สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

การศึกษาการพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลแสดงผลการวิเคราะห์ได้ตามลำดับขั้นดังต่อไปนี้

1. ผลการศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสี (Colorimetric) ของคลอแรมเฟนิคอลด้วยวิธีต่าง ๆ ที่สภาวะเหมาะสม
2. ผลการศึกษาความสามารถของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล
3. ผลการสร้างแถบสีมาตรฐาน
4. ผลการนำชุดตรวจสอบไปใช้และประเมินชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างอาหารกุ้ง สารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) และดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry เทียบกับเทคนิค HPLC
5. ผลการศึกษาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ในสารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น
6. ผลการศึกษาสิ่งรบกวน ที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบ
7. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีดัลเลอลิเมตริกที่มีในปัจจุบัน

4.1 ผลการศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสี (Colorimetric) ของคลอแรมเฟนิคอล ด้วยวิธีต่าง ๆ ที่สภาวะเหมาะสม

4.1.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมี พบว่าคลอแรมเฟนิคอลเป็นยาปฏิชีวนะที่มีหมู่ฟังก์ชันมากกว่าหนึ่งชนิดในโมเลกุล หมู่ฟังก์ชันสำคัญที่เลือกมาศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีคือ หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ไนโตรอะโรมาติก และหมู่เอไมด์ โดยแปรผันปริมาณคลอแรมเฟนิคอลเพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่การทดสอบหมู่ฟังก์ชันสามารถตรวจวัดได้

4.1.1.1 ผลการทดสอบหมู่ไฮดรอกซิล

4.1.1.1.1 ผลการทดสอบโดยการเกิดปฏิกิริยากับซีริกไนเตรท (Ceric nitrate reagent)

แอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนไม่เกิน 10 อะตอม เมื่อทำปฏิกิริยากับ Ceric ammonium nitrate จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง ผลการทดสอบคลอแรมเฟนิคอลด้วย Ceric nitrate reagent เป็นไปดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบโดยการเกิดปฏิกิริยากับซีริกไนเตรท

ลำดับที่	ปริมาณ CAP	การเปลี่ยนแปลง
1	10 mg	สารละลายสีส้ม
2	1 mg	สารละลายสีเหลือง
3	0.1 mg	สารละลายสีเหลือง
4	Blank	สารละลายสีเหลือง

จากตารางที่ 4.1 การทดสอบหมู่ไฮดรอกซิลในคลอแรมเฟนิคอลโดยการเกิดปฏิกิริยากับซีริกไนเตรท พบว่าสีที่เกิดขึ้นได้สารละลายสีส้มซึ่งผลที่ได้ไม่ตรงตามวิธีทดสอบซึ่งควรจะได้สารละลายสีแดง เมื่อมองด้วยตาเปล่าทำให้แยกความแตกต่างระหว่างแบลงค์และสารประกอบที่เกิดขึ้นได้ยากและต้องใช้คลอแรมเฟนิคอลในปริมาณมากถึง 10 มิลลิกรัม จึงให้ผลการทดสอบที่ชัดเจน การทดสอบด้วยวิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาทำเป็นชุดตรวจสอบที่ต้องตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนในระดับต่ำ

4.1.1.2 ผลการทดสอบสารประกอบไนโตรอะโรมาติก

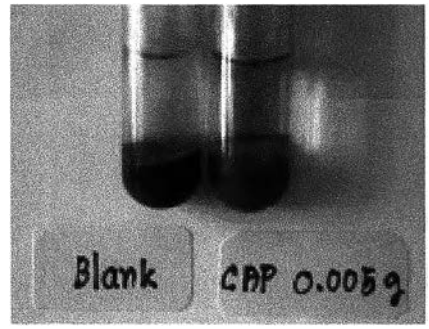
4.1.1.2.1 ผลการทดสอบโดยวิธี Ferrous hydroxide test

เมื่อ $Fe(OH)_2$ ถูกออกซิไดซ์โดยสารประกอบไนโตร จะให้ตะกอนสีน้ำตาลแดงหรือแดงของ $Fe(OH)_3$ ถ้าไม่ใช่สารประกอบไนโตรจะให้ตะกอนสีเขียวของ $Fe(OH)_2$ หรือเกิด partial oxidation ได้ตะกอนสีคล้ำเมื่อเทียบกับแบลงค์ ผลการทดสอบคลอแรมเฟนิคอลด้วย $Fe(OH)_2$ เป็นไปดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบโดยวิธี Ferrous hydroxide test

ลำดับที่	ปริมาณ CAP	การเปลี่ยนแปลง
1	5 mg	ตะกอนสีน้ำตาลแดงคล้ำ
2	1 mg	ตะกอนสีเขียว
3	0.1 mg	ตะกอนสีเขียว
4	Blank	ตะกอนสีเขียว

จากการทดลองพบว่าหมู่อะโรมาติกไนโตรในคลอแรมเฟนิคอลเกิดปฏิกิริยากับ $Fe(OH)_2$ ได้ตะกอนสีน้ำตาลแดงของ $Fe(OH)_3$ ดังรูปที่ 4.1 และจากตารางที่ 4.2 พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ทดสอบได้คือ 5 มิลลิกรัม และวิธีนี้มีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน การทดสอบด้วยวิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาทำเป็นชุดตรวจสอบที่ต้องตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลในระดับต่ำ และมีความสะดวกต่อการใช้งาน



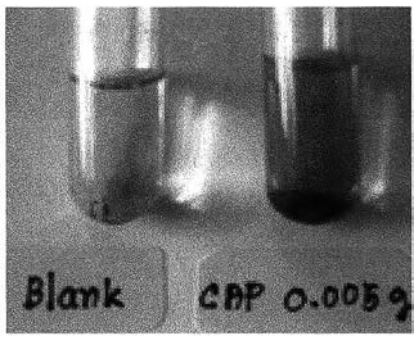
รูปที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบโดยวิธี Ferrous hydroxide test

4.1.1.2.2 ผลการทดสอบโดยวิธี Zn/NH_4Cl test

วิธี Zn/NH_4Cl test เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการทดสอบสารประกอบไนโตรอะโรมาติกโดยหมู่ไนโตรจะถูกรีดิวซ์โดย Zn/NH_4Cl จนกลายเป็น hydrazine, hydroxyl amine หรือ amino phenol เมื่อนำไปทดสอบกับ Tollen's reagent ถ้ามีหมู่ไนโตรจะถูกออกซิไดซ์ได้ Silver mirror ฉาบอยู่ข้างหลอดทดลอง ผลการทดสอบคลอแรมเฟนิคอลด้วย Zn/NH_4Cl test เป็นไปดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบโดยวิธี Zn/NH_4Cl test

ลำดับที่	ปริมาณ CAP	การเปลี่ยนแปลง
1	5 mg	สารละลายสีเหลืองใสมี Silver mirror ฉาบข้างหลอด
2	1 mg	สารละลายสีเหลืองอ่อนมี Silver mirror ฉาบข้างหลอด
3	0.1 mg	สารละลายใสมีตะกอน
4	Blank	สารละลายใสมีตะกอน



รูปที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบโดยวิธี Zn/NH_4Cl test

เมื่อทดสอบสารละลายที่ได้จาก Zn/NH_4Cl test ด้วย Tollen's reagent พบว่าคลอแรมเฟนิคอลให้สีเงินของ Ag ฉาบอยู่ข้างหลอดและส่วนใสสีเหลืองต่างจากแบลงค์ที่เป็นสารละลายใสไม่มีสีดังรูปที่ 4.2 และจากตารางที่ 4.3 พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ทดสอบได้คือ 1 มิลลิกรัม การทดสอบด้วยวิธีนี้พบว่าแบลงค์เกิดตะกอน เมื่อต้องตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลที่มีความเข้มข้นต่ำ การมองด้วยตาเปล่าทำให้แยกความแตกต่างระหว่างตะกอนและ Silver mirror ที่เกิดขึ้นได้ยาก และนอกจากนี้ยังไม่สามารถยืนยันผลได้ว่าเป็นคลอแรมเฟนิคอลหรือไม่ เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีทดสอบว่ามีหมู่ไนโตรอะโรมาติก หรือไม่เท่านั้น

4.1.1.3 ผลการทดสอบหมู่เอไมด์

4.1.1.3.1 ผลการทดสอบด้วยวิธี Ferric hydroxamate test

สารประกอบที่เป็น Unsubstituted amide บางชนิด ทำปฏิกิริยากับ ไฮดรอกซิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไฮดรอกซามิก ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ให้สารละลายสีน้ำเงินหรือสีม่วงแดงของเฟอริกไฮดรอกซาเมต ผลการทดสอบคลอแรมเฟนิคอล ด้วย Ferric hydroxamate test เป็นไปดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี Ferric hydroxamate test

ลำดับที่	ปริมาณ CAP	การเปลี่ยนแปลง
1	5 mg	สารละลายสีม่วงแดง
2	1 mg	สารละลายสีม่วงแดง
3	0.1 mg	สารละลายสีม่วงแดง
4	10 µg	สารละลายสีเหลืองอ่อน
5	1 µg	สารละลายสีเหลืองอ่อน
6	Blank	สารละลายสีเหลืองอ่อน

จากการทดลองพบว่าหมู่เอไมด์ในคลอแรมเฟนิคอลเกิดปฏิกิริยากับ $FeCl_3$ ได้สารละลายสีม่วงแดง และจากตารางที่ 4.4 พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ทดสอบได้คือ 0.1 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจได้ในระดับค่อนข้างต่ำ แต่วิธีนี้ ให้ผลบวกกับสารหลายประเภทเช่น Ester, Acid chloride และ Acid anhydride จึงอาจต้องอาศัยการทดสอบหมู่ฟังก์ชันอื่นร่วมด้วย

ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชันจากการทดลองที่ 4.1.1.1-4.1.1.3 พบว่าเป็นวิธีการทดสอบขั้นพื้นฐานที่ให้ความจำเพาะเจาะจงต่ำ การจะบ่งชี้ว่าสารตัวอย่างเป็นคลอแรมเฟนิคอลหรือไม่นั้น อาจต้องยืนยันผลโดยการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบทั้งหมด การทดสอบด้วยวิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาทำเป็นชุดตรวจสอบที่สามารถนำไปใช้ในงานภาคสนามที่ต้องการความสะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำ

4.1.2 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

4.1.2.1 ผลการศึกษาการละลายของคลอแรมเฟนิคอล

ศึกษาการละลายของคลอแรมเฟนิคอล โดยใช้คลอแรมเฟนิคอล 1 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร ว่าตัวทำละลายใดสามารถละลายหรือไม่ละลายคลอแรมเฟนิคอล ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาการละลายของคลอแรมเฟนิคอล

ลำดับที่	ชนิดของตัวทำละลาย	การละลาย
1	น้ำกลั่น	ละลายได้เล็กน้อย
2	Methanol	ละลายได้ดี
3	Ethylacetate	ละลายได้ดี
4	Acetronitrile	ละลายได้ดี
5	Hexane	ไม่ละลาย
6	Ethylenediamine	ละลายได้ดี
7	Dimethylformamide (DMF)	ละลายได้ดี
8	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	ละลายได้ดี

ผลการทดสอบการละลายพบว่าคลอแรมเฟนิคอลละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดคือ Methanol Ethylacetate Acetronitrile Ethylenediamine Dimethylformamide (DMF) และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) แต่ไม่ละลายในHexane ดังนั้นจึงนำตัวทำละลายที่สามารถละลายคลอแรมเฟนิคอลได้ดี ไปทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีว่าตัวทำละลายใดสามารถละลายคลอแรมเฟนิคอลแล้วทำปฏิกิริยากับ Complexing agent ได้สารมีสีต่อไป

4.1.2.2 ผลการศึกษา Solvent และ Complexing agent ที่เหมาะสม

4.1.2.2.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยใช้ Methanol Ethylacetate Acetronitrile Ethylenediamine Dimethylformamide และ Dimethyl sulfoxide เป็น Solvent ร่วมกับ 1 M Ethanolic potassium hydroxide เป็น Complexing agent

จากการพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์ (วัชรพรรณ, 2547) พบว่าการใช้ 1 M Ethanolic potassium hydroxide (1M KOH/EtOH) หยดลงในสารละลายไนโตรฟูแรนใน DMF ที่อัตราส่วน DMF 10 ส่วนต่อ 1M KOH/EtOH 1 ส่วน จะได้สารมีสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยใช้คลอแรมเฟนิคอล 0.1 มิลลิกรัม ละลายใน Solvent ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 4.1.3.1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ร่วมกับ Complexing agent คือ 1M KOH/EtOH 0.1 มิลลิลิตร ผลการทดลองที่ได้เป็นไปดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบคลอแรมเฟนิคอลใน Solvent ชนิดต่าง ๆ ร่วมกับ 1 M Ethanolic potassium hydroxide ในอัตราส่วน 10:1

ลำดับที่	Solvent	1 M Ethanolic potassium hydroxide
1	Methanol	ไม่เปลี่ยนแปลง
2	Ethylacetate	ไม่เปลี่ยนแปลง
3	Acetronitrile	สารละลายสีเหลืองอ่อน
4	Ethylenediamine	สารละลายสีเหลืองอ่อน
5	Dimethylformamide (DMF)	สารละลายสีส้ม
6	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	สารละลายสีแดงเข้ม

จากตารางที่ 4.6 พบว่า Solvent ชนิด DMSO ให้ผลการทดสอบที่ดีคือเกิดสารละลายสีแดงเข้มเห็นได้ชัดเจนที่สุดจึงเลือก DMSO ใช้เป็น Solvent เพื่อหา Complexing agent ที่เหมาะสมต่อไป

4.1.2.2.2 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยใช้ Dimethyl sulfoxide เป็น Solvent ร่วมกับ Sodium hydroxide, Methanolic sodium hydroxide, Ethanolic sodium hydroxide, Potassium hydroxide, Methanolic potassium hydroxide, Ethanolic potassium hydroxid และ Propanolic potassium hydroxide ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็น Complexing agent

Complexing agent ที่นำมาทดลองเป็น NaOH และ KOH ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและแอลกอฮอล์ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และโพรพานอล ซึ่งการละลายจะยากขึ้นเมื่อโมลกุลของแอลกอฮอล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อการเตรียม Complexing agent โดยตัวทำละลายที่เป็นน้ำสามารถเตรียม KOH และ NaOH ได้ถึง 10 โมลาร์ เมทานอลและเอทานอลสามารถเตรียม KOH และ NaOH ได้ถึง 5 โมลาร์ โพรพานอลสามารถเตรียม KOH ได้เพียง 1 โมลาร์ แสดงได้ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดง Complexing agent ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	Complexing agent	ความเข้มข้น (โมลาร์)
1	1 M Sodium hydroxide	1 M $NaOH/H_2O$
2	5 M Sodium hydroxide	5 M $NaOH/H_2O$
3	10 M Sodium hydroxide	10 M $NaOH/H_2O$
4	1 M Potassium hydroxide	1 M KOH/H_2O
5	5 M Potassium hydroxide	5 M KOH/H_2O
6	10 M Potassium hydroxide	10 M KOH/H_2O
7	1 M Methanolic sodium hydroxide	1 M NaOH/MeOH
8	5 M Methanolic sodium hydroxide	5 M NaOH/MeOH
9	1 M Methanolic potassium hydroxide	1 M KOH/MeOH
10	5 M Methanolic potassium hydroxide	5 M KOH/MeOH
11	1 M Ethanolic sodium hydroxide	1 M NaOH/EtOH
12	5 M Ethanolic sodium hydroxide	5 M NaOH/EtOH
13	1 M Ethanolic potassium hydroxide	1 M KOH/EtOH
14	5 M Ethanolic potassium hydroxide	5 M KOH/EtOH
15	1 M Propanolic potassium hydroxide	1 M KOH/IPA

เมื่อแปรผันปริมาณคลอแรมเฟนิคอลให้อยู่ในช่วง 0.01-100 ไมโครกรัม ใน DMSO 1 มิลลิลิตร แล้วหยด Complexing agent ชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 0.1 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีที่แตกต่างกันดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงสีที่เกิดขึ้นของคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO กับ Complexing agent ความเข้มข้น 1 โมลาร์ในอัตราส่วน 10:1

ปริมาณ CAP (µg)	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น						
	1 M $NaOH/H_2O$	1 M KOH/H_2O	1 M NaOH/MeOH	1 M KOH/MeOH	1 M NaOH/EtOH	1 M KOH/EtOH	1 M KOH/IPA
100							
10			สารละลายใสไม่มีสี				
1	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	
0.1	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี
0.01	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี
Blank	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี

จากตารางที่ 4.8 เมื่อแปรผันปริมาณคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO แล้วพบว่าคลอแรมเฟนิคอลปริมาณ 100 ไมโครกรัม เกิดปฏิกิริยากับ Complexing agent ทุกชนิดให้สารละลายสีแดงที่มีความเข้มสีแตกต่างกันยกเว้น NaOH/MeOH ที่เกิดสารละลายสีเหลือง เมื่ออยู่ในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน KOH ให้สีที่เข้มกว่า NaOH เมื่อปริมาณคลอแรมเฟนิคอลต่ำลง NaOH และ KOH ที่ใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำและเมทานอล จะให้สีที่ไม่แปรตามปริมาณคลอแรมเฟนิคอล คือ 100 ไมโครกรัม ให้สีแดง แต่ 10 ไมโครกรัม ให้สารละลายสีเหลือง ส่วนเบสที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลและโพรพานอลให้สีที่แปรตามปริมาณคลอแรมเฟนิคอล การใช้ 1 M NaOH/MeOH สามารถอ่านค่าปริมาณคลอแรมเฟนิคอลด้วยตาเปล่าได้ต่ำสุด 100 ไมโครกรัม 1 M $NaOH/H_2O$, 1 M KOH/H_2O, 1 M KOH/MeOH , 1 M NaOH/EtOH และ 1 M KOH/EtOH สามารถอ่านค่าปริมาณคลอแรมเฟนิคอลด้วยตาเปล่าได้ต่ำสุด 10 ไมโครกรัม และ 1 M KOH/IPA ให้ผลการทดสอบที่ดีคือสามารถอ่านปริมาณคลอแรมเฟนิคอลได้ต่ำสุด 1 ไมโครกรัม ให้สีแดงอมชมพู โดยปฏิกิริยาเกิดได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้อง สีจะค่อย ๆ เกิดขึ้นจากชมพูไปเป็นแดง ในเวลา 3-5 นาที

การเพิ่มความเข้มข้นของ Complexing agent อาจให้ผลที่สามารถอ่านปริมาณคลอแรมเฟนิคอลได้ต่ำลงหรือไม่ ผลการทดสอบเป็นไปดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงสีที่เกิดขึ้นของคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 5 และ 10 โมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1

ปริมาณ CAP(µg)	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น							
	5 M $NaOH/H_2O$	5 M KOH/H_2O	10 M $NaOH/H_2O$	10 M KOH/H_2O	5 M NaOH/MeOH	5 M KOH/MeOH	5 M NaOH/EtOH	5 M KOH/EtOH
100					มีตะกอน	มีตะกอน	มีตะกอน	มีตะกอน
10					สารละลายขุ่น มีตะกอนขาว	มีตะกอน	มีตะกอน	มีตะกอน
1	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลายขุ่น มีตะกอนขาว	มีตะกอน	สารละลาย ขุ่นมี ตะกอนขาว	มีตะกอน
0.1	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลายขุ่น มีตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมี ตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมี ตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมีตะกอน ขาว
0.01	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลายขุ่น มีตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมี ตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมี ตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมีตะกอน ขาว
Blank	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลาย ใสไม่มีสี	สารละลายขุ่น มีตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมี ตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมี ตะกอนขาว	สารละลาย ขุ่นมีตะกอน ขาว

จากตารางที่ 4.8 และ 4.9 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบความเข้มสีที่ได้จาก $NaOH/H_2O$ และ KOH/H_2O ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 โมลาร์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะให้สีเข้มขึ้นแต่สามารถอ่านปริมาณคลอแรมเฟนิคอลได้เท่าเดิมคือ 10 ไมโครกรัม เช่นเดียวกับ 5 M NaOH/MeOH และ NaOH/EtOH ที่ให้สีเข้มขึ้นแต่สามารถอ่านปริมาณคลอแรมเฟนิคอลได้เท่าเดิมคือ 100 และ 10 ไมโครกรัม ตามลำดับ

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ KOH/MeOH และ KOH/EtOH เป็น 5 M พบว่าสีที่เกิดมีความเข้มขึ้นและสามารถอ่านค่าความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอลได้ต่ำลงคือ 1 ไมโครกรัม แต่สารละลายที่ได้เกิดตะกอนจากการ salting out ของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพ

ของ Complexing agent ลดลงและจะเป็นอุปสรรคในการตรวจด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer จึงไม่เลือกที่จะใช้เป็นน้ำยาทดสอบ

ดังนั้นการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยใช้ Complexing agent หลายชนิดในการทดลองนี้สรุปได้ว่า 1 M KOH/IPA เป็น Complexing agent ที่เหมาะสมเนื่องจากเกิดปฏิกิริยากับคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ให้สารมีสีที่สามารถอ่านค่าปริมาณคลอแรมเฟนิคอลได้ในระดับต่ำสุด ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้องและสีที่เกิดขึ้นมีความคงตัวตลอดช่วงที่ทำการวัด การใช้ DMSO ร่วมกับ 1 M KOH/IPA เป็น Solvent และ Complexing agent ที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปพัฒนาให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการเป็นชุดตรวจสอบต่อไป

4.1.2.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO และ 1 M KOH/IPA

ปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO กับ 1 M KOH/IPA ให้สารมีสี โดยสีจะค่อย ๆ เกิดขึ้นจากชมพูไปเป็นแดง การทดลองต่อไปจะเป็นการหาสภาวะที่ดีที่สุดที่ทำให้ปฏิกิริยานี้เกิดสีที่มีความเข้มขึ้นหรือสามารถตรวจวัดคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นต่ำลงด้วยการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง Solvent และ Complexing agent ซึ่งการทดสอบด้วยตาเปล่าไม่สามารถบอกได้ชัดเจนพอจึงต้องใช้ เครื่อง UV-Visible spectrophotometer ในการยืนยันผล

4.1.2.3.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO กับ 1 M KOH/IPA

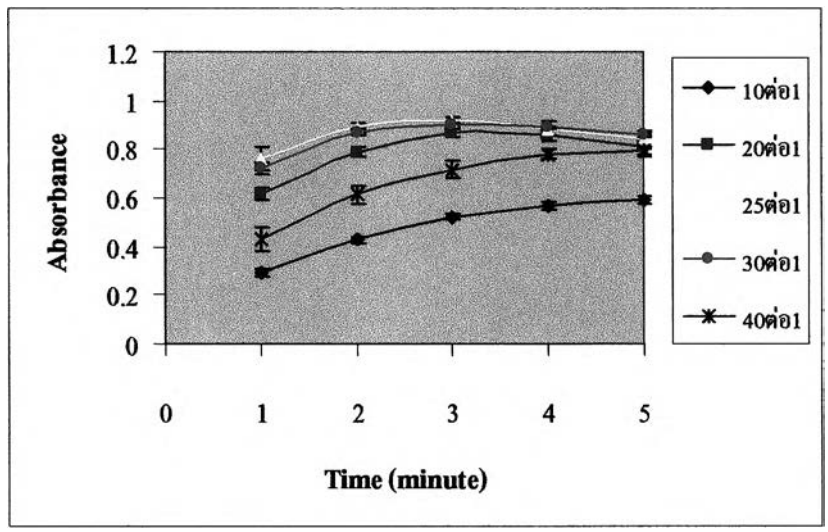
จากการทดสอบด้วยตาเปล่าพบว่า อัตราส่วนระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO และ 1 M KOH/IPA ที่ให้สีที่มองเห็นชัดเจนอยู่ในช่วง 10:1-40:1 ปฏิกิริยาไม่เกิดทันทีแต่สีจะค่อย ๆ develop จากชมพูไปเป็นแดงในช่วง 1-5 นาที สรุปได้ว่า ผลของปฏิกิริยาให้สารละลายที่ไม่เสถียรเนื่องจากสีเปลี่ยนไปตามเวลา ดังนั้น จำเป็นต้องจับเวลาเพื่อหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ให้การดูดกลืนแสง เพื่อให้สามารถบอกสีและเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาได้ถูกต้อง โดยใช้สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 30 ppm ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ร่วมกับ 1 M KOH/IPA ปริมาณ 300, 150, 120, 100 และ 75 ไมโครลิตร ซึ่งจะทำให้มีอัตราส่วนระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO กับ 1 M KOH/IPA เท่ากับ 10:1 20:1 25:1 30:1 และ 40:1 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 นาที ผลการทดลองเป็นไปตามตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 30 ppm ใน DMSO โดยใช้ อัตราส่วนของ DMSO:1M KOH/IPA ในช่วง 10:1 ถึง 40:1

เวลา (นาที)	อัตราส่วนคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO 30 ppm และ 1 M KOH/IPA (n=5)									
	10:1		20:1		25:1		30:1		40:1	
	λ max	Asb.	λ max	Asb.	λ max	Asb.	λ max	Asb.	λ max	Asb.
1	513	0.289	515	0.615	517	0.762	518	0.719	518	0.430
2	514	0.429	517	0.788	518	0.895	520	0.866	520	0.613
3	516	0.520	518	0.868	518	0.913	520	0.900	521	0.717
4	516	0.566	518	0.857	518	0.887	519	0.889	521	0.781
5	516	0.590	518	0.812	518	0.840	520	0.859	521	0.796

หมายเหตุ : λ max คือ ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)

Asb. คือ ค่าการดูดกลืนแสง

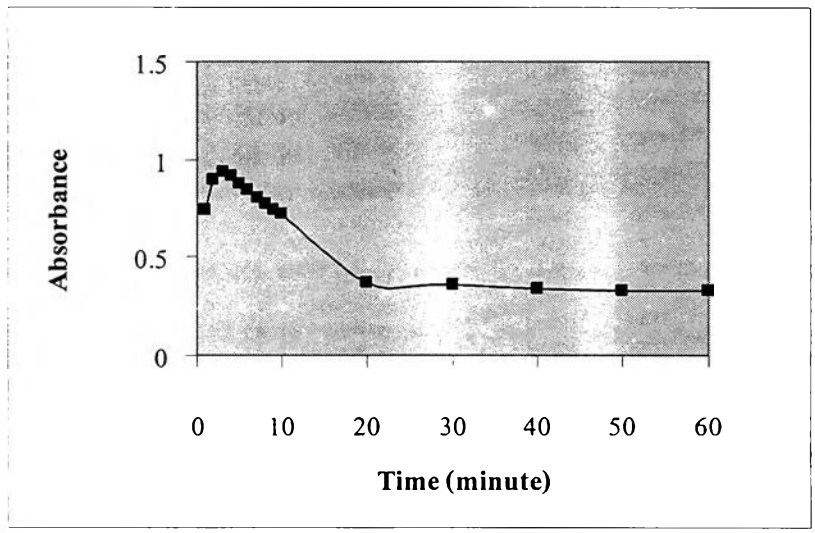


รูปที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 30 ppm ใน DMSO กับ 1M KOH/IPA อัตราส่วน 10:1 20:1 25:1 30:1 และ 40:1 ในระยะเวลา 1-5 นาที

จากตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.3 พบว่า อัตราส่วนระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ต่อ 1 M KOH/IPA ที่ให้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงสูงสุด ในระยะเวลาน้อยที่สุด คือ 25:1 โดยมีการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.913 ที่ค่าความยาวคลื่นสูงสุด 518 นาโนเมตร ที่เวลา 3 นาที เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่สูง และใช้เวลาน้อยกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ ซึ่งเหมาะกับการเป็นชุดตรวจสอบที่มีการใช้งานภาคสนาม ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนสำหรับใช้กับน้ำยาทดสอบต่อไป

4.1.2.3.2 ผลการศึกษาความคงตัวของสี ที่เกิดจากคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO กับ 1 M KOH/IPA อัตราส่วน 25:1

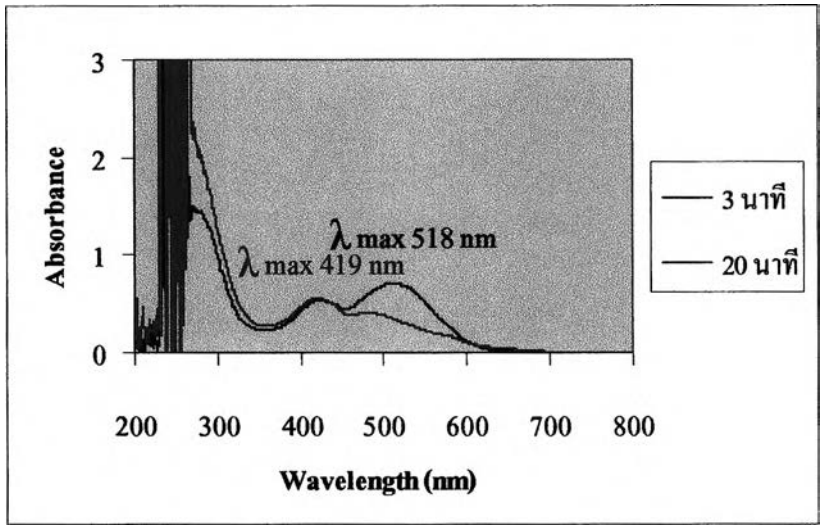
จากการทดลองที่ 4.1.3.3.2 พบว่าปฏิกิริยาระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO กับ 1 M KOH/IPA อัตราส่วน 25:1 เป็นอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และสีที่เกิดขึ้นไม่เสถียร เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น จึงศึกษาความคงตัวของสี โดยใช้สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 30 ppm ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ร่วมกับ 1 M KOH/IPA ปริมาณ 120 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร ทุก 1 นาที นาน 10 นาที และ วัดค่าการดูดกลืนแสงต่อไปทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 30 ppm ใน DMSO กับ 1M KOH/IPA อัตราส่วน 25:1 ที่ 518 นาโนเมตร ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.4 พบว่า หลังจากหยดน้ำยาทดสอบ 1M KOH/IPA ลงในคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร จะเพิ่มขึ้นในช่วง 1-3 นาที จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงและเริ่มคงที่ตั้งแต่ประมาณ 20 นาที สอดคล้องกับการสังเกตด้วยตาเปล่าที่พบว่าสีของ

สารละลายเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้มน้ำตาลภายใน 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมของสีที่เกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร เริ่มคงที่ เทียบกับที่ระยะเวลา 3 นาที แสดงได้ดังรูปที่ 4.5

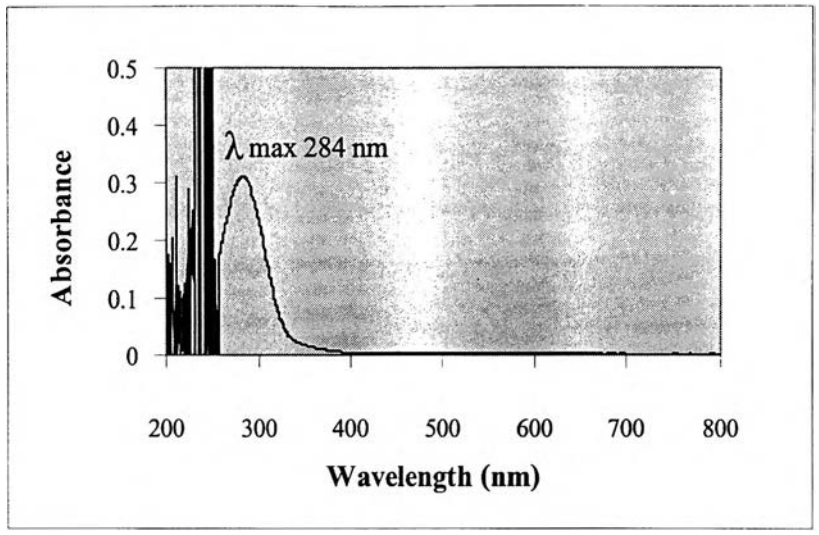


รูปที่ 4.5 แสดงการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 30 ppm ใน DMSO กับ 1M KOH/IPA อัตราส่วน 25:1 ที่เวลา 3 และ 20 นาที

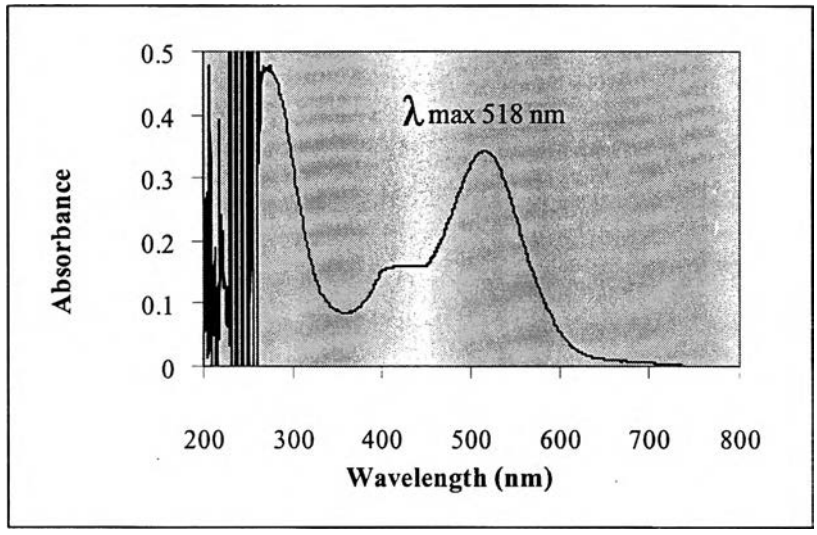
จากรูปที่ 4.5 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที ค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสีที่เกิดขึ้น ลดลงจาก 518 เป็น 419 นาโนเมตร ดังนั้น ในการสังเกตความเข้มของสีจากปฏิกิริยาระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO และ 1 M KOH/IPA ที่อัตราส่วน 25:1 เวลาที่ควรสังเกตสีคือ 3 นาที และไม่ควรเกิน 20 นาที

4.2 ผลการศึกษาความสามารถของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับสารละลายมาตรฐาน คลอแรมเฟนิคอล

จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ด้วย UV-Visible spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร พบว่าความยาวคลื่นสูงสุดของคลอแรมเฟนิคอลคือ 284 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.6 หลังปฏิกิริยาการเกิดสีความยาวคลื่น shift ไปเป็น 518 นาโนเมตร สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง ดังรูปที่ 4.7 นั่นคือเมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้วให้สารที่ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นมากกว่าเดิม



รูปที่ 4.6 แสดงการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 10 ppm ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ



รูปที่ 4.7 แสดงการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 10 ppm หลังหยดน้ำยาทดสอบ 3 นาที

ตามทฤษฎีการเกิดสี สารมีสีสามารถดูดกลืนแสงสีขาว (White light หรือ Visible light) ได้ การที่เราสามารถบอกได้ว่าเป็นสีอะไร เกิดจากการที่สารนั้นดูดกลืนแสงสีหนึ่งสีใดใน 7 สี (Visible light) แล้วปล่อยสีที่เหลือผสมผสานกันเข้าตาเรา การตรวจวัดการดูดกลืนแสงทำได้โดยการวัดแสงที่ถูกดูดกลืนไป (Absorbance) หรือวัดแสงที่ผ่านออกมาจากตัวอย่าง (Transmittance) โดยทั่วไปมักนิยมวัดค่าแอบซอร์แบนซ์มากกว่าทรานสมิทแทนซ์ ความยาวคลื่นของสารมีสีที่ตามองเห็นได้อยู่ในช่วง 400-750 นาโนเมตร ความยาวคลื่นต่ำกว่า 400 นาโนเมตร จะมองไม่เห็นเป็นแสง

อัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่นสูงกว่า 750 นาโนเมตร จะเป็นแสง near infrared (ฉันทนา, 2540) ค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จากการวิเคราะห์ และสีที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันความถูกต้องโดยนำมาเทียบกับข้อมูลในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น สีที่ถูกดูดกลืน (Color Transmitted) และสีที่มองเห็น (Complementary Color)

ความยาวคลื่น(nm)	สีที่ถูกดูดกลืน	สีที่มองเห็น
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

ผลการทดลองมีความสอดคล้องตามตารางที่ 4.11 คือหลังใช้น้ำยาทดสอบ สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลให้สารประกอบมีสีเป็นสีแดงอมชมพู และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร

4.2.1 ผลการศึกษาช่วงการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล ที่เหมาะสม

การศึกษาช่วงการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลทำได้โดยการสังเกตความเข้มสีสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลหลังใช้น้ำยาทดสอบ (1 M KOH/IPA) นาน 3 นาที ด้วยตาเปล่า (Visual test) ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1-100 ppm (0.1-100 ไมโครกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร) ว่าสามารถมองเห็นสีได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ระดับใด สัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 518±2 นาโนเมตรหรือไม่ โดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer ยืนยันผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงสีและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 0.1-100 ppm ก่อนหยดและหลังหยด 1 M KOH/IPA นาน 3 นาที

ความเข้มข้น (µg/ml)	Visual test		ค่าการดูดกลืนแสง λ max 518 nm
	ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ	หลังหยดน้ำยาทดสอบ	
100			2.365
90			2.154
70			1.663
50			1.332
30			0.862
10			0.352
5			0.188
1			0.091
0.5			0.034
0.1			0.012
Blank			0.000

หมายเหตุ : สีที่เห็นเป็นสีที่ได้จากรูปถ่ายอาจไม่ชัดเจนเหมือนกับสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

จากตารางที่ 4.12 พบว่า ความเข้มสีหลังหยดน้ำยาทดสอบของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ลดลงเมื่อความเข้มข้นต่ำลง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Visual test) คือ 1 ppm ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 1 ppm คือ 0.5 และ 0.1 ppm ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสีของสารละลายกับแบลงค์ได้ สอดคล้องกับกับผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 518 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอลต่ำลง ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.1 ppm มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.034 และ 0.012 ซึ่งมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า อาจเนื่องจากขีดจำกัดของ Complexing agent

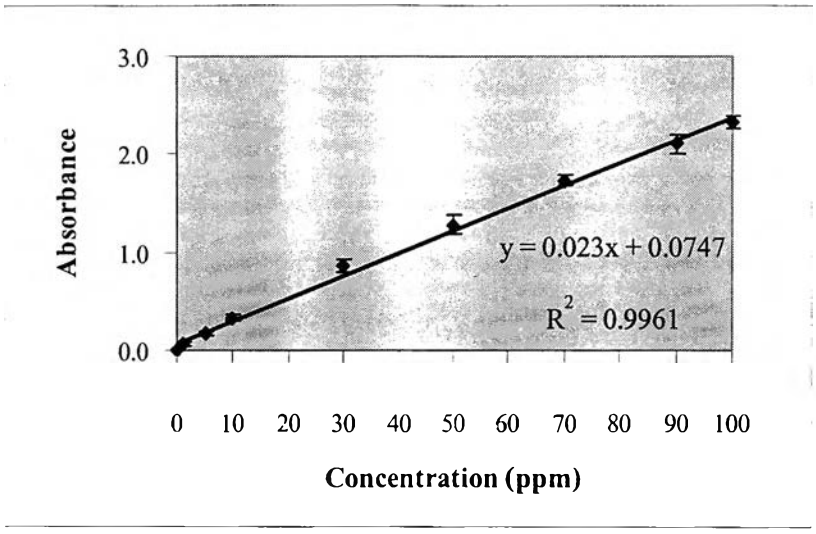
ในการทำปฏิกิริยากับคลอแรมเฟนิคอล จึงสรุปได้ว่าช่วงการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบนี้คือ 1-100 ppm

เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 1-100 ppm ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ร่วมกับ 1 M KOH/IPA 120 ไมโครลิตร (25:1) ที่เวลา 3 นาที จำนวน 5 ซ้ำ แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลกับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อหาสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ของ Calibration curve ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่ 518 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล (n=5)
1	0.068±0.025
5	0.167±0.026
10	0.332±0.030
30	0.859±0.060
50	1.281±0.099
70	1.736±0.051
90	2.106±0.092
100	2.329±0.065
y = ax+b	y = 0.023x+ 0.0747
R^2	0.9961

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer



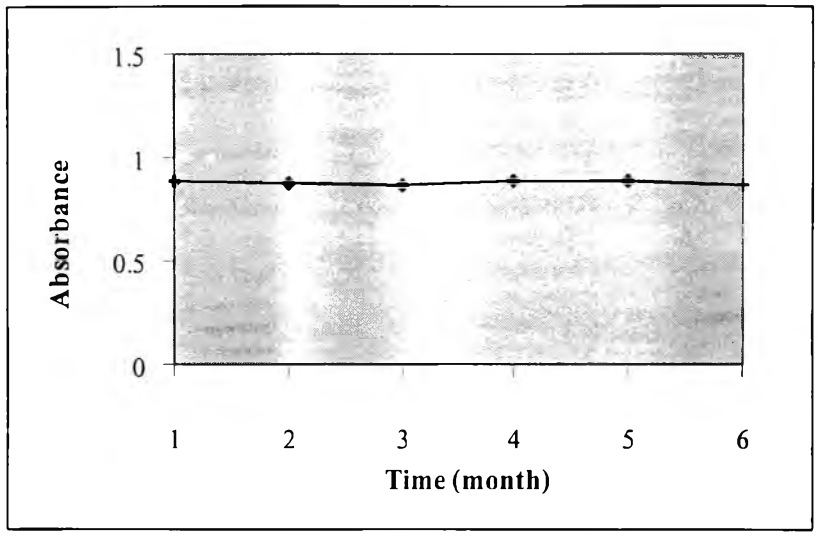
รูปที่ 4.8 แสดง Calibration range ของคลอแรมเฟนิคอลที่ 518 นาโนเมตร ความเข้มข้น 1-100 ppm

จากตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.8 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลหลังหยดน้ำยาทดสอบในช่วงความเข้มข้น 1-100 ppm ในระยะเวลา 5 วัน จะได้สมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) คือ y = 0.023x+ 0.0747 มีค่า Correlation coefficient (R^2) = 0.9961

4.2.2 ผลการทดสอบเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ

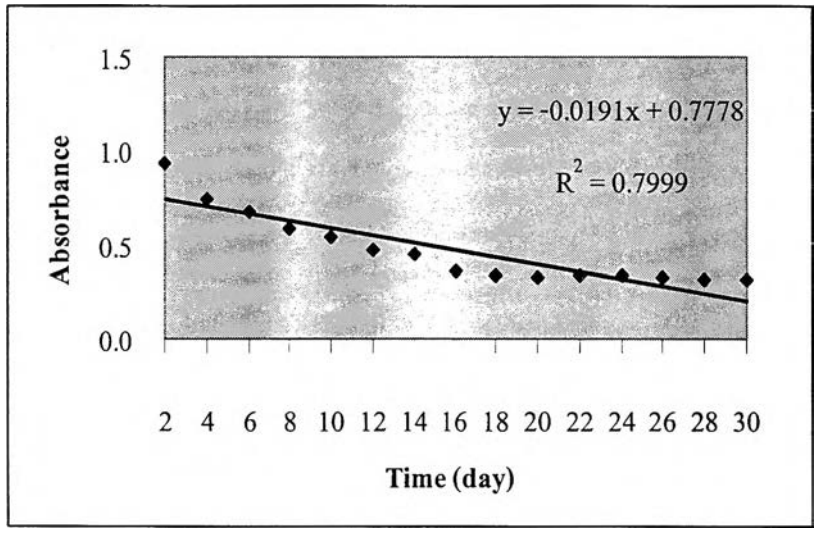
เสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ (1 M KOH/IPA) มีผลต่อการนำชุดตรวจสอบไปใช้จริง ว่าน้ำยาทดสอบมีอายุการใช้งาน หรือยังคงประสิทธิภาพเกิดสีกับคลอแรมเฟนิคอลได้สม่ำเสมอในระยะการเก็บรักษานานเท่าใด

เมื่อเก็บรักษาสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 30 ppm ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 284 นาโนเมตร ในระยะเวลาการเก็บรักษานาน 6 เดือน พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.880 ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.011 และ ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) เท่ากับ 1.2 % ดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ 284 นาโนเมตร ของคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO 30 ppm เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน

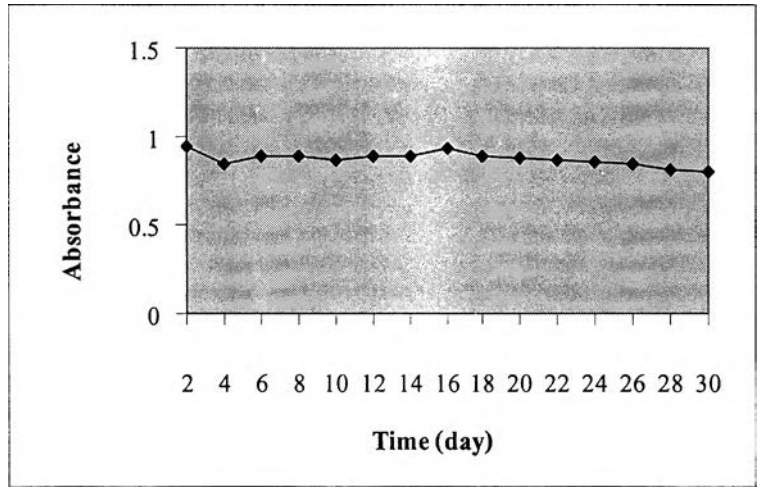
ในขณะที่เมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบ (1 M KOH/IPA) ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง หลังการหยดน้ำยาทดสอบที่ 518 นาโนเมตร นาน 3 นาที ของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ใน DMSO ความเข้มข้น 30 ppm วันเว้นวันรวม 15 ครั้ง เป็นระยะเวลา 1 เดือน ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร ของคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO 30 ppm หลังหยดน้ำยาทดสอบซึ่งเก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1 เดือน

ผลการทดสอบพบว่า ในระยะเวลา 1 เดือน สีของคลอแรมเฟนิคอลหลังหยดน้ำยาทดสอบมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร ลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 30 ผลการดูดกลืนแสงลดลงเหลือเพียง 34 เปอร์เซ็นต์ ของวันแรก โดยมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.472 ค่า SD เท่ากับ 0.1909 และ ค่า RSD เกินกว่า 10 % เมื่อคำนวณหาระยะเวลาที่น้ำยาทดสอบไม่เกิดสีกับคลอแรมเฟนิคอลจากสมการ Linear regression คือ y = -0.0191x + 0.7778 พบว่าระยะเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงของคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO หลังหยดน้ำยาทดสอบเท่ากับศูนย์ คือ 41 วัน สรุปได้ว่า เสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ (1 M KOH/IPA) มีผลต่อการเกิดสีกับคลอแรมเฟนิคอล โดยเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบจะลดลงภายใน 1 เดือน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

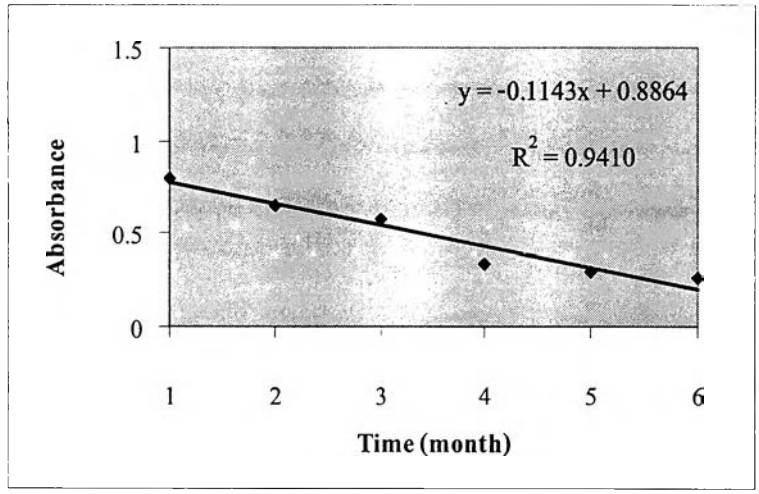
เมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบ (1 M KOH/IPA) ในขวดสีชาในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง หลังการหยดน้ำยาทดสอบที่ 518 นาโนเมตร นาน 3 นาที ของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ใน DMSO ความเข้มข้น 30 ppm วันเว้นวันรวม 15 ครั้ง เป็นระยะเวลา 1 เดือน ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร ของคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO 30 ppm หลังหยดน้ำยาทดสอบซึ่งเก็บรักษาในขวดสีชาในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 1 เดือน

จากผลการทดลองพบว่าในระยะเวลา 1 เดือน สีของคลอแรมเฟนิคอลหลังหยดน้ำยาทดสอบมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.873 ค่า SD เท่ากับ 0.0379 และ ค่า RSD เท่ากับ 4.34 % นั่นคือน้ำยาทดสอบที่เก็บรักษาในขวดสีชาและแช่ตู้เย็น ในช่วงการเก็บรักษา 1 เดือน จะยังคงมีเสถียรภาพสูงเนื่องจากผลการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างคงที่ และมี RSD ต่ำกว่า 10 %

เมื่อทำการทดลองต่อไป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงเดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 6 เดือน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.12



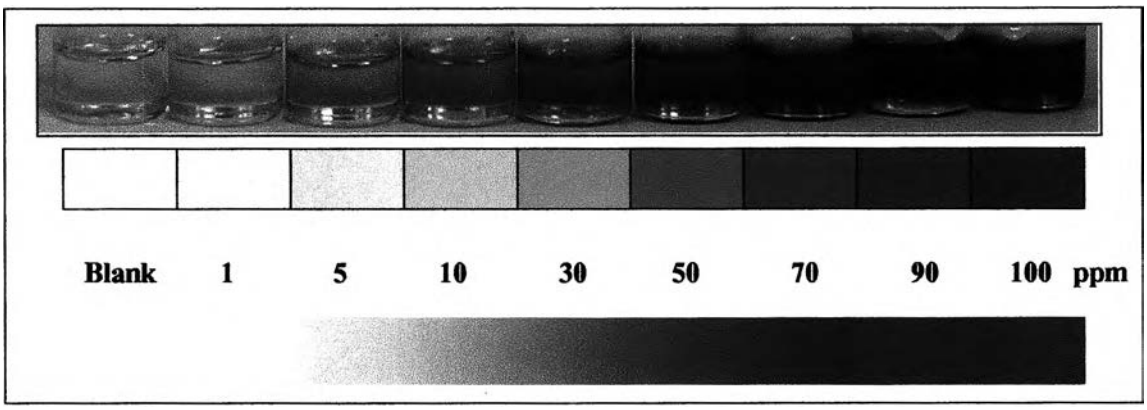
รูปที่ 4.12 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร ของคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO 30 ppm หลังหยดน้ำยาทดสอบซึ่งเก็บรักษาในขวดสีชาในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 6 เดือน

จากการทดสอบพบว่าในระยะเวลา 6 เดือน สีของคลอแรมเฟนิคอลหลังหยดน้ำยาทดสอบมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.487 ในเดือนสุดท้ายค่าการดูดกลืนแสงลดลงเหลือเพียง 32.83 เปอร์เซ็นต์ ของเดือนแรก และมี RSD เกินกว่า 10 % เมื่อคำนวณหาระยะเวลาที่น้ำยาทดสอบไม่เกิดสีกับคลอแรมเฟนิคอลจากสมการ Linear regression คือ y = -0.1143x + 0.8864 พบว่าระยะเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงของคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO หลังหยดน้ำยาทดสอบเท่ากับศูนย์ คือ 7.75 เดือน สอดคล้องกับการเปลี่ยนสีของ 1 M KOH/IPA ที่จะเริ่มเปลี่ยนสีจากสารละลายใสไม่มีสีเป็นสีน้ำตาลอ่อนในระยะเวลา 1 เดือนและเข้มขึ้นในเดือนถัดไป

ดังนั้นในการรักษาเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ (1 M KOH/IPA) จึงควรเก็บรักษาน้ำยาทดสอบในขวดสีชาและแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ จะทำให้น้ำยาทดสอบยังคงมีประสิทธิภาพอยู่ได้นาน 1 เดือน

4.3 ผลการสร้างแถบสีมาตรฐาน

แถบสีมาตรฐานเป็นการสร้างแถบสีที่จำลองจากสีที่เกิดขึ้นจริง ของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-100 ppm หลังการใช้น้ำยาทดสอบนาน 3 นาที เพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจวัดความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่อาจพบปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ให้มีความสะดวกต่อการนำไปใช้งานภาคสนาม แถบสีมาตรฐานนี้ประกอบด้วยภาพถ่ายของสีที่เกิดขึ้นจริง และแถบสีมาตรฐานจำลองที่สร้างจากการเทียบความเข้มสี เนื่องจากสีที่ได้จากภาพถ่ายอาจมีความผิดเพี้ยนจากความเป็นจริงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงแถบสีมาตรฐานของชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล

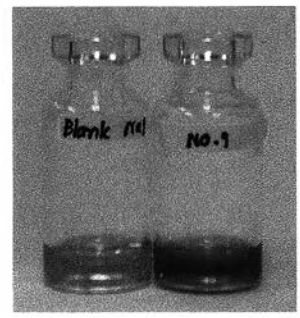
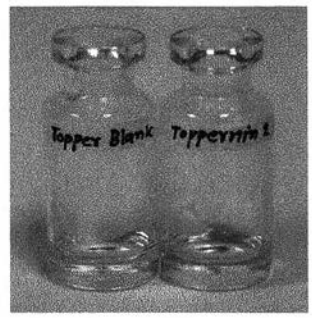
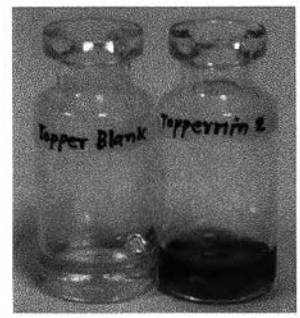
หมายเหตุ : สีที่เห็นเป็นสีที่ได้จากรูปถ่ายอาจไม่ชัดเจนเหมือนกับสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

4.4 ผลการนำชุดตรวจสอบไปใช้ และประเมินชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างอาหารกุ้ง สารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) และดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry เทียบกับเทคนิค HPLC

นำชุดตรวจสอบไปใช้กับตัวอย่างอาหารกุ้งเบอร์ 1 สารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) Mineral premix ยี่ห้อ Toppermin และดินบ่อเลี้ยงกุ้งระดับความลึก 2 เซนติเมตร โดยการ Spike คลอแรมเฟนิคอล 0.1 มิลลิกรัม ลงในตัวอย่างอาหารกุ้งเบอร์ 1 สารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) Mineral premix ยี่ห้อ Toppermin และดินบ่อเลี้ยงกุ้งระดับความลึก 2 เซนติเมตร น้ำหนัก 2 กรัม แล้วนำไปตรวจหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลด้วยชุดตรวจสอบ พบว่าเมื่อหยดน้ำยาทดสอบ 1 M KOH/IPA ลงในส่วนใสที่กรองได้จากการละลายคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างอาหารกุ้งด้วย DMSO เกิดการเปลี่ยนแปลงสีและมีตะกอนขุ่นเนื่องจากไขมันในอาหารกุ้งทำปฏิกิริยากับ

1 M KOH/IPA และบดบังสีของคลอแรมเฟนิคอล จึงจำเป็นกำจัดสิ่งรบกวนโดยการกำจัดไขมันด้วยการสกัดด้วย Hexane ก่อนนำมาทดสอบกับชุดตรวจสอบ ซึ่งจากการทดลองที่ 4.1.3.1 ผลการศึกษาการละลายของคลอแรมเฟนิคอลพบว่า Hexane มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการกำจัดสิ่งรบกวนประเภทไขมันในตัวอย่างและไม่ส่งผลต่อปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ผลการตรวจสอบความใช้ได้จากการสังเกตด้วยตาเปล่า (Visual test) ของชุดตรวจสอบแสดงได้ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงสีที่เกิดจากการทดสอบชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังหยดน้ำยาทดสอบ

ตัวอย่าง	Visual test	
	ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ	หลังหยดน้ำยาทดสอบ
อาหารกุ้งเบอร์ 1		
Mineral Premix		
ดินบ่อเลี้ยงกุ้งระดับความลึก 2 เซนติเมตร		

หมายเหตุ : Blank ในรูปถ่ายหมายถึง Sample blank

สีที่เห็นเป็นสีที่ได้จากรูปถ่ายอาจไม่ชัดเจนเหมือนกับสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

จากตารางที่ 4.14 เมื่อใช้น้ำยาทดสอบกับตัวอย่างชนิดต่าง ๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลง พบว่าตัวอย่างที่มีการ Spike คลอแรมเฟนิคอล 0.1 มิลลิกรัม เกิดสีแดงอมชมพูแตกต่างจากแบลงค์ อ่านความเข้มสีจากแถบสีมาตรฐานของคลอแรมเฟนิคอลได้ประมาณ 50 ppm (คลอแรมเฟนิคอล 50 ไมโครกรัม ใน DMSO 1 มิลลิลิตร) สรุปได้ว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้กับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลได้จริง โดยสีที่เกิดขึ้นอาจแตกต่างจากสีที่เกิดจากสารละลายมาตรฐานเล็กน้อยเนื่องจากการรบกวนของสีที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น วิตามิน แร่ธาตุ และส่วนผสมอื่น ๆ จึงต้องยืนยันผลที่ได้ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry และ HPLC

4.4.1 ผลการวิเคราะห์หาค่าความถูกต้อง (Recovery) และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (RSD) ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry

ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร ของสีที่เกิดหลังทดสอบตัวอย่างอาหารกุ้ง Mineral premix และดินริมบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการ Spike คลอแรมเฟนิคอลปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ซึ่งมีสมการ Linear regression คือ $y = 0.023x + 0.0747$ สามารถนำไปคำนวณหาค่าความถูกต้อง (Recovery) และ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (RSD) แสดงดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าความถูกต้อง (Recovery) และ ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (RSD) ของการตรวจวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry

ลำดับที่	ตัวอย่าง (n=5)	ปริมาณ CAP (µg)		Recovery (%)	RSD (%)
		Spike	ตรวจพบ		
1	อาหารกุ้ง	100	75.07	75.07	9.51
2	Mineral premix	100	89.80	89.80	9.18
3	ดินบ่อเลี้ยงกุ้ง	100	91.23	91.23	5.56

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย UV-Visible spectrophotometer

หมายเหตุ : ตัวอย่างอาหารกุ้งและ Mineral premix ก่อนการ Spike ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอล ดังนั้นปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike คลอแรมเฟนิคอล มีค่าเท่ากับ 0

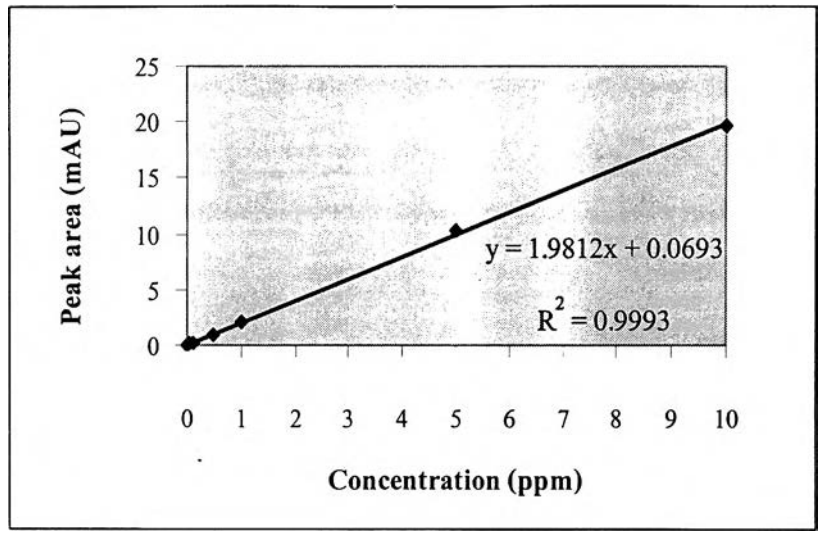
ตัวอย่างดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ความลึก 2 cm ก่อนการ Spike ตรวจพบการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอล เท่ากับ 1.80 ng/g (สุวิมล, 2545) ดังนั้นปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike สารมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.0036 μg

ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ตรวจพบ
= ปริมาณคลอแรมเฟนิคอล (μg) × Correction factor (0.2041, ภาคผนวก จ)

เมื่อยืนยันความสามารถในการตรวจวัดของชุดตรวจสอบด้วย UV-Visible spectrophotometer โดยตรวจวัดตัวอย่างอาหารกุ้งและ Mineral premix ก่อนทำการ Spike ไม่พบการปนเปื้อนคลอแรมเฟนิคอล ส่วนตัวอย่างดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ความลึก 2 cm ก่อนการ Spike ตรวจพบคลอแรมเฟนิคอล ปริมาณ เท่ากับ 1.80 ng/g และเมื่อ Spike คลอแรมเฟนิคอลลงในตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม แล้วละลายคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างด้วย DMSO 10 มิลลิลิตร นำมาส่วนใสที่กรองได้มาตรวจด้วยน้ำยาทดสอบ 1 M KOH/IPA อัตราส่วน 25:1 พบว่าเกิดสีที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 518 นาโนเมตร เมื่อคำนวณปริมาณสารที่ตรวจพบ จากส่วนใสก่อนกรอง 9 มิลลิลิตร คูณด้วย Correction factor พบว่ามีค่าความถูกต้อง (Recovery) อยู่ในช่วง 75-91 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคืออยู่ในช่วง 70-110 % (Official Journal of the European Communities) และมีความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (RSD) $\leq$ 10 % แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มี Accuracy ดี

4.4.2 ผลการศึกษาช่วงการตรวจวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลด้วย HPLC ที่เหมาะสม

สุวิมล (2545) ศึกษาการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลในดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง พบว่าสภาวะเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดคลอแรมเฟนิคอลด้วย HPLC คือที่ความยาวคลื่นสูงสุด 278 นาโนเมตร และใช้เมทานอลและน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 เป็นโมบายล์เฟส ผลการศึกษาช่วงการตรวจวัดคลอแรมเฟนิคอลโดย HPLC ชนิด Photodiode Array Detecter ในสภาวะเดียวกันพบว่าสามารถตรวจสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลได้ในช่วง 0.05-10 ppm



รูปที่ 4.14 แสดง Calibration range ของคลอแรมเฟนิคอลที่ 287 นาโนเมตร ความเข้มข้น 0.05-10 ppm

จากรูปที่ 4.14 พบว่ากราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Peak area และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็นกราฟเส้นตรง มีค่า R^2= 0.9993 สมการ Linear regression คือ y = 1.9812x + 0.0693 ซึ่งสามารถนำไปคำนวณหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ในการวิเคราะห์ความถูกต้องของชุดตรวจสอบต่อไป

4.4.3 ผลการวิเคราะห์หาค่าความถูกต้อง (Recovery) ของชุด ตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค HPLC

ตรวจวัดสารตัวอย่างที่สกัดได้จากการทดลองที่ 4.4 ซึ่งเจือจางให้มีความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน คือ 0.05-10 ppm ด้วย HPLC ที่ 278 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล จากสมการ Linear regression y = 1.9812x + 0.0693 ที่ได้จากการทดลองที่ 4.5.2 ได้ค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Recovery) ดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงค่าความถูกต้อง (Recovery) ของการตรวจวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นด้วย HPLC

ลำดับที่	ตัวอย่าง (n=5)	ปริมาณ CAP (µg)		Recovery (%)
		Spike	ตรวจพบ	
1	อาหารกุ้ง	100	95.33	95.33
2	Mineral preinix	100	92.94	92.94
3	ดินบ่อเลี้ยงกุ้ง	100	94.26	94.26

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : ตัวอย่างอาหารกุ้งและ Mineral premix ก่อนการ Spike ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอล ดังนั้นปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike คลอแรมเฟนิคอล มีค่าเท่ากับ 0

ตัวอย่างดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ความลึก 2 cm ก่อนการ Spike ตรวจพบการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอล เท่ากับ 1.80 ng/g (สุวิมล, 2545) ดังนั้นปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike สารมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.0036 µg

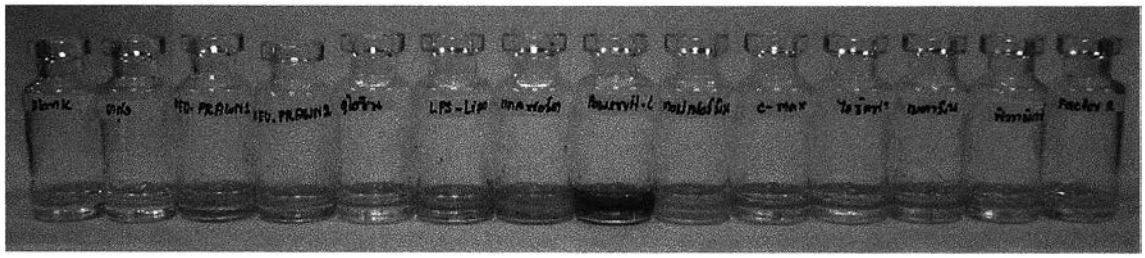
ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ตรวจพบ
= ปริมาณคลอแรมเฟนิคอล (µg) × Correction factor (0.2041, ภาคผนวก จ)

ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC ของตัวอย่างอาหารกุ้งและ Mineral premix ก่อนทำการ Spike ไม่พบการปนเปื้อนคลอแรมเฟนิคอล ส่วนตัวอย่างดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ความลึก 2 cm ก่อนการ Spike ตรวจพบคลอแรมเฟนิคอลปริมาณเท่ากับ 0.0036 µg และเมื่อ Spike คลอแรมเฟนิคอล ลงในตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วย DMSO 10 มิลลิลิตร นำส่วนใสที่กรองได้วิเคราะห์ด้วย HPLC คำนวณปริมาณสารที่ตรวจพบ จากส่วนใสก่อนกรอง 9 มิลลิลิตร คูณด้วย Correction factor พบว่ามีค่าความถูกต้อง (Recovery) อยู่ในช่วง 93-95 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คืออยู่ในช่วง 70-110 % (Official Journal of the European Communities)

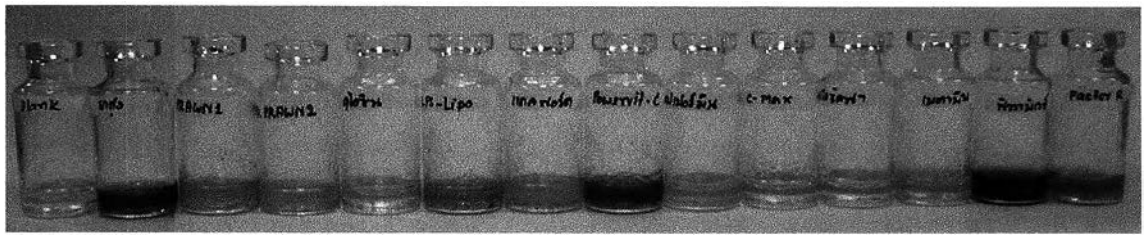
ผลการตรวจสอบความใช้ได้ พบว่าชุดตรวจสอบสามารถตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลในอาหารกุ้ง สารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) และดินบ่อเลี้ยงกุ้งได้จริง เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวัดคลอแรมเฟนิคอลของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับวิธี HPLC แล้วพบว่า ทั้งสองวิธีมีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และชุดตรวจสอบมี Accuracy ดี

4.5 ผลการศึกษาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ในสารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

สารเติมในอาหารสัตว์ (Feed Additive) ที่ผลิตขึ้นจำหน่ายมีหลายประเภทซึ่งอาจมีส่วนผสมเป็นวิตามิน แร่ธาตุ แม้กระทั่งยาปฏิชีวนะ การศึกษานี้เป็นการนำชุดตรวจสอบไปใช้กับสารเติมในอาหารกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน 13 ยี่ห้อคือ ยากุ้ง NEU-Prawn1 NEU-Prawn2 คูโอซิน LPS แคลฟอร์ต พาวเวอร์วิท-ซี ทอปเปอร์มิน ซีแมกซ์ ไฮ-ซัลฟา เบต้ามิน ฟีวรามิกซ์ และ Factor R มาทดสอบกับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นว่าสามารถตรวจหาคลอแรมเฟนิคอล ที่ปนเปื้อนอยู่ในสารเติมเหล่านั้นได้หรือไม่ โดยสังเกตด้วยตาเปล่า ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.15-4.16 และตารางที่ 4.17



รูปที่ 4.15 แสดงสีที่เกิดขึ้นกับสารเติมในอาหารกุ้งชนิดต่าง ๆ ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ



รูปที่ 4.16 แสดงสีที่เกิดขึ้นกับสารเติมในอาหารกุ้งชนิดต่าง ๆ หลังหยดน้ำยาทดสอบ

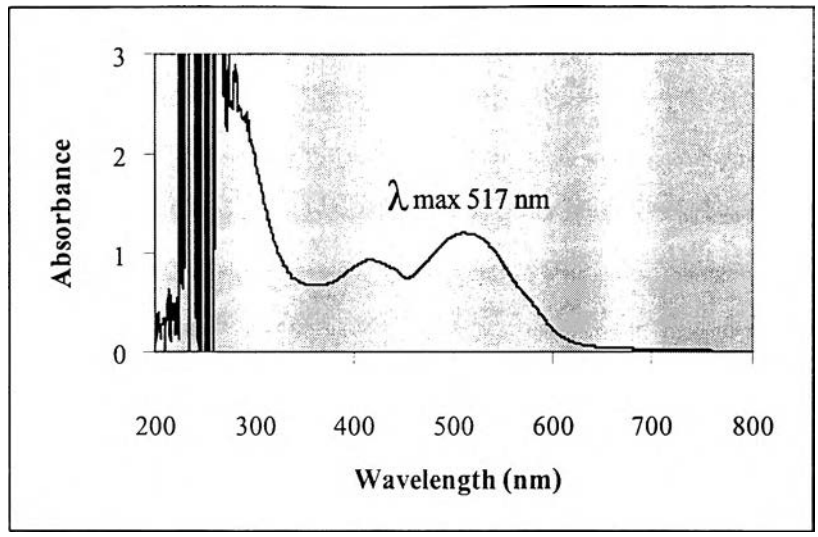
หมายเหตุ : สีที่เห็นเป็นสีที่ได้จากรูปถ่ายอาจไม่ชัดเจนเหมือนกับสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการทดสอบชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างสารเติมในอาหารกุ้ง ก่อนและหลังหยดน้ำยาทดสอบ และผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลโดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer และ HPLC

ลำดับที่	ชื่อสารเติมในอาหารกุ้ง	การเปลี่ยนแปลง		ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (ppm)	
		ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ	หลังหยดน้ำยาทดสอบ	UV-Vis.	HPLC
1	ยากุ้ง	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายสีแดง	51.49	51.36
2	NEU-Prawn1	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลืองขุ่น	ND	ND
3	NEU-Prawn2	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลืองขุ่น	ND	ND
4	ดูโอซิน	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายสีเหลือง	ND	ND
5	LPS	สารละลายสีเหลืองใส	สารละลายสีเหลืองเข้ม	ND	ND
6	แคลฟอร์ต	สารละลายสีน้ำตาล	สารละลายสีน้ำตาลขุ่น	ND	ND
7	พาวเวอร์วิท-ซี	สารละลายสีส้ม	สารละลายสีม่วง	ND	ND
8	ทอปเปอร์มิน	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง	ND	ND
9	ซีแมกซ์	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง	ND	ND
10	ไฮ-ซัลฟา	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายสีเหลือง	ND	ND
11	เบต้ามิน	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง	ND	ND
12	ฟิวรามิกซ์	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีน้ำเงินเข้ม	ND	ND
13	Factor R	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีน้ำตาล	ND	ND

หมายเหตุ : ND คือ Not Detected

จากการทดสอบสารเติมในอาหารกุ้งความเข้มข้น 100 ppm (0.1 มิลลิกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร) กับชุดตรวจสอบพบว่ามีสารเติมชนิดยากุ้งที่ให้ผลการตรวจที่เป็นบวกคือได้สารละลายสีแดงหลังหยดน้ำยาทดสอบ จึงยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry เทียบกับ HPLC โดยเตรียมยากุ้งให้มีความเข้มข้น 100 ppm หยดด้วยน้ำยาทดสอบ ทิ้งไว้นาน 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer และคำนวณหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลได้จากสมการ Linear regression $y = 0.023x + 0.0747$ ที่ได้จากการทดลองที่ 4.2.1 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.17 และตารางที่ 4.18

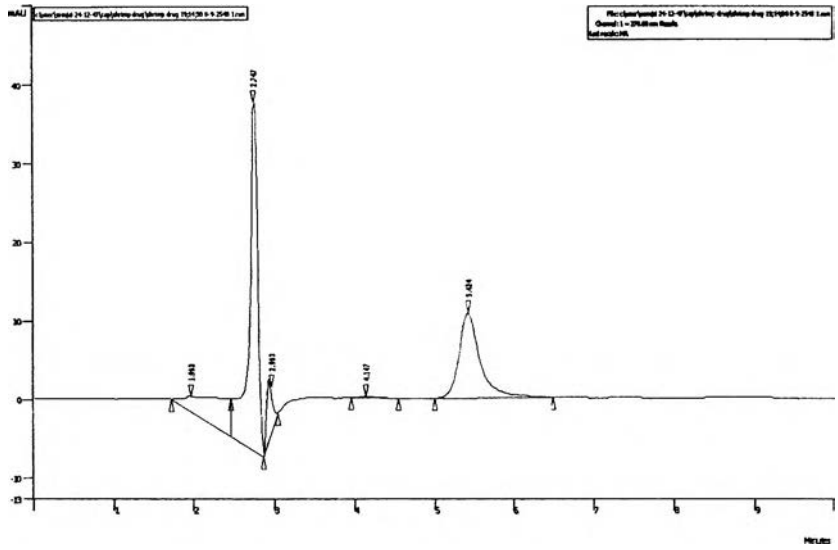


รูปที่ 4.17 แสดงการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตของยากุ้งใน DMSO ความเข้มข้น 100 ppm หลังหยดน้ำยาทดสอบ 3 นาที

ตารางที่ 4.18 แสดงผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล ที่ผสมในสารเติมชนิดยากุ้ง โดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer

UV-Visible spectrophotometer	ผลการวิเคราะห์
λ max	517 nm
Absorbance	1.259
ความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอล	51.49 ppm
สมการถดถอยเชิงเส้น	y = 0.023x+ 0.0747

เมื่อเจือจางยากุ้งให้มีความเข้มข้นในช่วงกราฟมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล คือ 0.05-10 ppm แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 278 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล จากสมการ Linear regression y = 1.9812x + 0.0693 ที่ได้จากการทดลองที่ 4.4.2 ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.18 และตารางที่ 4.19



รูปที่ 4.18 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของยากุ้งความเข้มข้น 10 ppm

ตารางที่ 4.19 แสดงผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล ที่ผสมในสารเติมชนิดยากุ้ง โดยใช้เครื่อง HPLC

HPLC	ผลการวิเคราะห์
Retention time	5.424 minute
Peak area	10.25 mAU
ความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอล	51.36 ppm
สมการถดถอยเชิงเส้น	y = 1.9812x + 0.0693

จากผลการทดสอบด้วย UV-Visible spectrophotometer พบว่าสีที่เกิดขึ้นมีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในช่วงเดียวกับสีของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล นำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณหาความเข้มข้นจากสมการ Linear regression ได้เท่ากับ 51.49 ppm และเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าค่า Retention time อยู่ในช่วงเดียวกับสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล และสามารถคำนวณความเข้มข้นได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบคือได้เท่ากับ 51.36 ppm สรุปได้ว่าสารเติมในอาหารกุ้งชนิดยากุ้งนี้มีคลอแรมเฟนิคอลผสมอยู่จริง

4.6 ผลการศึกษาสิ่งรบกวน ที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบ

เป็นการศึกษาหาความผิดพลาดจากการเกิดผลบวกลวง (False positive) ที่อาจเกิดขึ้น จากการใช้ชุดตรวจสอบกับตัวอย่างที่ไม่มีส่วนผสมของคลอแรมเฟนิคอลแต่ให้ผลบวกในการตรวจสอบ โดยนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นทดสอบกับสารในหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ และยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น (Visual test) หากพบผลบวกลวงจะต้องนำข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นนี้ไปปรับปรุงแก้ไขต่อไป

4.6.1 ผลการหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ

ศึกษาหาความผิดพลาด (False positive) กับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ โดยหมู่ฟังก์ชันที่นำมาทดสอบมี 11 หมู่ จากสารตัวอย่าง 20 ชนิด ผลการทดสอบพบว่า สารบางชนิดสามารถเกิดสีกับชุดตรวจสอบ แสดงดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 แสดงผลการหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ

ลำดับที่	ชื่อสาร	หมู่ฟังก์ชัน	การเปลี่ยนแปลง
1	Metanol	Alcohol	ไม่เปลี่ยนแปลง
2	Ethanol		"
3	Phenol	Phenol	"
4	β-napthol		สารละลายสีเขียวอ่อน
5	Chloroform	Alkly halide	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน
6	Acetaldehyde	Aldehyde	สารละลายสีน้ำตาล
7	Acetone	Ketone	สารละลายสีน้ำตาลแดง
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		"

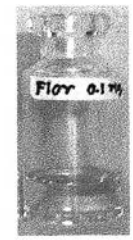
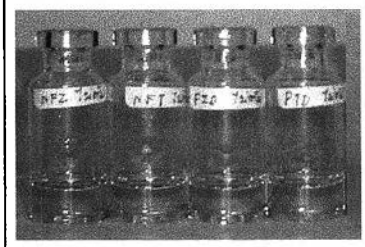
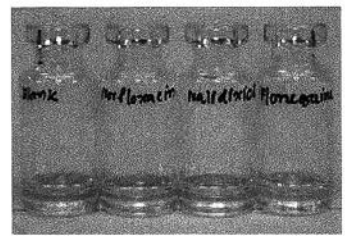
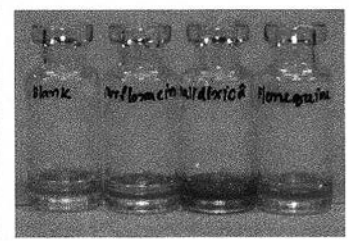
ลำดับที่	ชื่อสาร	หมู่ฟังก์ชัน	การเปลี่ยนแปลง
15	N,n-dimethylaniline	3°Amine	"
16	Ethylenediamine	1°amine	"
17	Pyridine	3°Amine (Heteroaromatic)	"
18	Urea	1°Amide	"
19	Acetonitrile	R-nitrile	"
20	น้ำตาลทราย (Disaccharide)	Carbohydrate	"

เมื่อทดสอบสารตามหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น พบว่าสารที่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้สารมีสีคือ β-napthol Chloroform Acetaldehyde และ Acetone แต่สีที่เกิดขึ้นนั้นต่างจากสีที่เกิดขึ้นหลังหยดน้ำยาทดสอบของคลอแรมเฟนิคอล สรุปได้ว่าสารตามหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ที่เลือกมาทดสอบนั้นไม่เกิด False positive กับน้ำยาทดสอบ สีที่เกิดขึ้นจึงไม่ใช่ข้อผิดพลาดของชุดตรวจสอบ

4.6.2 ผลการหา False positive กับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ

ศึกษาหาความผิดพลาด (False positive) ที่อาจเกิดจากการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับยาปฏิชีวนะที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้ง 8 ชนิด คือยา Florphenicol (ตัวอย่างจาก WHO), Nitrofurazone, Nitrofurantoin, Furazolidone, Furaltadone, Norfloxacin, Nalidixic acid และ Flumequine (จากบริษัท Sigma) ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 แสดงผลการหา False positive กับปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ

ยาปฏิชีวนะ	การเปลี่ยนแปลง	
	ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ	หลังหยดน้ำยาทดสอบ
- Florphenicol		
- Nitrofurazone - Nitrofurantoin - Furazolidone - Furaltadone		
- Norfloxacin - Nalidixic acid - Flumequine		

หมายเหตุ : สีที่เห็นเป็นสีที่ได้จากรูปถ่ายอาจไม่ชัดเจนเหมือนกับสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

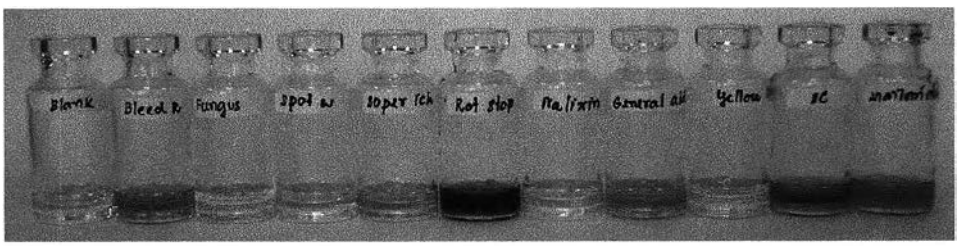
เมื่อทดสอบยาปฏิชีวนะทั้ง 8 ชนิด ความเข้มข้น 100 ppm (0.1 มิลลิกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร) ด้วยชุดตรวจสอบพบว่า ยาบางชนิดสามารถเกิดสีกับน้ำยาทดสอบเช่น ยา Nitrofurazone, Nitrofurantoin, Furazolidone, Furaltadone, Nalidixic acid และ Flumequine แต่สีที่เกิดขึ้นไม่ตรงกับสีของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ยา Florphenicol ไม่เกิดสีกับชุดตรวจสอบ แม้เป็นสารในกลุ่มคลอแรมเฟนิคอลเหมือนกันแต่ให้ผลในการตรวจสอบต่างกัน สรุปได้ว่ายาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่เลือกมาทดสอบนั้นไม่เกิด False positive กับน้ำยาทดสอบ สีที่เกิดขึ้นจึงไม่ใช่ข้อผิดพลาดของชุดตรวจสอบ

4.6.3 ผลการหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

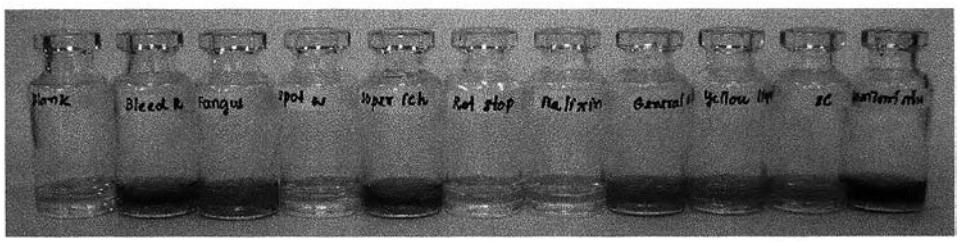
ศึกษาหาความผิดพลาด (False positive) ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ชุดตรวจสอบกับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา 10 ชนิด ผลการทดสอบเป็นไปดังตารางที่ 4.22 รูปที่ 4.19 และ 4.20

ตารางที่ 4.22 แสดงผลการหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

ลำดับที่	ชื่อทางการค้า	การเปลี่ยนแปลง		False positive
		ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ	หลังหยดน้ำยาทดสอบ	
1	Bleed R	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน	สารละลายสีน้ำตาลเข้ม	No
2	Fungus	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีส้ม	No
3	Spot W	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใสไม่มีสี	No
4	Super Ich	สารละลายสีฟ้าอ่อน	สารละลายใสไม่มีสี	No
5	Rot stop	สารละลายสีฟ้าเข้ม	สารละลายใสไม่มีสี	No
6	Nalixin	สารละลายใสไม่มีสี	สารละลายใส ไม่มีสี	No
7	General aid	สารละลายสีเขียว	สารละลายสีส้ม	No
8	Yellow liquid	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีส้มอ่อน	No
9	SC	สารละลายสีเขียวเข้ม	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน	No
10	มาลาไคท์ กรีน เอฟ	สารละลายสีเขียวอ่อน	สารละลายสีม่วง	No



รูปที่ 4.19 แสดงสีของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาก่อนหยดน้ำยาทดสอบ



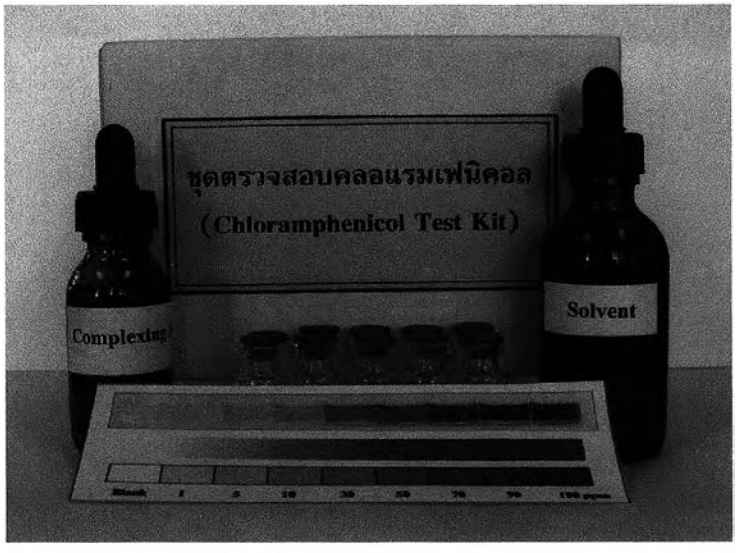
รูปที่ 4.20 แสดงสีของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาหลังหยดน้ำยาทดสอบ

ผลการทดสอบยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาด้วยชุดตรวจสอบ พบว่ายาหลายชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงสี ยกเว้น Spot W และ Nalixin สีของยาที่เปลี่ยนไปไม่มียาชื่อใดให้ผลตรงกับสีที่เกิดจากคลอแรมเฟนิคอลรวมทั้งลักษณะของปฏิกิริยาต่างจากปฏิกิริยาที่เกิดจากคลอแรมเฟนิคอลที่จะค่อย ๆ develop สีภายในสามนาที พบว่าสีที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงทันทีและมีความคงตัว ซึ่งอาจเนื่องจากมีการผสมสีเป็นสิ่งรบกวน สรุปได้ว่า ยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาที่เลือกมาทดสอบนั้นไม่เกิด False positive กับน้ำยาทดสอบ สีที่เกิดขึ้นจึงไม่ใช่ข้อผิดพลาดของชุดตรวจสอบ

จากการศึกษาสิ่งรบกวนที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างสามประเภทคือ สารตามหมู่ฟังก์ชัน ยาปฏิชีวนะและยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา สรุปได้ว่าไม่พบสารใดที่ให้ผลบวกลวงกับชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล กรณีนี้จึงไม่จำเป็นต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาทางปรับปรุง แก้ไข ข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้น

4.7 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีคัลเลอลิเมตริกที่มีในปัจจุบัน

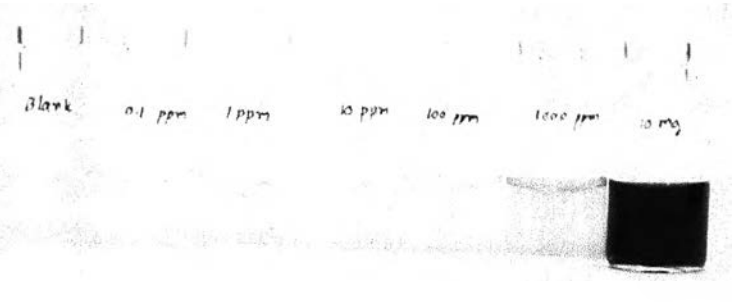
คลอแรมเฟนิคอลเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการค้นพบมาเป็นเวลากว่า 60 ปี ย่อมมีผู้ทำการศึกษาหาวิธีวิเคราะห์มาแล้วเป็นจำนวนมาก การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบ ลักษณะการใช้ และคุณภาพของชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลที่พัฒนาขึ้น กับการตรวจวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลด้วยวิธีคัลเลอลิเมตริก ซึ่งเป็นวิธีที่มีผู้คิดค้นเพื่อตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยตรง โดยได้เลือกวิธีทดสอบมา 3 วิธี เพื่อมาทำการศึกษาคือ วิธีตามตำหรับยาของสหราชอณาจักร วิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol และ ชุดทดสอบคลอแรมเฟนิคอลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน



รูปที่ 4.21 แสดงชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลที่พัฒนาขึ้น

4.7.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีตามตำหรับยาของสหราชอณาจักร (British Phamacopoeia)

ตำหรับยาของสหราชอณาจักร ได้เสนอวิธีวิพิสูจน์เอกลักษณ์คลอแรมเฟนิคอล ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี โดยสารที่เป็นคลอแรมเฟนิคอลจะเกิดเป็นชั้นของเหลวใสสีม่วงแดงถึงแดง ผลการทำปฏิกิริยาการเกิดสีเป็นไปดังรูปที่ 4.22

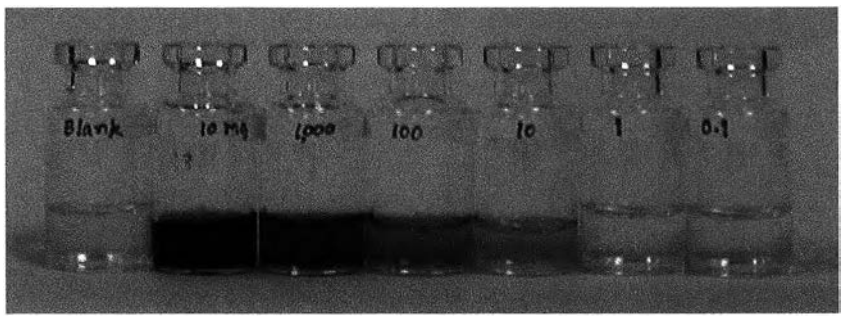


รูปที่ 4.22 แสดงผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีตามตำหรับยาของสหราชอณาจักร

จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.22 พบว่าวิธีนี้มีความไวต่ำต้องใช้คลอแรมเฟนิคอลปริมาณถึง 10 มิลลิกรัม จึงแยกความแตกต่างระหว่างแบลงค์และคลอแรมเฟนิคอลได้ รวมถึงต้องนำส่วนผสมที่ได้ไปต้มนาน 10 นาที ซึ่งไม่สะดวกและยุ่งยาก

4.7.2 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol

Masterson (1968) ศึกษาการวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอล ด้วยวิธีทำให้เกิดสีกับ แอลฟาแนฟธอล (α-napthol) โดยไฮโดรไลส์คลอแรมเฟนิคอลในสารละลายด่าง จะได้สารประกอบซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอลฟาแนฟธอล แล้วได้สารสีน้ำเงิน มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 610 นาโนเมตร ผลการทดลองเป็นไปตามรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 แสดงผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol

จากรูปที่ 4.23 พบว่าวิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol สามารถตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลได้ปริมาณต่ำสุดคือ 10 ppm ถือว่าเป็นปริมาณที่ค่อนข้างต่ำแต่วิธีการทดสอบต้องใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นสูงมากถึง 12 โมลาร์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และต้องนำส่วนผสมไปต้มนานถึง 30 นาที ซึ่งไม่สะดวกและยุ่งยาก

4.7.3 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยชุดทดสอบคลอแรมเฟนิคอลของกรม วิทยาศาสตร์การแพทย์

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2545) ได้จัดทำชุดทดสอบคลอแรมเฟนิคอลอย่างง่ายโดยใช้เทคนิคการเกิดสี ซึ่งสามารถทดสอบตัวยาคลอแรมเฟนิคอล เมโทรนิดาโซล เคปโซนและยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ ในตัวอย่างเภสัชเคมีภัณฑ์หรือเภสัชเคมีภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูปโดยระดับต่ำสุดที่ตรวจได้ตามคู่มือระบุไว้คือ 100 ไมโครกรัม ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.24

รูปที่ 4.24 แสดงผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยชุดทดสอบคลอแรมเฟนิคอลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จากผลการทดสอบคลอแรมเฟนิคอลด้วยชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าให้สีที่ตรงกับการแปลผลจากคู่มือ คือแบลงค์จะเป็นสารละลายสีเหลือง ส่วนขวดที่มีคลอแรมเฟนิคอลจะให้สารละลายสีส้มถึงแดง ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจสอบได้คือ 1,000 ppm เมื่อนำมาคิดเป็นน้ำหนักคลอแรมเฟนิคอลแล้วพบว่าเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัม และจำกัดการทดสอบว่าต้องเป็นเภสัชเคมีภัณฑ์หรือเภสัชเคมีภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูปเท่านั้น

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีคัลเลอลิเมตริกที่มีในปัจจุบันเป็นดังนี้

1. ด้านความแม่นยำ ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดคลอแรมเฟนิคอล ได้อย่างแม่นยำ สีที่เกิดขึ้นเป็นสีที่ชัดเจนแยกความแตกต่างกับแบลงค์ได้ง่ายด้วยตาเปล่า (Visual test) ความเข้มของสีเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณคลอแรมเฟนิคอล และสีที่เกิดขึ้นนี้จะมีความเสถียรอยู่ได้ประมาณ 20 นาที จากนั้นสีจะค่อย ๆ เปลี่ยนเฉดไป ซึ่งวิธีตามตำหรับยาของสหราชอณาจักร วิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol และชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ต่างให้ความแม่นยำสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์คลอแรมเฟนิคอลได้อย่างดีเช่นกัน คือสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสีที่เกิดขึ้นกับแบลงค์ได้ชัดเจนและสีที่เกิดขึ้นมีความเสถียร

2. ด้านความไว ความเข้มข้นต่ำสุดของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดได้คือ 1 ppm (คลอแรมเฟนิคอล 1 ไมโครกรัมในปริมาณ DMSO 1 มิลลิลิตร) ส่วนวิธีตามตำหรับยาของ สหราชอณาจักรตรวจได้ 10,000 ppm (เท่ากับ 10 มิลลิกรัมใน Ethanol 50% (v/v) 1 มิลลิลิตร) วิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol ตรวจได้ 10 ppm (เท่ากับ 10

ไมโครกรัม ในเมทานอล 1 มิลลิลิตร) และชุดทดสอบกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจได้ 1,000 ppm (เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมใน Ethanol 50% (v/v) 1 มิลลิลิตร) ซึ่งไม่เหมาะแก่การตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลในปริมาณต่ำ

3. ด้านความสะดวกของวิธีทดสอบ พบว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นให้ความสะดวกแก่ผู้ใช้โดยมีตัวทำละลายคือ DMSO และน้ำยาทดสอบคือ และ 1 M KOH/IPA ผสมกันในอัตราส่วน 25 ต่อ 1 ปฏิกิริยาสารมารถเกิดได้ภายใน 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และได้สร้างแถบเทียบสีมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-100 ppm (1-100 ไมโครกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร) ที่ประกอบด้วยรูปถ่ายของสีที่เกิดขึ้นจริงและแถบสีจำลองเพื่อให้ง่ายต่อการเทียบความเข้มสีเนื่องจากภาพถ่ายอาจมีความผิดเพี้ยนจากความเป็นจริงเล็กน้อย เหมาะแก่การนำไปใช้ในงานภาคสนาม ในขณะที่วิธีวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอล ตามตำหรับยาของสหราชอณาจักรและวิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาและไม่สะดวก โดยชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จำกัดการทดสอบว่าต้องเป็นเภสัชเคมีภัณฑ์หรือเภสัชเคมีภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูปเท่านั้น

4. ด้านความคงทน โดยทดสอบความคงทนภายใต้สภาวะต่าง ๆ กับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น พบว่าเมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบไว้พ้นแสงในขวดสีชา ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส เสถียรภาพของน้ำยาทดสอบลดลงเมื่อระยะการเก็บรักษานานขึ้น คุณสมบัติในการทดสอบและสภาพน้ำยาทดสอบ ลดลงตั้งแต่เดือนแรกที่เก็บรักษา ในขณะที่ คู่มือจากชุดทดสอบคลอแรมเฟนิคอลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ระบุไว้ว่ามีอายุการเก็บรักษานาน 6 เดือน และต้องเก็บในที่อุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส

5. ด้านความเป็นอันตราย น้ำยาของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีอันตรายต่อผู้ใช้งานคือ DMSO มีความเป็นพิษต่ำ อัตราการดูดซึมต่ำ เป็นพิษเล็กน้อยต่อต่อมน้ำเหลืองในมนุษย์ ในกรณีร้ายแรงผลจากการสัมผัสกับผิวชั้นนอกโดยตรงจะเกิดความระคายเคือง ผื่นแดง คันและอาจพบอาการของลมพิษ เป็นหนอง มีตุ่มพุพอง ระคายเคืองต่อดวงตา หากสูดดมในปริมาณมากทำให้เวียนศีรษะ ปวดหัวคลื่นไส้ (The Merk Index, 1989) ดังนั้นผู้ใช้จึงควรเลี่ยงการสัมผัสผิวหนัง ดวงตา และไม่ควรสูดดมไอ เอกสารข้อมูลความปลอดภัยตามระเบียบ EC (European Commission) ไม่ได้กำหนด DMSO ในบัญชีสารที่ก่อให้เกิดอันตราย (EC, 1999) ในขณะที่ IARC (International Agency for Research on Cancer) ไม่จัด DMSO ในรายการสารก่อมะเร็ง ด้านความเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม พบว่า DMSO ไม่เป็นพิษต่อระบบนิเวศน์ ไม่เกิดผลกระทบต่อ

สิ่งแวดล้อมอย่างมีนัยสำคัญ การเก็บรักษาควรเก็บในภาชนะทึบแสง ห่างจากประกายไฟ เก็บในที่เย็นและแห้ง ที่อุณหภูมิสูงกว่า 18.45 องศาเซลเซียส ป้องกัน DMSO กลายเป็นของแข็ง