/EtOH ซึ่งเป็น complexing agent ที่ดีที่สุด โดยนำมาเตรียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 M ตามลำดับ ลงไป 200 µl สังเกตการเปลี่ยนแปลง และทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

3.4.2.1.6 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง DMF กับ KOH/EtOH ที่ความเข้มข้นที่ได้จากผลการศึกษาข้อ 3.4.1.2.5

ทำการเตรียมสารทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 20 ppm โดยใช้ DMF เป็นตัวทำละลาย และนำสารลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน 20 ppm ที่เตรียมได้มา 2 ml และเติม KOH/EtOH ที่ความเข้มข้นที่ได้จากผลการศึกษาข้อ 3.4.1.2.5 ลงไป 2 ml, 1 ml, 500 µl, 200 µl, 100 µl และ50 µl ตามลำดับ จากนั้นจึงนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

3.4.2.2 การศึกษาทำปฏิกิริยาการเกิดสีของสารไนโตรฟูแรนโดยการทดสอบหมู่ฟังก์ชันก์

3.4.2.2.1 การทดสอบสารประกอบไนโตรอะโรมาติก

3.4.2.2.1.1 วิธีFerrous hydroxide test ($Fe(OH)_2$ test)

นำสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 2 หยด ลงใน ferrous sulfate reagent 1 ml ในหลอดทดลอง เติม KOH/EtOH solution 0.7 ml เขย่าแรงๆและทดสอบว่าสารละลายเป็นด่างหรือไม่ ถ้ายังไม่เป็นให้เติม KOH/EtOH solution ลงไปอีกจนเป็นด่าง สังเกตสีของตะกอนในระยะเวลา 1 นาที (เผด็จ, 2539)

3.4.2.2.1.2 วิธี Zn/NH_4Cl test

นำสารนำสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 2 หยด มาละลายใน 50%Ethanol 2 ml เติม NH_4Cl และผง Zn อย่างละ 0.1g เขย่าและต้มให้เดือด ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นประมาณ 5 นาที กรองสารละลายแล้วจึงมาทดสอบกับ Tollen's reagent สังเกตการเปลี่ยนแปลง (เผด็จ, 2539)

3.4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดสารไนโตรฟูแรนโดยวิธี Colorimetric

3.4.3.1 ผลการศึกษาช่วงการตรวจวัดปริมาณสารไนโตรฟูแรนที่เหมาะสม

ทำการตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิด ที่มี DMF เป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นในช่วง 100 ppb ถึง 100 ppm และเติม 1M KOH/EtOH โดยใช้อัตราส่วนของสารละลายมาตรฐานต่อ 1M KOH/EtOH เป็น 10:1 สังเกตสีที่เกิดขึ้นโดยเทียบความเข้มของสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Visual test) และนำไปยืนยันความถูกต้องด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200 – 800 นาโนเมตร

จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของไนโตรฟูแรน กับ ค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณหาค่า Linear regression ของ Calibration curve

3.4.4 การสร้างแถบสีมาตรฐาน

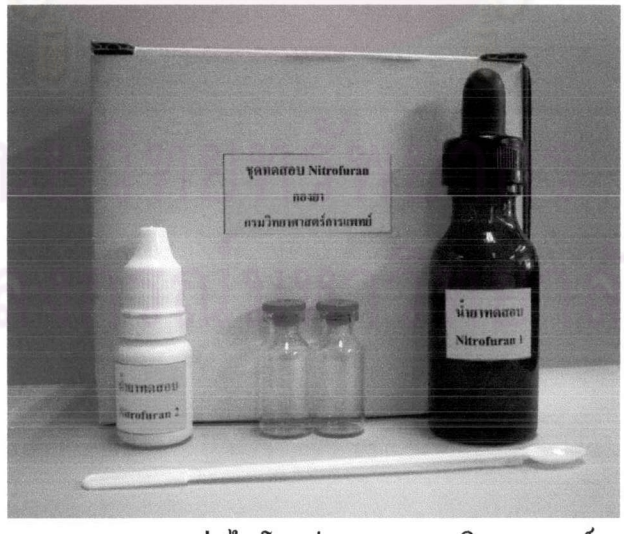
นำผลความเข้มของสีที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าจากข้อ 3.4.3 มาทำการสร้างแถบสีมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการเทียบสีจากสีที่เกิดขึ้นจริง

3.4.5 การเปรียบเทียบชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน

ชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนโดยวิธีคัลเลอริเมตริกที่มีจำหน่ายในประเทศไทยมีอยู่ 2 ชนิด คือ ชุดทดสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และชุดทดสอบชนิดยาในอาหารสัตว์ของกรมปศุสัตว์ โดยชุดทดสอบทั้งสองชนิดนี้มีระดับต่ำสุดที่ตรวจสอบได้เท่ากันคือ 10 ppm และมีน้ำยาทดสอบชนิดขวดคู่เหมือนกัน มีวิธีการใช้ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน

1. ชุดทดสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จะใช้น้ำยาทดสอบไนโตรฟูแรน1 1ml ใส่ลงในสารตัวอย่างปริมาณครึ่งเมล็ดถั่วเขียว ใส่ในขวดไวแอลและหยดน้ำยาไนโตรฟูแรน2 ตามลงไป 2-3 หยด และสังเกตสีที่เกิดขึ้นซึ่งจะมีตัวอย่างสีของสารไนโตรฟูแรนชนิดต่างๆแนบมาด้วย



รูปที่3.1 ชุดทดสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. ชุดทดสอบชนิดยาในอาหารสัตว์ของกรมปศุสัตว์

จะใช้น้ำยาทดสอบ Fura 1 18 หยดลงในจานหลุมและหยดน้ำยาทดสอบ Fura 2 2 หยด แล้วจึงโรยตัวอย่างกระจายให้ทั่วหลุม และต้องตรวจผลทันทีด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตริโอ กำลังขยาย 20-40 เท่า โดยจะมีคู่มือและแผ่นตรวจสอบชนิดยาในอาหารสัตว์แนบมาด้วย

<u>รูปที่3.2</u> ชุดทดสอบชนิดยาในอาหารสัตว์ของกรมปศุสัตว์

ทำการทดลองเปรียบเทียบ เพื่อเปรียบเทียบลักษณะการใช้ และคุณภาพของชุดตรวจสอบ รวมถึงการเกิดสีของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจสอบสารไนโตรฟูแรนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และกรมปศุสัตว์และทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer แต่เนื่องจากว่าชุดตรวจสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีปริมาณน้ำยาทดสอบไม่เพียงพอต่อการนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer จึงนำเอาวิธีการทดสอบตัวยากลุ่มไนโตรฟูแรนจากหนังสือ British Pharmacopia มาทดลองเปรียบเทียบแทน เนื่องจากได้ทดสอบแล้วว่าใช้น้ำยาทดสอบชนิดเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ (Validation) และนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมาใช้กับตัวอย่างชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี UV-Visible Spectroscopy

3.4.6.1 ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ มีดังนี้

- อาหารไก่เนื้อ (แรกเกิด-3 สัปดาห์)
  เป็นอาหารสัตว์สำเร็จรูปชนิดเม็ด ของบริษัทแหลมทอง

- อาหารสุกร (แรกเกิด-15 kg)
  เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด ของบริษัทแหลมทอง

- อาหารกุ้งกุลาดำ (ขนาด 6-12 g)
  เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดจม ชื่อทางการค้า "โปรฟีด3 แอล"

- mineral premix
  เป็นแร่ธาตุสำหรับสัตว์ ของบริษัทแชมเปียนฟาร์มา จำกัด

- ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง (ระดับความลึก 2 cm)
  จากจังหวัดฉะเชิงเทรา เก็บโดยใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างดินตามระดับความลึก (Core sampler) ทำจากพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ½ นิ้ว และมีความยาว 30 เซนติเมตร

1. ชั่งอาหารสัตว์ชนิดต่างๆ, premix และ ดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่บดละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน อย่างละ 2 g ลงในบีกเกอร์ (ตัวอย่างละ 5 บีกเกอร์)
2. splike สารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดลงไปในตัวอย่างชนิดต่างๆชนิดละ 0.1 mg จำนวน 4 บีกเกอร์ และสำหรับเป็น Blank 1 บีกเกอร์ เพื่อใช้เปรียบเทียบ (สารไนโตรฟูแรนที่ทำการspike ลงไปในตัวอย่างชนิดต่างๆจะมีความเข้มข้น 50 ppm)
3. เติม Hexane 10 ml ลงไปในบีกเกอร์ นำไปเข้าเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเทสารละลายของ Hexane ทิ้งไป
4. สกัดตัวอย่างซ้ำด้วย Haxane อีก 2 ครั้ง ตามขั้นตอนในข้อ 3 และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนตัวอย่างแห้งสนิท

5. นำบีกเกอร์จากข้อ 4 มาเติม DMF 10 ml และนำไปเข้าเครื่องเขย่า เป็นเวลา 5 นาที ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 กรองเฉพาะส่วนใสเก็บไว้

6. นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดมา 1 ml เติม 1M KOH/EtOH 100 µl เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง เทียบกับ Blank และเทียบกับแถบสีมาตรฐาน

3.4.6.2 การวิเคราะห์หาค่าความแม่นยำ (Precision)ในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ด้วยวิธี UV-Visible Spectroscopy

เพื่อหาความแม่นยำของการสกัดไนโตรฟูแรนในตัวอย่างชนิดต่างๆ ทำได้โดยการนำตัวอย่างชนิดต่างๆที่ spike ไนโตรฟูแรนลงไป มาทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ภายใต้สภาวะการศึกษาตามข้อ 3.4.3.1 และดูความแม่นยำโดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)

3.4.6.3 การวิเคราะห์ค่า Recovery ของของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ด้วยวิธี UV-Visible Spectroscopy

นำสารละลายส่วนใส รวมทั้ง Blank ที่ได้จากการสกัดมา 3 ml เติม 1M KOH/EtOH 300 µl เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200 – 800 nm โดยนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารไนโตรฟูแรน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของไนโตรฟูแรน และนำค่าที่ได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาค่า % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(A - B) \times 100}{C}$$

เมื่อ A = ปริมาณของสารไนโตรฟูแรนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆ หลังการ spike สารมาตรฐาน (mg/kg)

B = ปริมาณของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างชนิดต่างๆ ก่อนการ spike สารมาตรฐาน (mg/kg)

C = ปริมาณของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่เติมลงไปในตัวอย่างชนิดต่างๆ (spike) (mg/kg)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.7 ผลการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดไนโตรฟูแรนด้วย HPLC

3.4.7.1 ผลการศึกษาช่วงการตรวจวัดปริมาณไนโตรฟูแรนที่เหมาะสม

เตรียมสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรน โดยใช้ DMF เป็นตัวทำละลายและใช้เมทานอลปรับปริมาตร ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 ppm นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 365 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ Hypersil BDS C18, Nitrofurazone และ Nitrofurantoin ใช้โมบายล์เฟส H_2O : Acetronitrile (75:25), Furazolidone และ Furaltadone ใช้โมบายล์เฟส Methanol : H_2O : Acetronitrile (15:70:15), อัตราการไหล 1.1 ml/min และปริมาตรที่ฉีดเข้า HPLC เท่ากับ 20 µl แล้วนำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง Peak area กับ ความเข้มข้นของไนโตรฟูแรน และหาค่า Linear regression

3.4.7.2 ผลการวิเคราะห์หาค่าความแม่นยำในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) ด้วย HPLC

เพื่อหาความแม่นยำของการสกัดไนโตรฟูแรนในตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่ spike ไนโตรฟูแรนลงไป มาทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ภายใต้สภาวะการศึกษาตามข้อ 3.4.7.1 และดูความแม่นยำโดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)

โดยนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดมา 1 ml โดยเลือกมา 5 ชนิดจากตัวอย่างทั้งหมด คือ อาหารไก่เนื้อ (แรกเกิด-3 สัปดาห์), อาหารสุกร (แรกเกิด-15 kg), อาหารกุ้งกุลาดำ (ขนาด 6-12 g), mineral premix และ ดินริมบ่อแห้ง(ระดับความลึก 2 cm) นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml ด้วยเมทานอล (คิดเป็น 5 ppm) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของไนโตรฟูแรนด้วย HPLC

3.4.7.3 ผลการวิเคราะห์ค่า Recovery ของการวิเคราะห์ ด้วย HPLC

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ใช้สกัดไนโตรฟูแรนในตัวอย่างชนิดต่างๆ และนำค่า % Recovery ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกับค่า % Recovery ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

3.4.8 การศึกษาปริมาณสารไนโตรฟูแรนในสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ที่นำมาผสมในอาหารกุ้ง ตามอัตราส่วนที่เกษตรกรใช้จริง

เป็นการนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นไปใช้กับสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ชนิดต่างๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน ว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบยาไนโตรฟูแรนที่ปนเปื้อนอยู่ในยาเหล่านั้นได้หรือไม่ และถ้ามีการปนเปื้อนของสารไนโตรฟูแรนในยาเหล่านั้น ก็นำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรฟูแรนที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารกุ้ง ตามอัตราส่วนที่เกษตรกรใช้จริง

รูปที่3.3 สารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ชนิดต่างๆที่เกษตรกรใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในกุ้ง

3.4.8.1 การศึกษาชนิดและปริมาณไนโตรฟูแรน ที่ผสมอยู่ในสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive)

สารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ที่นำมาทดสอบ มีดังนี้ Factor R, เบต้ามิน, ซีแมกซ์, NEU-Prawn1, แคลฟอร์ต, LPS, พาวเวอร์วิท-ซี, ไฮ-ซัลฟา, ดูโอซิน, NEU-Prawn2, ฟีวรามิกซ์, ทอปเปอร์มิน

ทำการทดสอบโดยชั่งสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) ชนิดต่างๆ มาชนิดละ 0.1 g และ เติม DMF ลงไป 1 ml เขย่าให้เข้ากัน และเติม 1M KOH/EtOH ลงไป 100 µl สังเกตสีที่เกิดขึ้น

จากนั้นต้องการทราบว่ามีปริมาณสารไนโตรฟูแรนผสมอยู่ ในปริมาณเท่าไร จึงนำสารเติมในอาหารชนิดนั้นมาเตรียมความเข้มข้นให้เป็น 100 ppm โดยใช้ DMF เป็นตัวทำละลาย นำสารละลายดังกล่าวที่เตรียมไว้มา 3 ml แล้วเติม 1M KOH/EtOH 300 µl นำสารละลายที่ได้ไปหาค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 580.0 nm และนำสารละลายอีกส่วนไปทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อยืนยันความถูกต้อง จากนั้นจึงนำผลที่ได้ของทั้งสองวิธีวิเคราะห์ไปคำนวณหาปริมาณ Furazolidone ที่ผสมอยู่ในยา Factor R และฟิวรามิกซ์

3.4.8.2 การศึกษาปริมาณไนโตรฟูแรนที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้ง ตามอัตราส่วนที่เกษตรกรใช้จริง

นำปริมาณไนโตรฟูแรน ที่ผสมอยู่ในสารเติมในอาหารกุ้ง (Feed Additive) จากข้อที่ 3.4.7.1 มาคำนวณหาปริมาณไนโตรฟูแรนที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้ง ตามอัตราส่วนที่เกษตรกรใช้จริง ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าว มีดังนี้

- Factor R

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

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

- ฟิวรามิกซ์

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

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

หมายเหตุ : อัตราส่วนดังกล่าวมาจากวิธีการใช้ที่ฉลากยา

3.4.9 การศึกษาการรบกวนที่จะเกิดขึ้นเมื่อใช้ชุดตรวจสอบที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive)

เพื่อศึกษาการรบกวนหาที่อาจทำให้เกิดความผิดพลาดเมื่อใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น โดยทำการหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชั่นต่างๆ, การหา False positive กับสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ, การหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

3.4.9.1 การหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชั่นต่างๆ

ชั่งสารตามหมู่ฟังก์ชันต่างๆ มาชนิดละ 0.1 g ลงในขวดทดลอง เติม DMF ลงไป 1 ml เขย่าให้เข้ากัน และเติม 1M KOH/EtOH ลงไป 100 µl สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นแสดงว่า น้ำยาทดสอบเกิด False positive กับหมู่ฟังก์ชันนั้น

3.4.9.2 การหา False positive กับสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

ชั่งสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ มาชนิดละ 0.1 g ลงในขวดทดลอง เติม DMF ลงไป 1 ml เขย่าให้เข้ากัน และเติม 1M KOH/EtOH ลงไป 100 µl สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นแสดงว่า น้ำยาทดสอบเกิด False positive กับสารปฏิชีวนะกลุ่มนั้น

3.4.9.3 การหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

รูปที่ 3.4 ยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาชนิดต่างๆ ที่ทำมาทดลอง

หยดยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาชนิดต่างๆ ชนิดละ 2 หยดลงในขวดทดลอง และหยด DMF ลงไป 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นหยด 1M KOH/EtOH ลงไป 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นแสดงว่า น้ำยาทดสอบเกิด False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาชนิดนั้น

3.4.10 การปรับปรุง แก้ไข ข้อผิดพลาดที่อาจมีขึ้น เช่น กรณีพบผลบวกลวง (False positive)

เป็นการศึกษาเพื่อปรับปรุง แก้ไข และหาความผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้นกับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ในกรณีพบผลบวกลวง (False positive) โดยการใช้วิธี Thin Layer Chromatography เพื่อช่วยในการยืนยันผลการทดลองจากข้อ 3.4.9 โดยมีวิธีการดังนี้

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีหลังหยดน้ำยาทดสอบเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้น 1000 ppm โดยใช้เทคนิค TLC (โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง) ซึ่งมี Silica gel เป็นตัวดูดซับ และมี Acetronitrile เป็นตัวชะ (eluent phase) แล้วนำมาคำนวณหาค่า R_f (Relative of the front) โดยสามารถหาค่า R_f ได้ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น (cm)}}{\text{ระยะทางที่ตัวชะเคลื่อน ที่จากจุดเริ่มต้น (cm)}}$$

นำค่า R_f ที่คำนวณได้ของตัวอย่าง กับ สารละลายมาตรฐานไนโตรฟูแรนที่ความเข้มข้น 1000 ppm มาเปรียบเทียบกัน ถ้ามีค่า R_f ใกล้เคียงกันก็อาจสรุปได้ว่าตัวอย่างนั้นมีสารกลุ่มไนโตรฟูแรนผสมอยู่

จากขั้นตอนและวิธีการดำเนินการศึกษาที่กล่าวมา สามารถทราบผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษาได้ในบทที่ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย