บทที่ 4

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

จากขั้นตอนและวิธีการดำเนินการศึกษาที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ในบทนี้จะแสดงผลการศึกษาการพัฒนาชุดตรวจสอบควิโนโลนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก โดยจะแสดงผลการทดลองที่ได้ตามลำดับขั้นดังนี้

4.1 ผลการศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีที่สภาวะเหมาะสม ได้แก่ ตัวทำละลาย ค่า pH Complexing agent และอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นต้น

4.2 ผลการตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานของสารกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด, ฟลูมิควิน และ นอร์ฟล็อกซาซิน

4.3 การสร้างแถบสีมาตรฐานของสารกลุ่มควิโนโลน

4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดควิโนโลนด้วยเทคนิค HPLC

4.5 การตรวจสอบชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารสัตว์ ยาสัตว์สำหรับสัตว์ชนิดต่างๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน และหาเปอร์เซ็นต์กลับคืน (% recovery) โดย UV-Visible spectrophotometer เทียบกับเทคนิค HPLC

4.6 ศึกษาสิ่งรบกวนที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบ

4.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ

4.8 ผลการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบอื่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีที่สภาวะเหมาะสม

4.1.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม

4.1.1.1 ผลการศึกษาความสามารถในการละลายของสารในกลุ่มควิโนโลน

ทำการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟลอกซาซิน และฟลูมิควิน โดยใช้ น้ำ, Methanol, Ethanol , Dimethylformamide (DMF), Dimethylsulfoxide (DMSO), กรดไนตริก , Ethyl acetate, กรดซัลฟิวริกและกรดอะซิติก เป็นตัวทำละลาย ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงความสามารถในการละลายของสารควิโนโลนในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลาย (1 ml)	สารตัวอย่าง (0.1 mg)		
	Nalidixic acid	Norfloxacin	Flumequine
น้ำ	ละลายได้น้อย	ละลายได้น้อย	ละลายได้น้อย
Methanol	ละลายได้ไม่ดี	ละลายได้ไม่ดี	ละลายได้ไม่ดี
Ethanol	ละลายได้ไม่ดี	ละลายได้ไม่ดี	ละลายได้ไม่ดี
DMF	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี
DMSO	ละลายได้ไม่ดี	ละลายได้ไม่ดี	ละลายได้ไม่ดี
HNO_3	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี
Ethyl acetate	ละลายได้ไม่ดี	ละลายได้ไม่ดี	ละลายได้ไม่ดี
H_2SO_4	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี
CH_3COOH	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี	ละลายได้ดี

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าสารทั้ง 3 ชนิดละลายได้น้อยมากในน้ำ โดยเกิดเป็นตะกอนสีขาว สำหรับใน Methanol, Ethanol, DMSO และ Ethyl acetate ละลายได้ไม่ดีนัก ตะกอนจะมีลักษณะเป็นเกล็ดคล้ายผงชูรส ส่วนใน DMF, กรดไนตริก, กรดซัลฟิวริกและกรดอะซิติก สารทั้ง 3 ชนิดสามารถละลายเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน จึงสรุปได้ว่า DMF, กรดไนตริก กรดซัลฟิวริกและกรดอะซิติก เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดเพราะสามารถละลายควิโนโลนได้ดีทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการเลือก DMF, กรดไนตริก, กรดซัลฟิวริกและกรดอะซิติก เป็นตัวทำละลายเพื่อทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทำการทดลองต่อไป

4.1.1.2 ผลการศึกษาการเกิดสีโดยใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเติม Complexing agent ชนิดต่างๆ ที่ใช้ตัวทำละลายต่างกันไป คือ การละลายในน้ำและในกรด ดังตารางที่ 4.2 ลงในสารกลุ่มควิโนโลน 0.1 มิลลิกรัม เพียงอย่างเดียวโดยไม่ใช้ตัวทำละลาย เพื่อเป็นการหา Complexing agent ที่จะใช้ในการทดสอบสำหรับชุดทดสอบต่อไป แล้วจึงสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 แสดงชนิด Complexing agent ที่ทำการทดลอง

No.	Complexing agent
1	1% (w/v) $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$ ในน้ำกลั่น
2	1% (w/v) $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$ ใน 1% กรดไนตริก
3	1% (w/v) $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$ ใน 1% กรดไฮโดรคลอริก
4	1% (w/v) $FeCl_3$ ในน้ำกลั่น
5	1% (w/v) $FeCl_3$ ใน 1% กรดไนตริก
6	1% (w/v) $FeCl_3$ ใน 1% กรดไฮโดรคลอริก
7	1% (w/v) $Fe(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำกลั่น

ตารางที่ 4.3 แสดงสีที่เกิดขึ้นของสารกลุ่มควิโนโลนเมื่อใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น						
	1%$Fe(NO_3)_3$ ในน้ำกลั่น	1% $Fe(NO_3)_3$ ใน 1% HCl	1% $Fe(NO_3)_3$ ใน 1% HNO_3	1% $FeCl_3$ ในน้ำกลั่น	1% $FeCl_3$ ใน 1% HCl	1% $FeCl_3$ ใน HNO_3	$Fe(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำกลั่น
NAL							
NOR							
FLU							
Blank							

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อเติม Complexing agent ทั้ง 7 ชนิด แล้ว พบว่า 1% Iron(II) ammonium sulfate 6-hydrateในน้ำกลั่น จะเกิดสีกับนอร์ฟล็อกซาซินเพียงตัวเดียวเท่านั้นจึงไม่ทำการเลือกเป็น Complexing agent ในการทดลองต่อไป สำหรับการใช้ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในน้ำกลั่น , 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไฮโดรคลอริก, 1% Iron(III) chloride ในน้ำกลั่น , 1% Iron(III) chlorideในกรดไฮโดรคลอริก และ 1% Iron(III) chlorideในกรดไนตริกจะให้ผลการเกิดสีกับสารกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด แต่สีของ แบลงค์ มีความใกล้เคียงกับสีของนาลิดิซิก แอซิด และนอร์ฟล็อกซาซิน ส่วน 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริกนั้นจะให้ผลกับควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด และให้สีแตกต่างจากแบลงค์มากที่สุด จึงเลือกที่จะนำไปทำการทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อไป

4.1.1.3 ผลการศึกษาการเกิดสีโดยใช้ตัวทำละลายจาก 4.1.1.1 ร่วมกับ Complexing agent จาก 4.1.1.2

จากข้อ 4.1.1.1 ได้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ DMF, กรดไนตริก กรดซัลฟิวริกและกรดอะซิติก จึงนำมาทำการทดสอบร่วมกับการใช้ 1% $Fe(NO_3)_3x9\ H_2O$ (Iron(III) nitrate nonahydrate) ในกรดไนตริก จากข้อ 4.1.1.2 เป็น Complexing agent ได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงสีของควิโนโลนโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ร่วมกับ Complexing agent

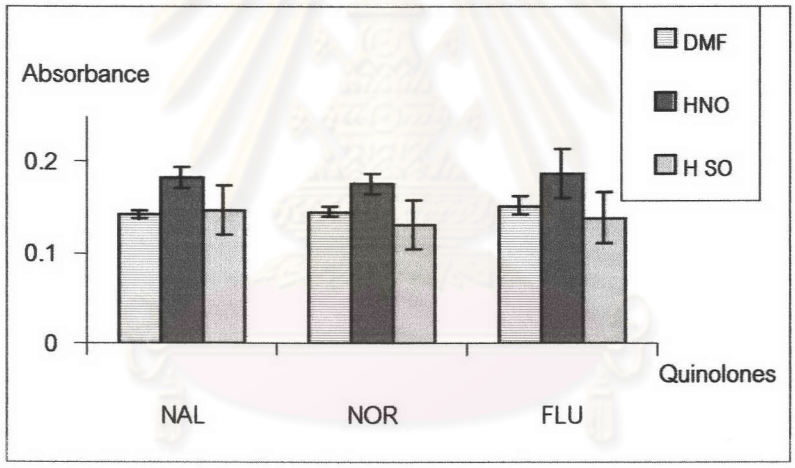
สารตัวอย่าง 0.1 mg	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น			
	HNO_3	DMF	H_2SO_4	CH_3COOH
Nalidixic acid				
Norfloxacin				
Flumequine				
Blank				

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าการใช้กรดอะซิติกนั้นจะให้สีของแบลงค์และสารละลายมาตรฐานควิโนโลนไม่แตกต่างกันเลย จึงไม่ควรใช้กรดอะซิติกเป็นตัวทำละลาย ส่วนการทดลองเมื่อใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลาย (HNO_3 : น้ำ อัตราส่วน 1 : 1) ให้ผลการทดลองที่ชัดเจนที่สุด สังเกตได้จากการทดลองที่ใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลายจะให้สีของสารละลายตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดแตกต่างจากแบลงค์มากกว่าการใช้กรดซัลฟิวริก หรือ DMF เพราะฉะนั้นเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่ากรดไนตริกจึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด

เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองจึงนำสารละลาย 100 ppm ของควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดในตัวทำละลายต่างๆ มา 2 มิลลิลิตร ทดสอบกับ 1 % Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริก 200 ไมโครลิตร ไปทำการทดสอบด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ต่อไป โดยใช้ตัวทำละลายที่ทดสอบเป็นแบลงค์ ได้ผลดังตารางที่ 4.5 และเพื่อให้เห็นถึงความแตกต่างจึงแสดงผลในลักษณะกราฟดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดและค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 100 ppm ในตัวทำละลาย DMF, กรดไนตริกและกรดซัลฟิวริก

สารมาตรฐาน	DMF		HNO_3		H_2SO_4	
	ความยาว คลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความยาว คลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความยาว คลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
NAL	445	0.143	430	0.182	420	0.146
NOR	450	0.145	440	0.176	475	0.131
FLU	460	0.152	470	0.187	460	0.138



รูปที่ 4.1 กราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนเมื่อเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย

เมื่อนำไปทำการยืนยันผลการทดลองด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นช่วง 200–800 นาโนเมตรแล้ว พบว่าการใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลายจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าการใช้กรดซัลฟิวริกหรือDMF เป็นตัวทำละลาย ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่4.5 และรูปที่ 4.1 ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ได้เมื่อใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลายมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของนาลิดิซิก แอซิด, ฟลูมิควินและนอร์ฟล็อกซาซิน เท่ากับ 430, 440 และ 470 นาโนเมตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.182, 0.176 และ 0.187 ตามลำดับ ดังนั้นจึงทำการเลือกกรดไนตริกเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองการทำปฏิกิริยาคัลเลอริเมตริกต่อไป

4.1.1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสม

จากการทดลองตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 4.1.1.3 พบว่ากรดไนตริกเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม จึงทำการศึกษาต่อไปว่าระดับความเข้มข้นของกรดไนตริกระดับใดที่จะเหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาการเกิดสีมากที่สุด ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงสีของควิโนโลน 100 ppm เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลาย

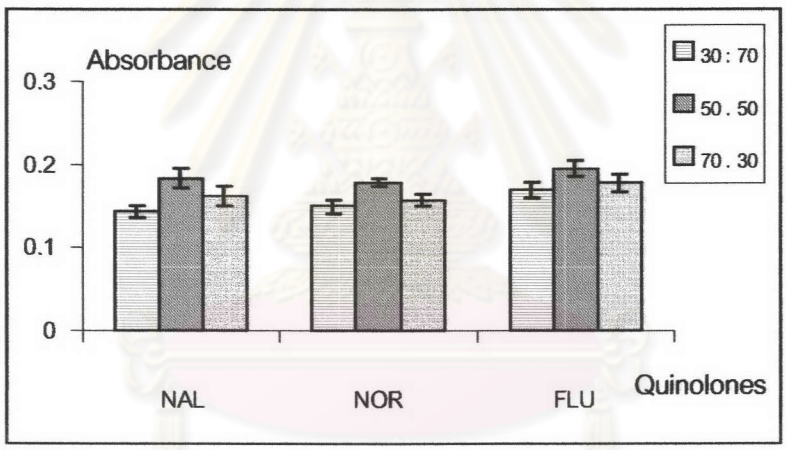
สารละลายมาตรฐาน	อัตราส่วน HNO_3 : น้ำ		
	30 : 70	50 : 50	70 :30
Nalidixic acid			
Norfloxacin			
Flumequine			
Blank			

จากตารางที่ 4.6 พบว่า การใช้อัตราส่วนของกรดไนตริก ต่อ น้ำ เป็น 30 : 70, 50 : 50 และ 70 : 30 เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะให้สีที่ไม่แตกต่างกัน เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองจึงต้องทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer เพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดต่อไป ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดและค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลาย

สารละลายมาตรฐาน	30 : 70 (HNO_3: น้ำ)		50 : 50 (HNO_3: น้ำ)		70 : 30 (HNO_3: น้ำ)	
	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
NAL	430	0.143	430	0.183	428	0.162
NOR	442	0.149	440	0.178	446	0.156
FLU	464	0.168	470	0.195	457	0.177



รูปที่ 4.2 กราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลาย

จากการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.2 พบว่าที่อัตราส่วนกรดไนตริก ต่อ น้ำ เท่ากับ 50 : 50 (1 : 1) จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าการทดสอบที่อัตราส่วน 30 : 70 และ 70 : 30 จึงทำการเลือกอัตราส่วนนี้เพื่อทำการทดลองต่อไป

4.1.2 ผลการศึกษา Complexing agent ที่เหมาะสม

4.1.2.1 ผลศึกษาการเกิดสีโดยใช้ตัวทำละลายที่ได้จากข้อ 4.1.1.4 ร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่างๆ

จากผลการทดสอบ Complexing agent ชนิดต่างๆที่ได้จากข้อ 4.1.1.2 เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบอีกครั้งจึงทำการศึกษาการเกิดสีของสารกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกันร่วมกับการใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ ผลการทดลองที่ได้ของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควินแสดงในตารางที่ 4.8, 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 แสดงสีที่เกิดขึ้นของนาลิดิซิก แอซิด

ปริมาณ NAL	การเปลี่ยนแปลง					
	$\%Fe(NO_3)_3$ ในน้ำกลั่น	$1\%Fe(NO_3)_3$ ใน HCl	$1\%Fe(NO_3)_3$ ใน HNO_3	1% $FeCl_3$ ในน้ำกลั่น	1% $FeCl_3$ ใน HCl	1% $FeCl_3$ ใน HNO_3
500 µg						
100 µg						
10 µg						
1 µg						
Blank						

จากตารางที่ 4.8 พบว่าเมื่อใช้กรดไนตริก (HNO_3: น้ำ อัตราส่วน 1 : 1) เป็นตัวทำละลายร่วมกับ 1% Iron(III) chloride ในกรดไฮโดรคลอริก, 1% Iron(III) chloride ในกรดไนตริก และ1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไฮโดรคลอริกเป็น Complexing agent เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะให้สีของนาลิดิซิก แอซิดในระดับต่ำกว่า 100 µg ใกล้เคียงกับสีของแบลงค์ จึงไม่ควรเลือกเป็นcomplexing agent สำหรับการใช้1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริกสามารถอ่านค่าปริมาณของนาลิดิซิก แอซิดด้วยตาเปล่าได้ต่ำที่สุดที่ 10 µg ซึ่งเห็นสีได้ในระดับต่ำกว่าการใช้ 1% Iron(III) nitrate nona hydrate ในน้ำกลั่นและ1% Iron(III) chloride ในน้ำกลั่น โดยสีที่ได้จากการทำปฏิกิริยา คือ สีเหลืองอมส้ม

ตารางที่ 4.9 แสดงสีที่เกิดขึ้นของนอร์ฟล็อกซาซิน

ปริมาณ NOR	การเปลี่ยนแปลง					
	1%$Fe(NO_3)_3$ ในน้ำกลั่น	1% $Fe(NO_3)_3$ ใน HCl	1%$Fe(NO_3)_3$ ใน HNO_3	1% $FeCl_3$ ในน้ำกลั่น	1% $FeCl_3$ ใน HCl	1% $FeCl_3$ ใน HNO_3
500 µg						
100 µg						
10 µg						
1 µg						
Blank						

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.9 เมื่อทำการทดสอบนอร์ฟล็อกซาซินด้วยการใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลาย ร่วมกับ 1% Iron(III) chloride ในน้ำกลั่น , 1% Iron(III) chloride ในกรดไนตริก , 1% Iron(III) chloride ในกรดไฮโดรคลอริก และ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไฮโดรคลอริก เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะให้สีของนอร์ฟล็อกซาซินใกล้เคียงกับสีของแบลงค์ ส่วนการใช้ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริก สามารถเห็นสีที่เกิดขึ้นของนอร์ฟล็อกซาซินได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 10 µg ซึ่งเป็นระดับต่ำกว่าการใช้ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในน้ำกลั่น โดยสีที่ได้จากการทำปฏิกิริยา คือ สีเหลืองอมส้ม

สำหรับผลการทดลองของฟลูมิควินจะแสดงในตารางที่ 4.10 เมื่อทำการทดสอบฟลูมิควินโดยการใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลาย ร่วมกับ 1% Iron(III) chloride ในน้ำกลั่น, 1% Iron(III) chloride ในกรดไฮโดรคลอริก , 1% Iron(III) chloride ในกรดไนตริก และ 1% Iron(III) nitrate nona – hydrate ในกรดไฮโดรคลอริก เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะให้สีของฟลูมิควินใกล้เคียงกันกับสีของแบลงค์ ส่วนการใช้ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริก สามารถอ่านค่าปริมาณของฟลูมิควินด้วยตาเปล่าได้ต่ำที่สุดที่ระดับ 10 µg ซึ่งเห็นสีได้ในระดับต่ำกว่าการใช้ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในน้ำกลั่น โดยสีที่ได้จากการทำปฏิกิริยา คือ สีส้ม

ตารางที่ 4.10 แสดงสีที่เกิดขึ้นของฟลูมิควิน

ปริมาณ FLU	การเปลี่ยนแปลง					
	1% $Fe(NO_3)_3$ ในน้ำกลั่น	1% $Fe(NO_3)_3$ ใน HCl	1%$Fe(NO_3)_3$ ใน HNO_3	1% $FeCl_3$ ในน้ำกลั่น	1% $FeCl_3$ ใน HCl	1% $FeCl_3$ ใน HNO_3
500 µg						
100 µg						
10 µg						
1 µg						
Blank						

จากผลการทดลองที่ผ่านมาในตารางที่ 4.8 ถึง 4.10 จึงทำการเลือก 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริกเพื่อเป็น Complexing agent ในการทำการทดลองต่อไป เนื่องจากเป็น Complexing agent ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสารในกลุ่มควิโนโลนและแบลงค์ได้ชัดเจนกว่าอีก 4 ชนิด คือ 1% Iron(III) chloride ในกรดไนตริก, 1% Iron(III) chloride ในกรดไฮโดรคลอริก, 1% Iron(III) chloride ในน้ำกลั่นและ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไฮโดรคลอริก และสามารถเห็นสีได้ในระดับต่ำกว่าการใช้ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในน้ำกลั่น นั่นคือ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริกจะเห็นได้ต่ำสุดที่ 10 ไมโครกรัม

4.1.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ Complexing agent ที่เหมาะสม

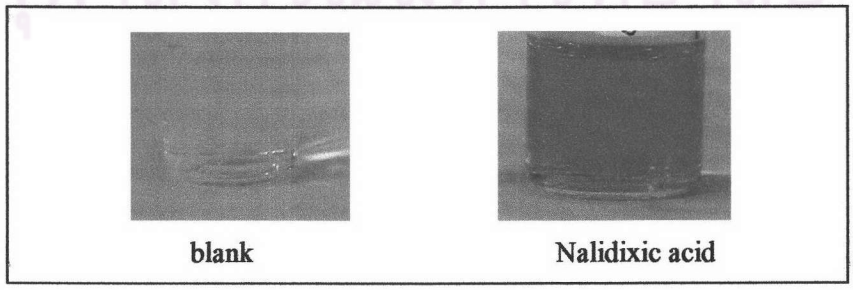
เมื่อทำการเลือก 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริกเป็น Complexing agent ที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นน้ำยาทดสอบ จึงต้องทำการทดลองต่อไปว่าที่ความเข้มข้นระดับใดจะให้ผลการเปลี่ยนแปลงสีที่เหมาะสมที่สุด โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15 และ 20% แล้วทำการยืนยันความถูกต้องด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น200-800 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.11 แสดงการเกิดสีของควิโนโลน 100 ppm ด้วย Complexing agent ความเข้มข้นระดับต่างๆ

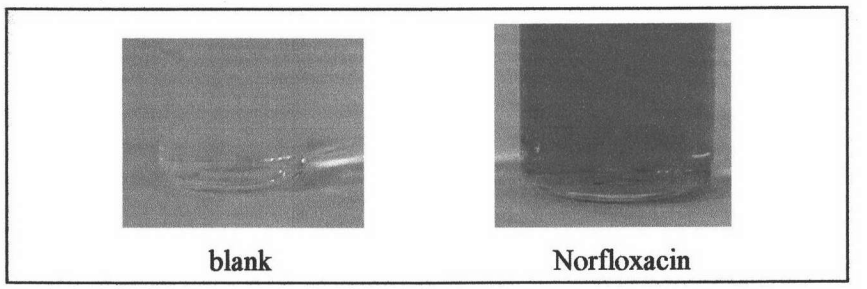
สารละลายมาตรฐาน	การเปลี่ยนแปลงหลังเติม $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$				
	1 %	5 %	10 %	15 %	20 %
NAL					
NOR					
FLU					
Blank					

จากตารางที่ 4.11 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ Complexing agent เป็น 20% ผลการทดลองที่ได้ คือ สีของนาลิดิซิก แอซิด และนอร์ฟล็อกซาซินไม่แตกต่างกับแบลงค์ จึงไม่เลือกใช้เป็น Complexing agent ต่อไป ส่วนที่ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 15% เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะไม่มีผลต่อการเกิดสี ทุกความเข้มข้นจะให้สีที่ใกล้เคียงกัน นั่นคือ เมื่อทำการหยด Complexing agent สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีต่างๆตามที่แสดงไว้ดังตาราง เพราะฉะนั้นจึงต้องมีการยืนยันผลด้วยค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งจำเป็นต้องใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ในการอ่านค่าความแตกต่าง

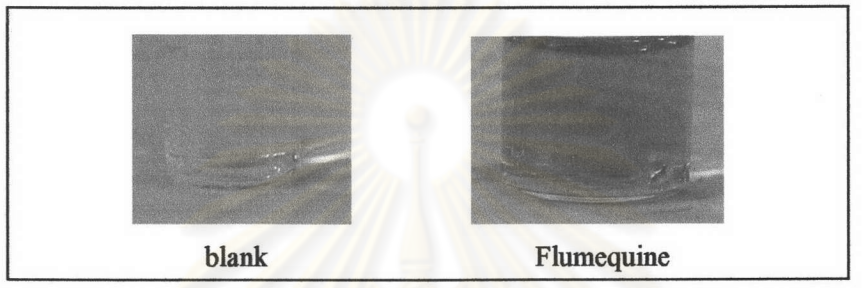
สำหรับตัวอย่างของสีที่ได้หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินที่ความเข้มข้น 100 ppm กับ complexing agent ได้แสดงไว้ในรูป 4.3 ถึง 4.5 ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 แสดงสีที่เกิดขึ้นของนาลิดิซิก แอซิดหลังหยดน้ำยาทดสอบ



รูปที่ 4.4 แสดงสีที่เกิดขึ้นของนอร์ฟล็อกซาซินหลังหยดน้ำยาทดสอบ



รูปที่ 4.5 แสดงสีที่เกิดขึ้นของฟลูมิควินหลังหยดน้ำยาทดสอบ

สำหรับค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer แสดงผลไว้ในตารางที่ 4.12 พบว่าเมื่อเติม 10 % Iron(III) nitrate nonahydrateในกรดไนตริกลงในสารละลายมาตรฐานควิโนโลนที่ความเข้มข้น 100 ppm จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด จึงทำการเลือกใช้ 10% Iron (III) nitrate nonahydrateในกรดไนตริกเป็น Complexing agent ที่เหมาะสมที่สุด เพื่อที่จะนำไปใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำชุดทดสอบต่อไป

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนความเข้มข้น 100 ppm เมื่อใช้ Complexing agent ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

สารละลายมาตรฐาน	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสงหลังการเติม $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$			
		1 %	5 %	10 %	15 %
NAL	430	0.182	0.213	0.279	0.234
NOR	440	0.176	0.184	0.204	0.190
FLU	470	0.187	0.207	0.257	0.210

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ผ่านมาทั้งการหาตัวทำละลาย และ Complexing agent ที่เหมาะสมไปแล้วนั้น จึงได้ทำการเลือกกรดไนตริก (HNO_3 : น้ำ อัตราส่วน 1 : 1) เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้ 10% Iron(III) nitrate nonahydrateในกรดไนตริกเป็น Complexing agent การทดลองในขั้นตอนต่อไปจึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้ชุดทดสอบที่จะให้ผลที่ดีที่สุด

4.1.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวทำละลายและ Complexing agent

การทดลองในส่วนนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาปริมาณกรดไนตริก ต่อ 10% $Fe(NO_3)_3 \times 9H_2O$ในกรดไนตริกที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้อัตราส่วนเป็น 1:1, 2:1, 4:1, 10:1, 20:1 และ 40:1 สีของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดจะต้องมีความเข้มสีสูงสุด โดยทำการยืนยันผลความถูกต้องด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของนาลิดิซิกแอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควินที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.13, 4.14 และ 4.15 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิด 100 ppm โดยใช้อัตราส่วนของกรดไนตริก : 10% $Fe(NO_3)_3$ ที่แตกต่างกัน

No.	(A) สารละลายมาตรฐาน NAL	(B)10%$Fe(NO_3)_3$ ใน 1% HNO_3	อัตราส่วน A : B	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2 ml	2 ml	1:1	453.0	0.248
2	2 ml	1 ml	2:1	446.0	0.247
3	2 ml	500 µl	4:1	441.0	0.250
4	2 ml	200 µl	10:1	430.0	0.279
5	2 ml	100 µl	20:1	434.0	0.193
6	2 ml	50 µl	40:1	432.0	0.150

ผลของนาลิดิซิก แอซิด แสดงในตารางที่ 4.13 พบว่าอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด คือ 10 : 1 โดยมีค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ 430 นาโนเมตร เท่ากับ 0.279 ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ในอัตราส่วนอื่นๆ เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบสารละลายมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิด

ตารางที่ 4.14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซิน 100 ppm โดยใช้อัตราส่วนของกรดไนตริก : 10% $Fe(NO_3)_3$ ที่แตกต่างกัน

No.	(A) สารละลายมาตรฐาน NOR	(B)10%$Fe(NO_3)_3$ ใน 1% HNO_3	อัตราส่วน A : B	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2 ml	2 ml	1:1	463.0	0.187
2	2 ml	1 ml	2:1	458.0	0.187
3	2 ml	500 µl	4:1	455.0	0.192
4	2 ml	200 µl	10:1	440.0	0.204
5	2 ml	100 µl	20:1	443.0	0.170
6	2 ml	50 µl	40:1	436.0	0.168

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูมิควิน 100 ppm โดยใช้อัตราส่วนของกรดไนตริก : 10% $Fe(NO_3)_3$ ที่แตกต่างกัน

No.	(A) สารละลายมาตรฐาน FLU	(B)10%$Fe(NO_3)_3$ ใน 1% HNO_3	อัตราส่วน A : B	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2 ml	2 ml	1:1	475.0	0.213
2	2 ml	1 ml	2:1	482.0	0.208
3	2 ml	500 µl	4:1	476.0	0.221
4	2 ml	200 µl	10:1	470.0	0.257
5	2 ml	100 µl	20:1	473.0	0.208
6	2 ml	50 µl	40:1	460.0	0.196

จากตารางที่ 4.14 และ 4.15 จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด คือ 10 : 1 โดยมีค่าความยาวคลื่นสูงสูงสุด เท่ากับ 440 และ 470 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.204 และ 0.257 สำหรับนอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน ตามลำดับ เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมกับสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน

จากตารางที่ 4.13 ถึง 4.15 สามารถสรุปได้ว่า อัตราส่วนระหว่างกรดไนตริก ต่อ 10% Iron(III) nitrate nonahydrateในกรดไนตริกที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดมีค่าสูงที่สุด คือ 10:1 จึงทำการเลือกใช้อัตราส่วนนี้ในการศึกษาต่อไป

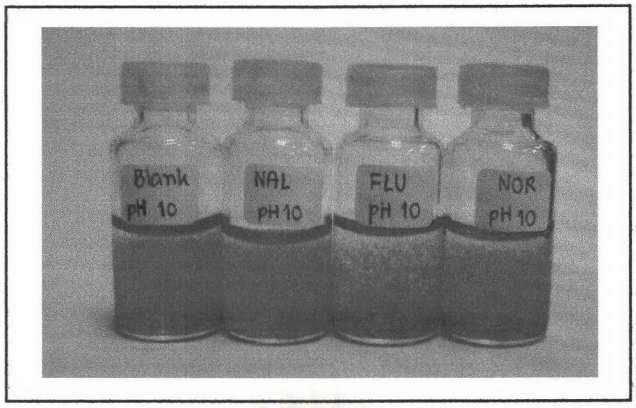
4.1.4 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานควิโนโลน และ complexing agents โดยที่ค่า pH เมื่อทำการละลายด้วยกรดไนตริก(อัตราส่วน 1 : 1) มีค่าเฉลี่ยของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน เท่ากับ 1.64, 1.80 และ 1.66 ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการศึกษาโดยไม่ทำการปรับ pH และทำการปรับค่า pH เป็น 5, 7 และ 10 เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลง ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงการเกิดสีของสารควิโนโลน 100 ppm ทดสอบที่ค่า pH ต่างกัน

สารละลายมาตรฐาน	การเปลี่ยนแปลงเมื่อปรับค่า pH			
	ไม่ปรับ pH	pH 5	pH 7	pH 10
NAL			ตะกอนน้ำตาล	ตะกอนน้ำตาล
NOR			ตะกอนน้ำตาล	ตะกอนน้ำตาล
FLU			ตะกอนน้ำตาล	ตะกอนน้ำตาล
Blank			ตะกอนน้ำตาล	ตะกอนน้ำตาล

จากการทดสอบพบว่าเมื่อไม่ได้ปรับ pH และที่ค่า pH เท่ากับ 5 เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าสีที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน จึงต้องทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer แต่เมื่อทำการปรับค่า pH จนมีค่ามากกว่า 7 ทั้งแบลงค์และควิโนโลนจะเกิดตะกอนสีน้ำตาล ดังรูปที่ 4.6 เนื่องจากการทำปฏิกิริยาของ NaOH และ Complexing agent เพราะฉะนั้นจึงทำการยืนยันผลการทดลองด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer เพียงแค่ที่ไม่ได้ปรับ pH และ pH เท่ากับ 5 เท่านั้น โดยผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.17



รูปที่ 4.6 สารละลายเมื่อปรับค่า pH มีค่ามากกว่า 7

ตารางที่ 4.17 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดและค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 100 ppm เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลาย

สารละลายมาตรฐาน	ไม่ปรับ pH		pH 5	
	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
NAL	430	0.317	434	0.290
NOR	440	0.241	438	0.221
FLU	470	0.203	465	0.197

จากผลการแสดงในตารางที่ 4.17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ค่า pH ต่างกัน พบว่าตัวอย่างที่ไม่มีการปรับค่า pH และเมื่อทำการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5 จะให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน ดังนั้นที่ค่า pH ≤ 5 ค่า pH จะไม่มีผลต่อการใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลาย ร่วมกับการใช้ Iron(III) nitrate nonahydrate เป็น complexing agent แต่ข้อจำกัดเกิดขึ้นเมื่อค่า pH ≥ 7 จะทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์กับ Complexing agent ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินได้ที่ช่วง pH นี้

4.1.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการศึกษาเพื่อหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดหลังการทดสอบด้วย 10% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริก โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิห้อง , 40 ±10, 60 ±10, 80 ±10 และ 100 ±10 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่ได้ของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินแสดงในตารางที่ 4.18, 4.19 และ 4.20 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.18 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของนาลิดิซิก แอซิด 100 ppm ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

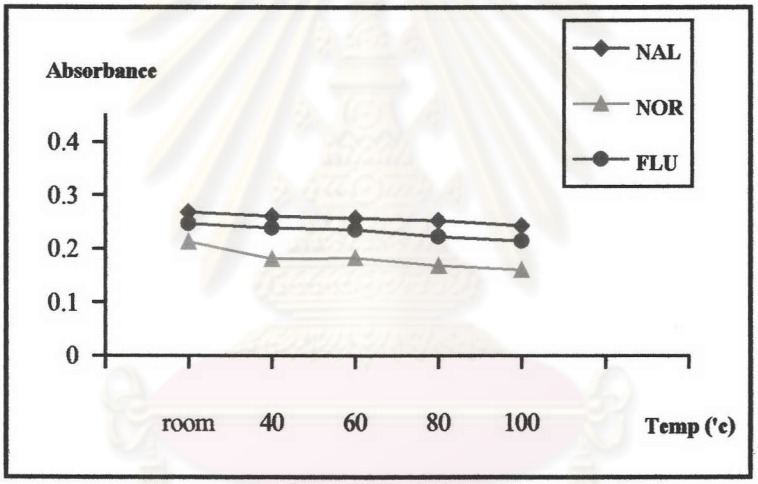
No.	อุณหภูมิ	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	อุณหภูมิห้อง	430.0	0.268
2	40	434.0	0.261
3	60	427.0	0.257
4	80	445.0	0.253
5	100	421.0	0.243

ตารางที่ 4.19 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของนอร์ฟล็อกซาซิน 100 ppm ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

No.	อุณหภูมิ	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	อุณหภูมิห้อง	440.0	0.213
2	40	445.0	0.181
3	60	427.0	0.178
4	80	447.0	0.169
5	100	430.0	0.161

ตารางที่ 4.20 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของฟลูมิควิน 100 ppm ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

No.	อุณหภูมิ	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	อุณหภูมิห้อง	470.0	0.247
2	40	471.0	0.239
3	60	478.0	0.236
4	80	470.0	0.223
5	100	473.0	0.215

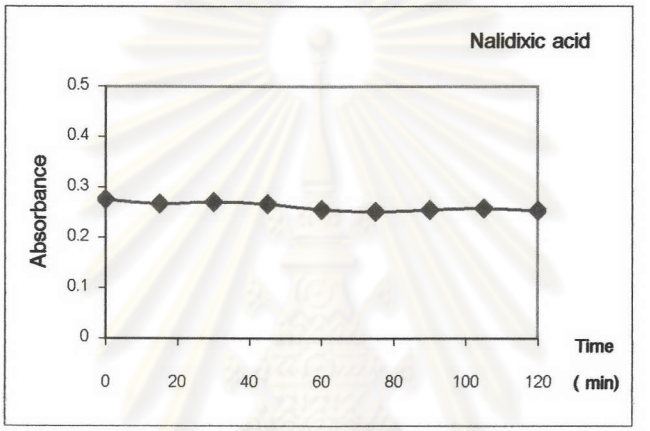


รูปที่ 4.7 กราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

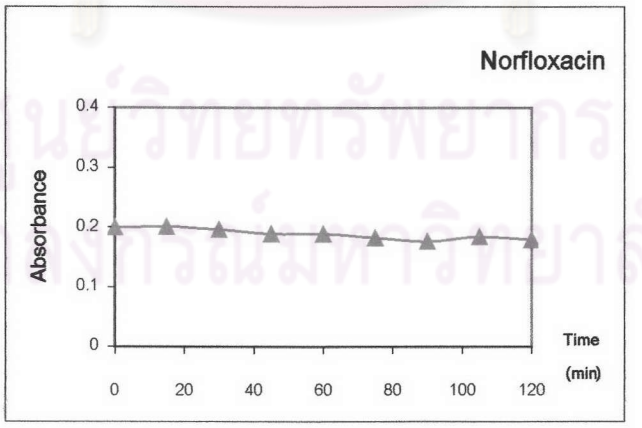
จากผลการทดลองที่แสดงตั้งแต่ตารางที่ 4.18 ถึง 4.20 ประกอบกับกราฟในรูปที่ 4.7 พบว่า นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟลอกซาซิน และฟลูมิควิน เมื่อทำการทดสอบที่ อุณหภูมิระดับต่างๆ พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้น อุณหภูมิจึงไม่มีผลต่อการทดสอบด้วยการใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลาย และ Iron(III) nitrate nonahydrate เป็น complexing agent

4.1.6 ผลการศึกษาความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น

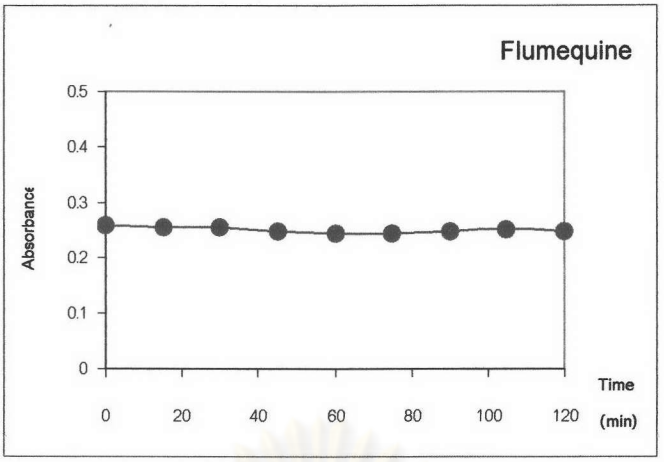
เมื่อทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากการใช้ตัวทำละลาย, complexing agent,ค่า pH และอุณหภูมิ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ให้สีเข้มที่สุดแล้ว จึงทำการศึกษาความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ทุก 15 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง คือ ทำการวัดที่ 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที ผลการทดลองที่ได้ของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินที่ความเข้มข้น 100 ppm แสดงดังรูปที่ 4.8, 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความคงตัวของนาลิดิซิก แอซิดที่ช่วงเวลาต่างๆ



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความคงตัวของนอร์ฟล็อกซาซินที่ช่วงเวลาต่างๆ



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงความคงตัวของฟลูมิควินที่ช่วงเวลาต่างๆ

ตารางที่ 4.21 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด 100 ppm ที่เวลาต่างกัน

เวลา (n = 9)	ค่าการดูดกลืนแสง		
	NAL	NOR	FLU
ค่าเฉลี่ย	0.261	0.188	0.250
SD	0.009	0.009	0.005
RSD	3.29	4.73	2.00

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.8 ถึง 4.10 และตารางที่ 4.21 พบว่าทั้งนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน เมื่อทำการทดสอบด้วยการใช้กรดไนตริกเป็นตัวทำละลาย ร่วมกับ Iron(III) nitrate nonahydrate เป็น complexing agent เมื่อทิ้งไว้ที่ช่วงเวลาต่างๆ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกันมากนัก และจากคุณสมบัติที่สำคัญของปฏิกิริยาการเกิดสี(colorimetry)ข้อ 2 คือ สีที่เกิดขึ้นต้องมีความคงตัวสูงตลอดช่วงที่ทำการวัด จะเห็นได้ว่าการทดสอบนี้มีคุณสมบัติดังที่กล่าวไว้เนื่องจากสีที่เกิดขึ้นมีความคงตัวมากกว่า 2 ชั่วโมง

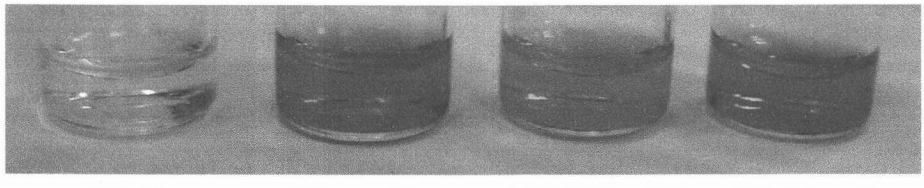
4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดสารกลุ่มควิโนโลน โดยวิธีคัลเลอริเมตริก

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 3 ชนิดที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Visual test) หลังจากการทดสอบด้วยการใช้กรดไนตริก (1 :1) ต่อ 10% Iron(III) nitrate nonahydrate ในอัตราส่วนเท่ากับ 10:1 ว่าจะสามารถมองเห็นได้ต่ำที่สุดที่ระดับความเข้มข้นใด โดยจะทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 10 ppm ถึง 500 ppm แล้วทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นสูงสุดและสีที่เกิดขึ้นแสดงไว้ในตารางที่ 4.22 และรูปที่ 4.11 สำหรับรูปที่ 4.12, 4.13 และ4.14 เป็นตัวอย่างการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.22 แสดงสีที่มองเห็นและความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนที่ 0.2 mg หลังจากใช้น้ำยาทดสอบ

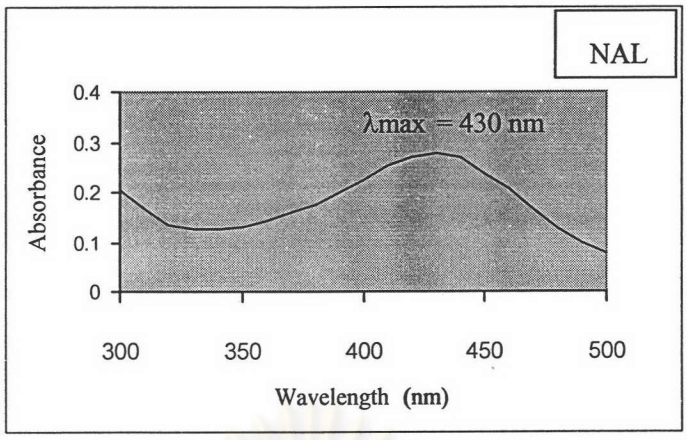
สารควิโนโลน 0.2 mg	ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	สีที่เกิดขึ้น
Nalidixic acid	430	สีเหลืองอมส้ม
Norfloxacin	440	สีเหลืองอมส้ม
Flumequine	470	สีส้ม

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer และ visual test

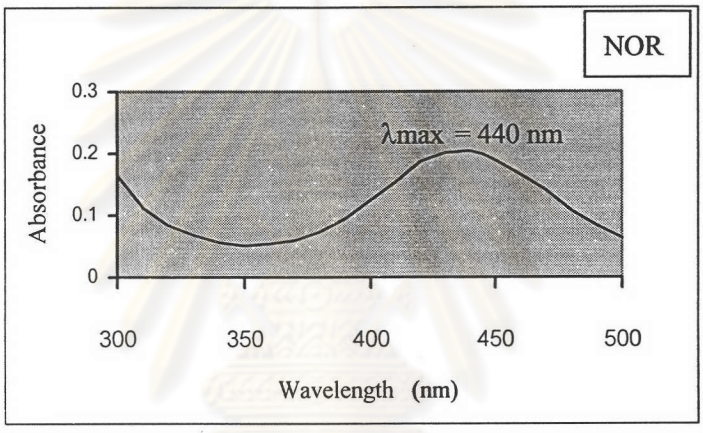


blank Flumequine Nalidixic acid Norfloxacin

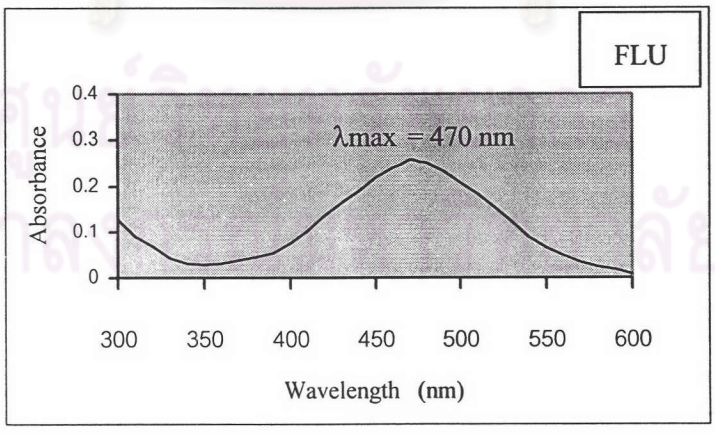
รูปที่ 4.11 แสดงสีที่เกิดขึ้นของสารกลุ่มควิโนโลน 0.2 มิลลิกรัม



รูปที่ 4.12 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของนาลิดิซิก แอซิดความเข้มข้น 100 ppm



รูปที่ 4.13 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของนอร์ฟล็อกซาซินความเข้มข้น 100 ppm



รูปที่ 4.14 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของฟลูมิควินความเข้มข้น 100 ppm

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer

ค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จากการวิเคราะห์และสีที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันความถูกต้อง โดยนำมาเทียบกับข้อมูลในตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น สีที่ถูกดูดกลืน (Color Transmitted) และ สีที่เกิดขึ้นจริง (Complementary Color)

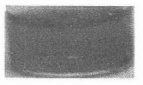
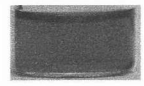
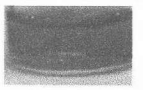
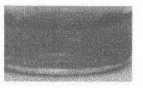
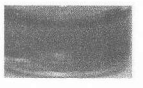
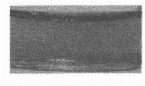
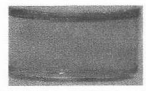
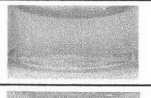
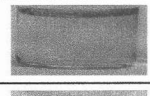
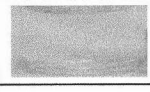
Wave Length (nm)	Color Transmitted	Complementary Color
400 - 435	สีม่วง	สีเขียวอมเหลือง
435 - 480	สีน้ำเงิน	สีเหลือง
480 - 490	สีน้ำเงินอมเขียว	สีส้ม
490 - 500	สีเขียวอมน้ำเงิน	สีแดง
500 - 560	สีเขียว	สีม่วงแดง
560 - 580	สีเขียวอมเหลือง	สีม่วง
580 - 595	สีเหลือง	สีน้ำเงิน
595 - 610	สีส้ม	สีน้ำเงินอมเขียว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

ที่มา : Colorimetric methods of analysis, 1948

จะเห็นได้ว่าผลการทดลองตามตารางที่4.22 มีความสอดคล้องกับข้อมูลในตารางที่4.23 คือ หลังใช้น้ำยาทดสอบนาลิดิซิก แอซิด จะเกิดเป็นสีเหลืองอมส้ม และมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 430 นาโนเมตร, นอร์ฟล็อกซาซิน จะเกิดเป็นสีเหลืองอมส้ม และมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 440 นาโนเมตร และฟลูมิควิน จะเกิดเป็นสีส้ม และมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 470 นาโนเมตร

จากนั้นจึงทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ppm ถึง 500 ppm และสังเกตความเข้มของสีที่เกิดขึ้นหลังการใช้น้ำยาทดสอบและยืนยันผลค่าการดูดกลืน แสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ได้ผลดังตารางที่ 4.24

ตารางที่ 4.24 แสดงผลการตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนที่ความเข้มข้น 10 ppm ถึง 500 ppm และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ หลังใช้น้ำยาทดสอบ

ความเข้มข้น (ppm)	Nalidixic acid		Norfloxacin		Flumequine	
	Visual test	Abs $\lambda = 430$	Visual test	Abs $\lambda = 440$	Visual test	Abs $\lambda = 470$
500		1.150		0.966		1.263
300		0.719		0.605		0.724
100		0.269		0.204		0.257
80		0.215		0.179		0.206
50		0.139		0.095		0.124
20		0.076		0.036		0.039
10		0.044		0.023		0.026
5		ND		ND		ND
Blank						

หมายเหตุ : สีที่เห็นเป็นสีที่ได้จากรูปถ่าย อาจไม่ชัดเจนเหมือนกับสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

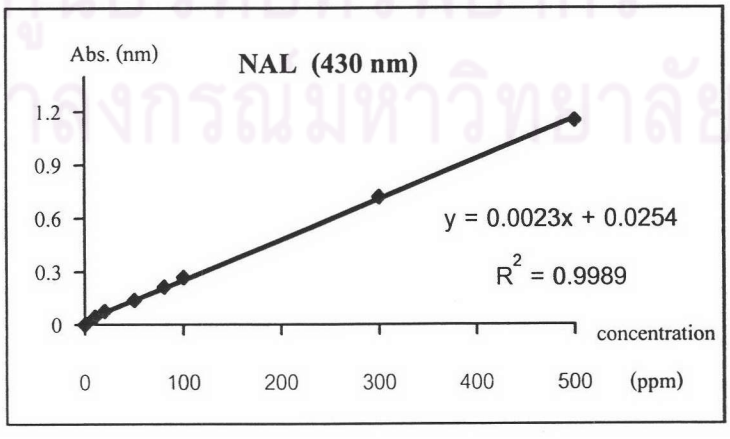
จากตารางที่ 4.24 จะเห็นได้ว่าความเข้มของสีจะลดลงเมื่อลดระดับความเข้มข้นของควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Visual test) คือ 10 ppm เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ppm คือ ที่ความเข้มข้น 5 ppm ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสารละลายกับแบลงค์ได้ ประกอบกับกราฟยูวีสเปกตรัมไม่ได้ให้ความยาวคลื่นในช่วง 430 นาโนเมตร (นาลิดิซิกแอซิด) , 440 นาโนเมตร (นอร์ฟล็อกซาซิน) และ 470 นาโนเมตร (ฟลูมิควิน) จึงสรุปได้ว่าช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ 10 ถึง 500 ppm

จากนั้นจึงเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เพื่อทำการคำนวณหาค่า Linear regression จาก Calibration curve โดยทำการวัดทั้งหมดชนิดละ 5 ซ้ำ

ตารางที่ 4.25 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิดที่ 430 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Nalidixic acid (n=5)	SD	RSD
10	0.044	± 0.006	13.64
20	0.076	± 0.004	5.67
50	0.139	± 0.005	3.81
80	0.215	± 0.011	5.12
100	0.269	± 0.008	3.02
300	0.719	± 0.013	1.85
500	1.150	± 0.028	2.46
$y = ax + b$	$y = 0.0023 x + 0.0254$		
R^2	0.9989		

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

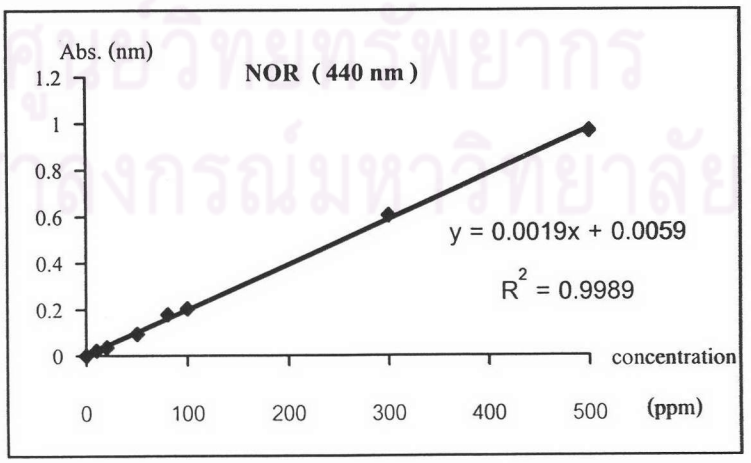


รูปที่ 4.15 Calibration range ของนาลิดิซิก แอซิดที่ความเข้มข้น 10 ถึง 500 ppm

ตารางที่ 4.26 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ 440 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin (n=5)	SD	RSD
10	0.023	± 0.004	17.39
20	0.036	± 0.005	13.89
50	0.095	± 0.006	6.32
80	0.179	± 0.007	3.91
100	0.204	± 0.003	1.47
300	0.605	± 0.006	0.99
500	0.966	± 0.014	1.45
y = ax + b	y = 0.0019 x + 0.0059		
R^2	0.9989		

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

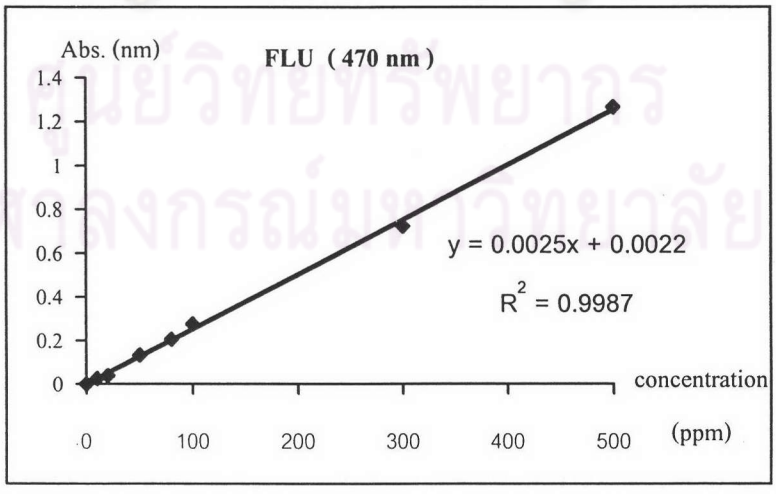


รูปที่ 4.16 Calibration range ของนอร์ฟล็อกซาซินที่ความเข้มข้น 10 ถึง 500 ppm

ตารางที่ 4.27 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูมิควินที่ 470 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Flumequine (n=5)	SD	RSD
10	0.026	± 0.003	11.54
20	0.039	± 0.004	10.26
50	0.124	± 0.003	2.42
80	0.206	± 0.006	2.91
100	0.257	± 0.006	2.34
300	0.724	± 0.006	0.83
500	1.263	± 0.011	0.86
y = ax + b	y = 0.0025x + 0.0022		
R^2	0.9987		

ที่มา : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer



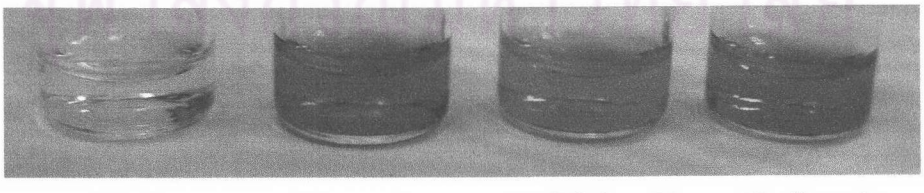
รูปที่ 4.17 Calibration range ของฟลูมิควินที่ความเข้มข้น 10 ถึง 500 ppm

ผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ของสารมาตรฐานควิโนโลนช่วงความเข้มข้น 10 ถึง 500 ppm ที่ความยาวคลื่น 430, 440 และ 470 นาโนเมตร สำหรับนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน ที่แสดงไว้ดังตารางที่ 4.25 ถึง 4.27 และรูปที่ 4.15 ถึง 4.17 จะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และ ฟลูมิควิน หลังหยดน้ำยาทดสอบที่ความเข้มข้น 10 ppm ถึง 500 ppm พบว่า มีค่าสมการเชิงเส้นถดถอยเฉลี่ย (Linear regression) คือ $y = 0.0023x + 0.0254$, $y = 0.0019x + 0.0059$ และ $y = 0.0025x + 0.0022$ ตามลำดับ และมีค่า $R^2 = 0.9989, 0.9989, 0.9987$ ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นไปตาม Beer's Law นั่นคือ ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร เนื่องจากเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด จะทำให้สีที่เกิดชัดเจนขึ้น ทั้งจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer

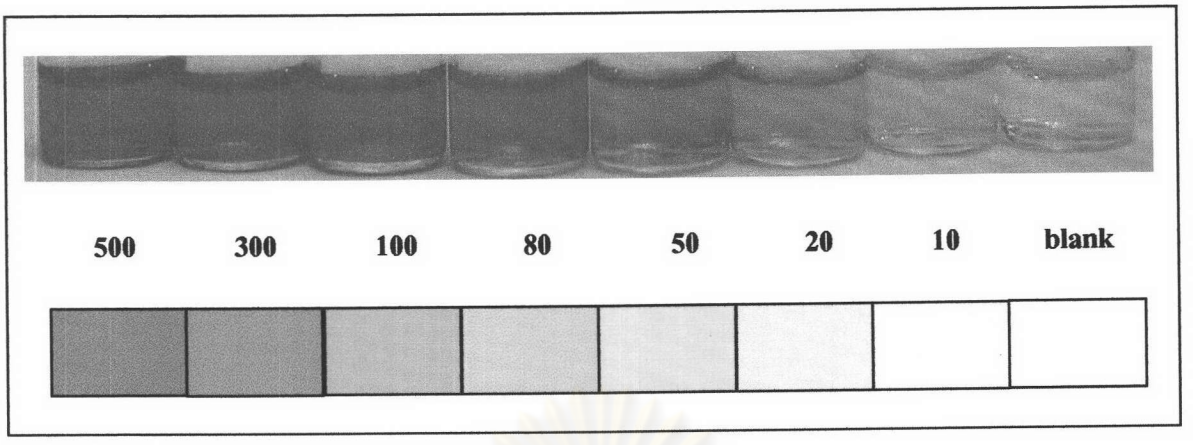
4.3 การสร้างแถบสีมาตรฐาน

รูปที่ 4.19 ถึง 4.21 เป็นการเปรียบเทียบรูปที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารมาตรฐานควิโนโลนกับ Complexing agent ที่ความเข้มข้น 10 ถึง 500 ppm เทียบกับแถบสีมาตรฐาน โดยภาพที่เห็นเป็นภาพจากรูปจริงที่เกิดขึ้นด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล และ แถบสีมาตรฐานที่ได้จากการสร้างในโปรแกรม Microsoft Word เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความเข้มข้นของควิโนโลนในภาคสนามที่ต้องการทราบความเข้มข้นของควิโนโลนที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างชนิดต่างๆ

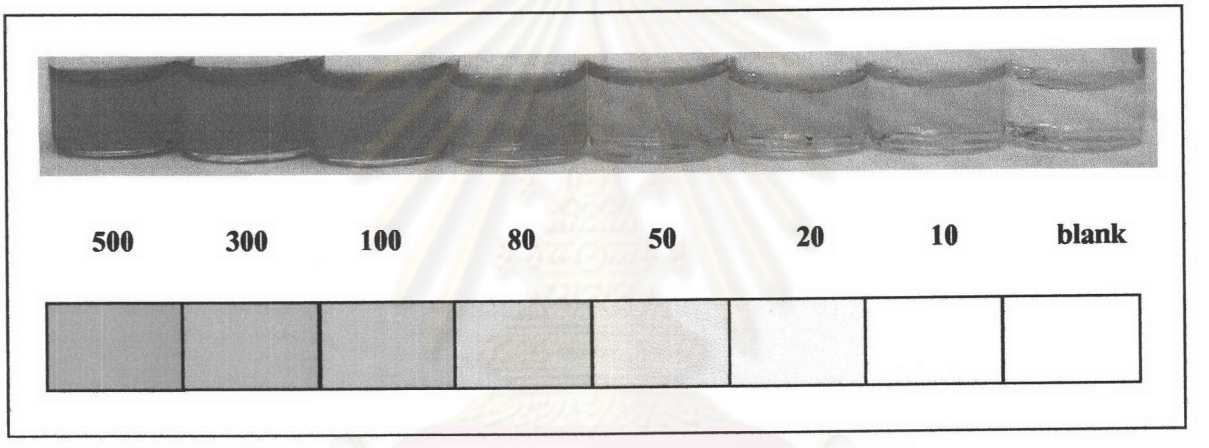


blank Flumequine Nalidixic acid Norfloxacin

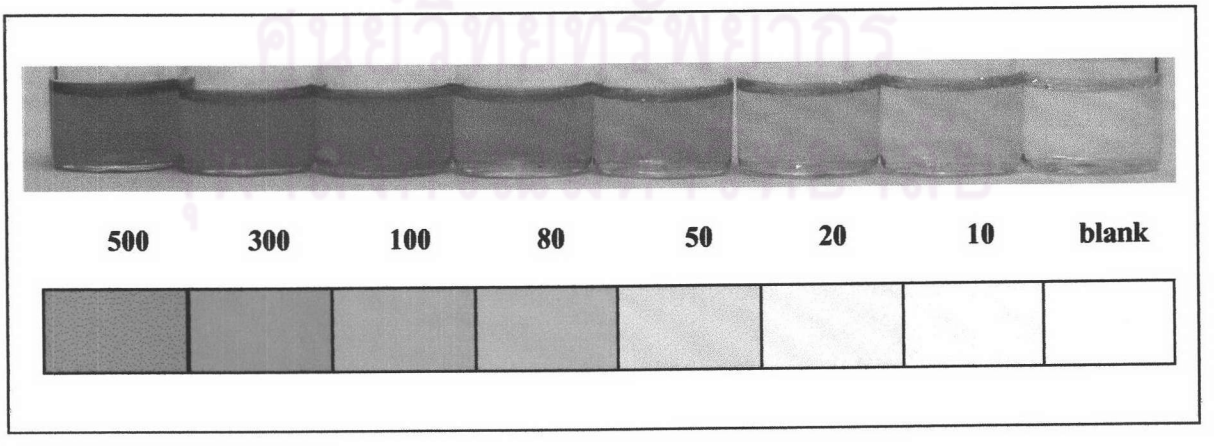
รูปที่ 4.18 สีที่เกิดขึ้นของสารกลุ่มควิโนโลนหลังหยดน้ำยาทดสอบ



รูปที่4.19 แถบสีมาตรฐานของนาลิดิซิก แอซิด 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm



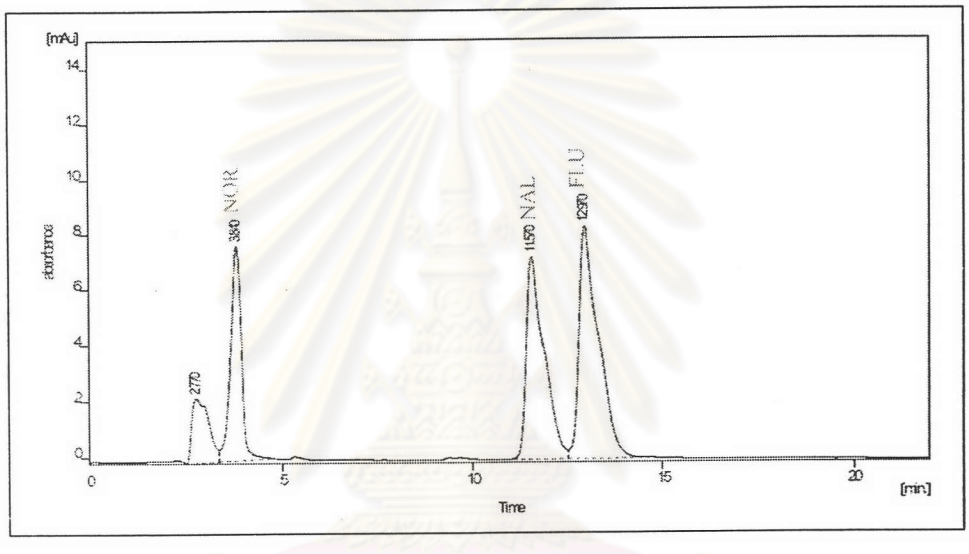
รูปที่4.20 แถบสีมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm



รูปที่4.21 แถบสีมาตรฐานของฟลูมิควิน 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm

4.4. ผลการศึกษาการตรวจวัดควิโนโลนด้วยเทคนิค HPLC

การศึกษานี้เป็นการสร้างกราฟมาตรฐานของควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความเข้มข้นจาก 0.1 ถึง 10 ppm เพื่อใช้ในการยืนยันผลการทดลองสำหรับการสกัดอาหารสัตว์และการทดสอบในยาสัตว์ในหัวข้อที่จะศึกษาต่อไป โดยมีตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม (นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน) ดังรูปที่ 4.22 และมีค่า Retention time เฉลี่ยของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ดังตารางที่ 4.28

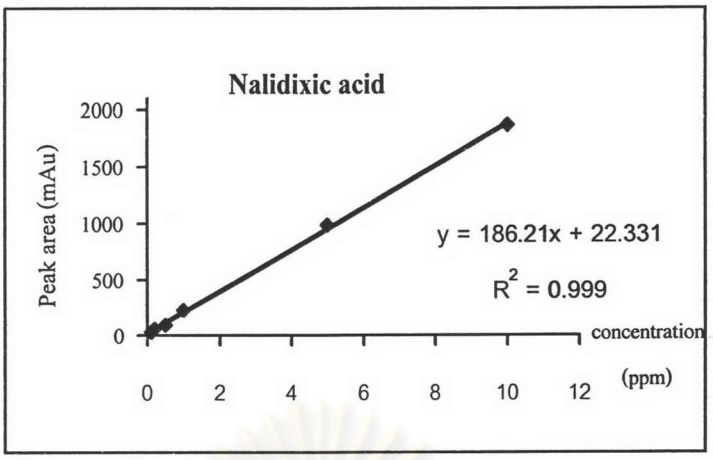


รูปที่ 4.22 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายผสม 1 ppm

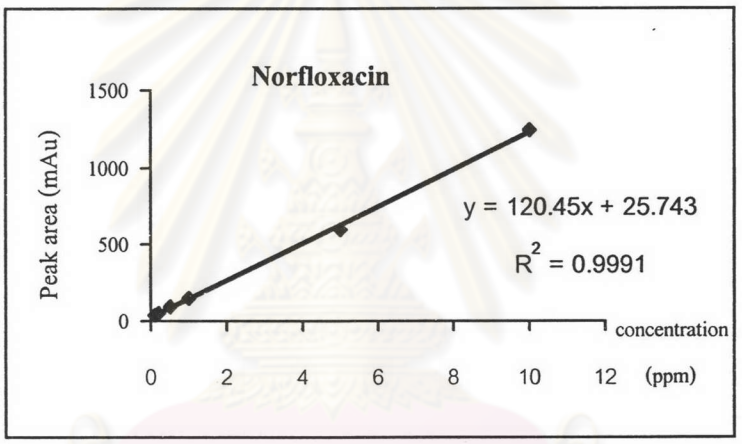
ตารางที่ 4.28 ค่า Retention timeเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดของเทคนิค HPLC

(n = 6)	Retention time (นาที)		
	NAL	NOR	FLU
ค่าเฉลี่ย	11.47	3.82	12.82
SD	0.179	0.122	0.219
RSD	1.56	3.13	1.71

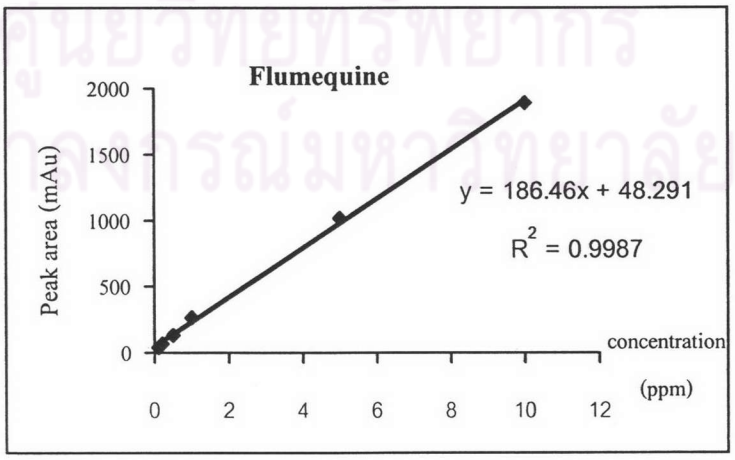
จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC จึงนำค่า Peak area ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ แสดงดังรูปที่ 4.23 ถึง 4.25 โดยมีค่า Linear of regression และค่า R^2 ดังตารางที่ 4.29



รูปที่ 4.23 Calibration rangeของนาลิดิซิก แอซิดที่ความเข้มข้น 0.1–10 ppm



รูปที่ 4.24 Calibration rangeของนอร์ฟล็อกซาซินที่ความเข้มข้น 0.1–10 ppm



รูปที่ 4.25 Calibration rangeของฟลูมิควินที่ความเข้มข้น 0.1–10 ppm

ตารางที่ 4.29 ค่า Retention timeเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดของเทคนิค HPLC

ควิโนโลน	Linear of regression	R^2
นาลิดิซิก แอซิด	y = 186.21 x + 22.331	0.9990
นอร์ฟล็อกซาซิน	y = 120.45 x + 25.743	0.9991
ฟลูมิควิน	y = 186.46 x + 48.291	0.9987

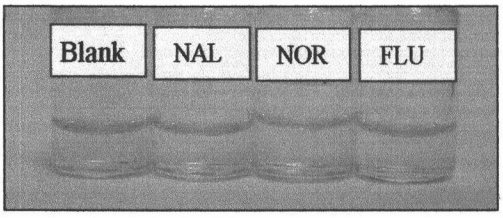
จากกราฟรูปที่ 4.23 ถึง 4.25 พบว่า การวิเคราะห์สารมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด,นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน เมื่อใช้คอลัมน์ Mightysil RP-18 (150x4.5 mm,5 μm) ที่อัตราการไหล 0.6 ml/min สามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่ 0.1 ถึง 10 ppm (0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 และ 10 ppm) กราฟที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรง มีค่า Linear of regression และ R^2 ของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินดังตารางที่ 4.29 โดยที่นาลิดิซิก แอซิดและฟลูมิควินให้ความว่องไวในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ใกล้เคียงกันเมื่อพิจารณาจากค่าความชันของกราฟ

4.5 ผลตรวจสอบความใช้ได้ (Validate) กับตัวอย่างชนิดต่างๆ

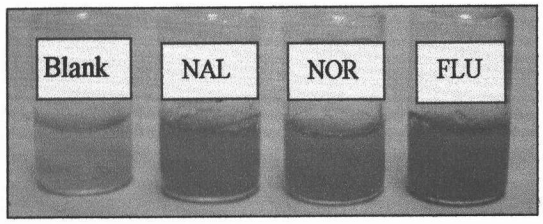
4.5.1 ผลการศึกษาในอาหารสัตว์

4.5.1.1 ผลการศึกษาการกลับคืน(%Recovery)ของควิโนโลนที่ผสมในอาหารสัตว์

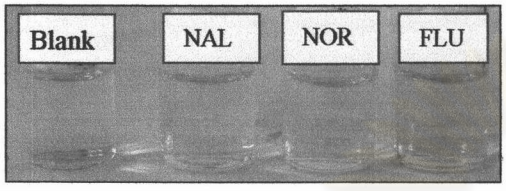
การศึกษานี้เป็นการนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมาใช้กับตัวอย่างชนิดต่างๆที่ได้ทำการ Spike สารควิโนโลนลงไป 1 มิลลิกรัม ในอาหารสัตว์ชนิดละ 2 กรัม และทำการสกัดด้วย Hexane เพื่อกำจัดไขมันที่มีอยู่ในตัวอย่างชนิดต่างๆ จากนั้นทำการทดสอบโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม (กรดไนตริก ต่อ น้ำ เท่ากับ 50 : 50) 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของควิโนโลนในตัวอย่างคิดเป็น 100 ppm) ทำการกรอง นำสารละลายส่วนที่กรองได้ 1 มิลลิลิตร เติม Complexing agent ในอัตราส่วน 10 : 1 ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.26 ถึง 4.33



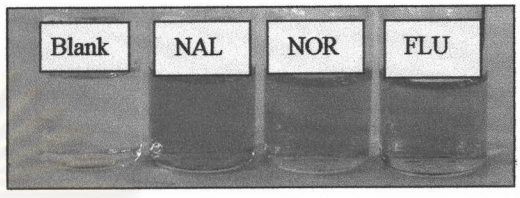
รูปที่4.26 อาหารไก่ (ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)



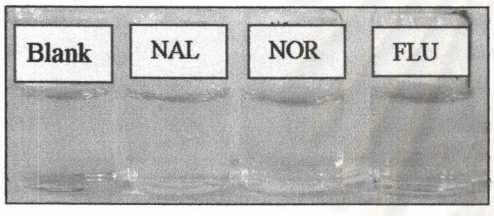
รูปที่4.27 อาหารไก่ (หลังหยดน้ำยาทดสอบ)



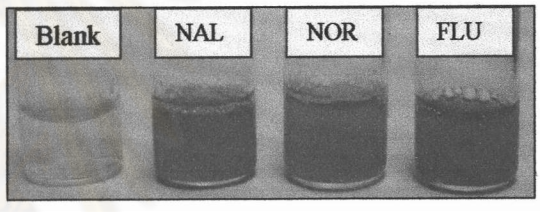
รูปที่4.28 อาหารกุ้ง (ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)



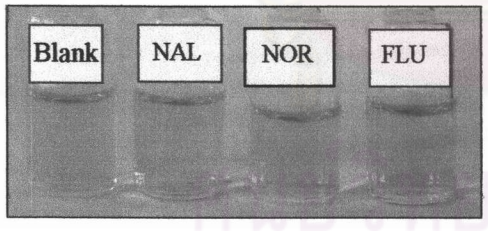
รูปที่4.29 อาหารกุ้ง (หลังหยดน้ำยาทดสอบ)



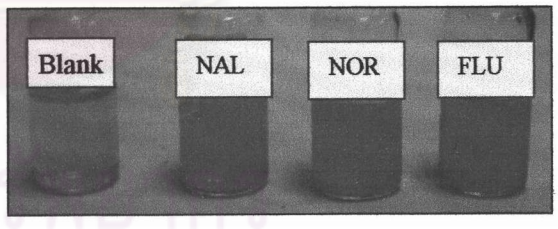
รูปที่4.30 อาหารสุกร(ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)



รูปที่4.31 อาหารสุกร(หลังหยดน้ำยาทดสอบ)



รูปที่ 4.32 อาหารปลา (ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ)



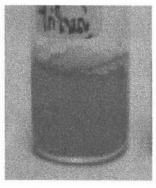
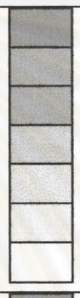
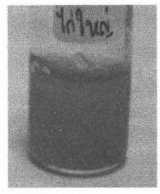
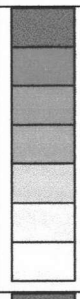
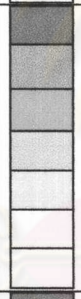
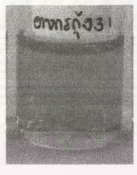
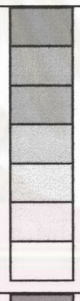
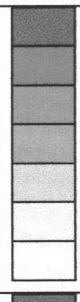
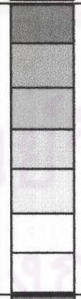
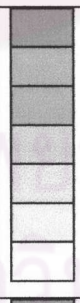
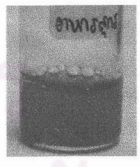
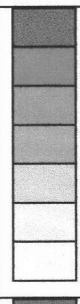
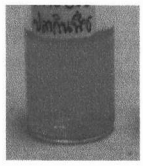
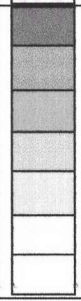
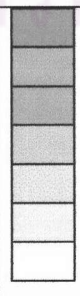
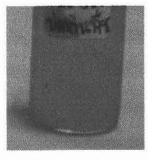
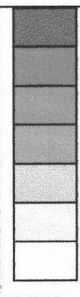
รูปที่ 4.33 อาหารปลา (หลังหยดน้ำยาทดสอบ)

จากรูปที่ 4.26 ถึง 4.33 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้น้ำยาทดสอบกับตัวอย่างชนิดต่างๆจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี โดยสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสีเดียวกับสีของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนที่ได้ทำการศึกษามาแล้วข้างต้น ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำไปใช้กับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของสารกลุ่มควิโนโลนได้ แต่มีข้อจำกัด คือ เมื่อทำทดสอบกับนาลิดิซิก แอซิด และนอร์ฟล็อกซาซินเกิดเป็นสีเหลืองและสีเหลืองอมส้ม ซึ่งสีที่เกิดขึ้นมีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้น การที่จะระบุว่าอาหารสัตว์นั้นมีนาลิดิซิก แอซิด หรือนอร์ฟล็อกซาซินอยู่ อาจจะต้องใช้เทคนิค HPLC ในการยืนยันต่อไป

4.5.1.2 ผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วยตาเปล่าเทียบกับแถบสีมาตรฐาน

เมื่อทำการวิเคราะห์อาหารสัตว์ทั้ง 4 ชนิดแล้วนำมาเปรียบเทียบกับแถบสีมาตรฐานของสารมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิด,นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน ได้ผลดังตารางที่ 4.30

ตารางที่ 4.30 การวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วยตาเปล่าเทียบกับแถบสีมาตรฐาน

อาหารสัตว์	NAL	แถบสีมาตรฐาน	NOR	แถบสีมาตรฐาน	FLU	แถบสีมาตรฐาน
อาหารไก่						
อาหารกุ้ง						
อาหารสุกร						
อาหารปลา						

4.5.1.3 ผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วยวิธี UV-Visible Spectroscopy

การศึกษานี้เพื่อหาค่าความแม่นยำ(RSD) และค่าการกลับคืน(% Recovery) ของการสกัดนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินในอาหารสัตว์ 4 ชนิด ได้แก่ อาหารไก่, อาหารกุ้ง,อาหารสุกรและอาหารปลา เพื่อเป็นการยืนยันผลวิธีการสกัดจากข้อ 4.5.1.1 โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดที่วัดได้ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer หลังจากการสกัดเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากในข้อ 4.2 เพื่อคำนวณหาปริมาณควิโนโลนจากสมการ Linear of regression ของควิโนโลนแต่ละชนิดจะได้ค่าความแม่นยำในรูปของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) และค่าการกลับคืน (% Recovery) ผลจากการวิเคราะห์ของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินแสดงไว้ในตารางที่ 4.31, 4.32 และ 4.33 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.31 ค่าความแม่นยำและค่าความถูกต้องของนาลิดิซิก แอซิดด้วยชุดตรวจสอบ

No.	ตัวอย่าง (n = 5)	ปริมาณ NAL ที่ spike (µg/ml)	ปริมาณ NAL ที่วัดได้ (µg/ml)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	100	83.21 ± 1.22	1.47	83.21
2	อาหารกุ้ง	100	92.17 ± 3.65	3.96	92.17
3	อาหารสุกร	100	86.90 ± 3.97	4.56	86.90
4	อาหารปลา	100	82.04 ± 2.45	2.99	82.04

หมายเหตุ : ตัวอย่างก่อนการspikeตรวจไม่พบสารกลุ่มควิโนโลนปนเปื้อนอยู่เพราะฉะนั้นจึงกำหนดให้ปริมาณของสารกลุ่มควิโนโลนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ spike สารมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0

ตารางที่ 4.32 ค่าความแม่นยำและค่าความถูกต้องของนอร์ฟล็อกซาซินด้วยชุดตรวจสอบ

No.	ตัวอย่าง (n = 5)	ปริมาณ NOR ที่ spike (µg/ml)	ปริมาณ NOR ที่วัดได้ (µg/ml)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	100	83.09 ± 1.11	1.34	83.09
2	อาหารกุ้ง	100	89.99 ± 0.81	0.90	89.99
3	อาหารสุกร	100	87.77 ± 1.69	1.94	87.77
4	อาหารปลา	100	80.25 ± 2.05	2.56	80.25

ตารางที่ 4.33 ค่าความแม่นยำและค่าความถูกต้องของฟลูมิควินด้วยชุดตรวจสอบ

No.	ตัวอย่าง (n = 5)	ปริมาณ FLU ที่ spike (µg/ml)	ปริมาณ FLU ที่วัดได้ (µg/ml)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	100	80.59 ± 0.85	1.07	80.59
2	อาหารกุ้ง	100	92.48 ± 0.40	0.44	92.48
3	อาหารสุกร	100	89.49 ± 0.88	0.98	89.49
4	อาหารปลา	100	81.58 ± 0.82	1.00	81.58

หมายเหตุ : ตัวอย่างก่อนการspikeตรวจไม่พบสารกลุ่มควิโนโลนปนเปื้อนอยู่ เพราะฉะนั้นจึงกำหนดให้ปริมาณของสารกลุ่มควิโนโลนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ spike สารมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0

จากการ spike ควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน เป็นปริมาณ 1 มิลลิกรัม ลงไปในตัวอย่างอาหารไก่ , อาหารสุกร, อาหารกุ้ง และอาหารปลา พบว่า จะให้ค่า % Recovery อยู่ในช่วง 70 - 110 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ (official journal of the European Communities) ในขณะที่ % RSD ที่ได้มีค่า ≤ 10 แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีค่าความถูกต้อง (Accuracy) อยู่ในเกณฑ์ดี

4.5.1.4 ผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วย HPLC

การศึกษานี้จะนำเอาสารตัวอย่างที่สกัดไว้ จากข้อ 4.5.1.1 มาปรับความเข้มข้นของสารควิโนโลนในตัวอย่างให้เป็น 5 ppm ด้วย Milli Q แล้วนำมาทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้ Acetonitrile : Phosphate Buffer เท่ากับ 35 : 65 เป็น Mobile phase เพื่อหาค่าความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ในรูปของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) และค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์จากค่า % Recovery แสดงผลการวิเคราะห์ไว้ในตารางที่ 4.34 ถึง 4.36 ดังต่อไปนี้

ตารางที่4.34 ค่า RSD และค่า%Recovery ของนาลิดิซิก แอซิดด้วยเทคนิคHPLC

No.	ตัวอย่าง (n = 5)	ปริมาณ NAL ที่ spike (µg/ml)	ปริมาณ NAL ที่วัดได้ (µg/ml)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	5	3.98 ± 0.05	1.16	79.60
2	อาหารกุ้ง	5	4.26 ± 0.07	1.64	85.20
3	อาหารสุกร	5	4.56 ± 0.03	0.70	91.20
4	อาหารปลา	5	3.96 ± 0.11	2.78	79.28

หมายเหตุ : ตัวอย่างก่อนการspikeตรวจไม่พบสารกลุ่มควิโนโลนปนเปื้อนอยู่ เพราะฉะนั้นจึงกำหนดให้ปริมาณของสารกลุ่มควิโนโลนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ spike สารมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0

ตารางที่4.35 ค่า RSD และค่า%Recoveryของนอร์ฟล็อกซาซินด้วยเทคนิคHPLC

No.	ตัวอย่าง (n = 5)	ปริมาณ NOR ที่ spike (µg/ml)	ปริมาณ NOR ที่วัดได้ (µg/ml)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	5	3.69 ± 0.12	3.36	73.80
2	อาหารกุ้ง	5	4.43 ± 0.28	6.30	88.64
3	อาหารสุกร	5	4.72 ± 0.15	3.18	94.40
4	อาหารปลา	5	3.56 ± 0.21	5.84	71.20

ตารางที่ 4.36 ค่า RSD และค่า%Recovery ของฟลูมิควินด้วยเทคนิคHPLC

No.	ตัวอย่าง (n = 5)	ปริมาณ FLU ที่ spike (µg/ml)	ปริมาณ FLU ที่วัดได้ (µg/ml)	RSD	% Recovery
1	อาหารไก่	5	4.18 ± 0.09	1.91	83.60
2	อาหารกุ้ง	5	4.44 ± 0.21	4.64	88.76
3	อาหารสุกร	5	4.54 ± 0.13	2.86	90.80
4	อาหารปลา	5	4.09 ± 0.09	2.10	81.89

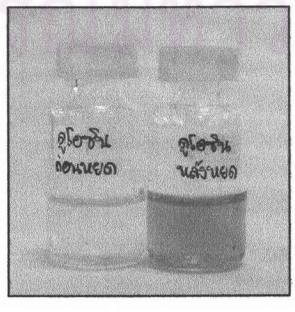
หมายเหตุ : ตัวอย่างก่อนการspikeตรวจไม่พบสารกลุ่มควิโนโลนปนเปื้อนอยู่ เพราะฉะนั้นจึงกำหนดให้ปริมาณของสารกลุ่มควิโนโลนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ spike สารมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0

จากการ spike ควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดคือ นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ลงไปในตัวอย่าง ได้แก่ อาหารไก่, อาหารสุกร, อาหารกุ้ง, อาหารปลา แล้วนำมาปรับความเข้มข้นให้เป็น 5 ppm เพื่อนำไปหาความสามารถในการตรวจวัดด้วยวิธี HPLC (โดยทำการตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมดก่อนทำการ spike และไม่พบการปนเปื้อนควิโนโลนในตัวอย่าง) นอกจากนี้เมื่อทำการ spike ควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด ลงไปจะให้ % Recovery อยู่ในช่วง 70-110 % (official journal of the European Communities) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับโดยที่ % RSD ≤ 10 แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มี Accuracy ดี

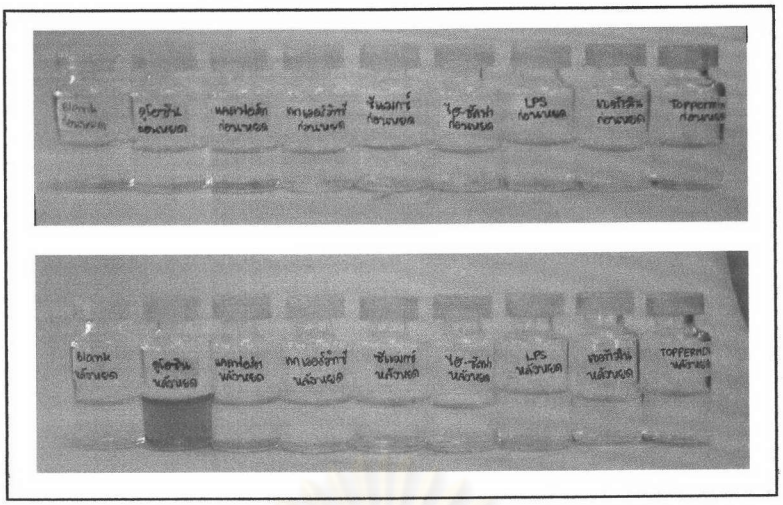
และเมื่อนำค่า % Recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นและด้วยวิธี HPLC มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ค่า % Recovery ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมีค่าไม่ต่างจากค่า% Recovery ของ HPLC เท่าใดนัก แสดงถึงการสกัดตามวิธีที่ได้ทดสอบไปนั้นมีประสิทธิภาพที่ดีพอที่จะนำไปใช้งานจริงได้ เพียงแต่การใช้ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนั้นยังต้องอาศัยการแยกแยะระหว่างนาลิดิซิก แอซิดและนอร์ฟล็อกซาซินที่ยังให้สีจากการทดสอบใกล้เคียงกัน

4.5.2 ผลการศึกษาในยาสำหรับสัตว์

การศึกษานี้เป็นการใช้ชุดตรวจสอบกับยาสำหรับสัตว์ชนิดต่างๆที่เกษตรกรใช้ในปัจจุบันว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถตรวจสอบยาควิโนโลนที่ปนเปื้อนอยู่ในยานั้นได้หรือไม่ โดยทำการทดสอบกับยาสัตว์ 8 ชนิด คือ เบต้ามิน, ไฮ-ซัลฟา, LPS, ดูโอซิน, ซีแมกซ์, แคลฟอร์ต, พาวเวอร์วิท-ซี และทอปเปอร์มิน จากนั้นสังเกตด้วยตาเปล่าและนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณควิโนโลนที่ผสมอยู่ในยาเหล่านั้น ผลที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงได้ ดังตารางที่ 4.37 และรูปที่ 4.34 และ 4.35



รูปที่ 4.34 ยาดูโอซินเมื่อทำการทดสอบ



รูปที่ 4.35 ยาที่ใช้สำหรับสัตว์ก่อนและหลังทำการทดสอบ

ตารางที่ 4.37 แสดงสีที่เกิดขึ้นกับยาสำหรับสัตว์ชนิดต่างๆหลังหยดน้ำยาทดสอบ

No.	ชื่อของยา	สีที่เกิดขึ้น (Visual test)
1	เบต้ามิน	ไม่เปลี่ยนแปลง
2	ไฮ-ซัลฟา	”
3	LPS	”
4	ดูโอซิน	สารละลายสีเหลือง
5	ซีแมกซ์	ไม่เปลี่ยนแปลง
6	แคลฟอร์ต	”
7	พาวเวอร์วิท-ซี	”
8	ทอปเปอร์มิน	”

จากการทดสอบจะเห็นได้ว่ามียาสำหรับการเลี้ยงสัตว์ 1 ชนิด ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีหลังหยดน้ำยาทดสอบ คือ ยาดูโอซิน เมื่อทำการทดสอบเกิดเป็นสีเหลืองถึงเหลืองอมส้ม จึงสันนิษฐานว่ามีนาลิดิซิก แอซิด หรือ นอร์ฟล็อกซาซินอยู่ (ซึ่งเป็นข้อจำกัดของชุดทดสอบนี้) เมื่อเทียบกับแถบสีจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100 ppm

จากนั้นจึงนำยาดูโอซินไปทำการยืนยันผลด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.38

ตารางที่ 4.38 แสดงปริมาณของควิโนโลนที่อยู่ในยาสัตว์โดยการวัดด้วยวิธี UV และ HPLC

ชนิดของยา	ความเข้มข้นของสารที่วัดได้ (ppm)	
	UV-VIS	HPLC
ดูโอซิน	λ max 440 nm y = 0.0019x + 0.0059	Retention time 3.845 y = 120.45x + 25.743
	137 ppm	146 ppm

จากตารางที่ 4.38 พบว่า เมื่อทำการวัดด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วงของนอร์ฟล็อกซาซิน แสดงถึงว่าในดูโอซินมีนอร์ฟล็อกซาซินผสมอยู่ เมื่อนำไปคำนวณหาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินที่ผสมอยู่ด้วยสมการที่แสดงในตาราง พบว่าในยาดูโอซิน 100 มิลลิกรัม จะมีนอร์ฟล็อกซาซินผสมอยู่เท่ากับ 137 ppm และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า ยาดูโอซินมีค่า retention time อยู่ในช่วงของสารมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซิน คือ 3.845 นาที และเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์จะได้ความเข้มข้นของนอร์ฟล็อกซาซิน เท่ากับ 146 ppm

4.6 การศึกษาการเกิดผลบวกลวงเมื่อใช้ชุดทดสอบ

4.6.1 ผลการหาการเกิดผลบวกลวงตามหมู่ฟังก์ชัน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาการเกิดผลบวกลวง (False positive) ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับสารในหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เพื่อดูว่าหมู่ฟังก์ชันใดบ้างที่อาจเกิดผลบวกลวง โดยทำการทดสอบหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกันด้วยกรดไนตริก (อัตราส่วนกรดไนตริก ต่อ น้ำ เท่ากับ 50 : 50) ร่วมกับ Complexing agent คือ 10% Iron(III) nitrate nonahydrate ในอัตราส่วนเป็น 10 : 1 ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 4.39

ตารางที่ 4.39 แสดงผลการหาผลบวกลวงกับสารตามหมู่ฟังก์ชัน

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	ไม่เปลี่ยนแปลง
8	Acetic acid	Carboxylic acid	”
9	Ethyl acetate	Ester	สารละลายใสสีเขียวอ่อน
10	Acetonitrile	R-nitrile	ไม่เปลี่ยนแปลง
11	disaccharide (น้ำตาลทราย)	Carbohydrate	”

จากตารางที่ 4.39 พบว่า เมื่อทำการทดสอบปรากฏว่าสารที่อยู่ในหมู่ Acetaldehyde และ Ethyl acetate เท่านั้นที่มีการเปลี่ยนสี โดยสีเปลี่ยนจากสารละลายใสไม่มีสีเป็นสีแดงและสีเขียว แต่สีที่เกิดขึ้นนั้นต่างกับสีที่เกิดขึ้นหลังการทดสอบกับควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด สีที่เกิดขึ้นจึงไม่ใช่ข้อผิดพลาดของชุดตรวจสอบ เพราะฉะนั้น สารในหมู่ฟังก์ชันที่ได้ทำการทดสอบทั้ง 9 หมู่ไม่เกิดผลบวกลวงกับน้ำยาทดสอบแต่อย่างใด

4.6.2 ผลการหาผลบวกลวงกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

เป็นการศึกษาเพื่อหาความผิดพลาด (False positive) ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล และยาปฏิชีวนะในกลุ่มไนโตรฟูแรน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.40

ตารางที่ 4.40 แสดงผลการหาผลบวกลวงกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

No.	สารตัวอย่าง (0.1 mg)	การเปลี่ยนแปลงหลังการทดสอบ
1	• กลุ่มคลอแรมเฟนิคอล - คลอแรมเฟนิคอล	ไม่เปลี่ยนแปลง
2	• กลุ่มไนโตรฟูแรน - Nitrofurantoin - Furatadone - Furazolidone - Nitrofurazone	ไม่เปลี่ยนแปลง ” ” ”

จากตารางที่ 4.40 พบว่า เมื่อทำการทดสอบยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด คือ สารในกลุ่มคลอแรมเฟนิคอล และไนโตรฟูแรน ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีแต่อย่างใด เพราะฉะนั้น ยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดที่ทำการทดสอบนี้จึงไม่เกิดผลบวกลวงกับน้ำยาทดสอบ

4.6.3 ผลการหาผลบวกลวงกับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

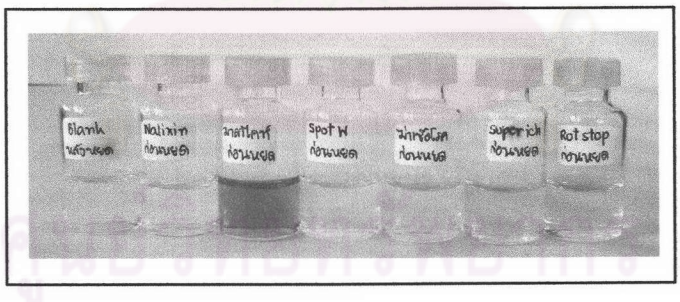
เป็นการศึกษาเพื่อหาความผิดพลาด (False positive) ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา โดยผลที่สังเกตได้หลังการใช้น้ำยาทดสอบพบว่ายาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาเพียง 1 ชนิด คือ ยา Nalixin จะเกิดสีเหลืองอมส้ม ซึ่งเป็นสีที่เปลี่ยนไปของนอร์ฟล็อกซาซินหรือนาลิดิซิก แอซิดหลังจากการหยดน้ำยาทดสอบ ผลการทดสอบที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังตารางที่ 4.41 และ รูปที่ 4.36 ถึง 4.37

ตารางที่ 4.41 แสดงผลการหาผลบวกลวงกับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

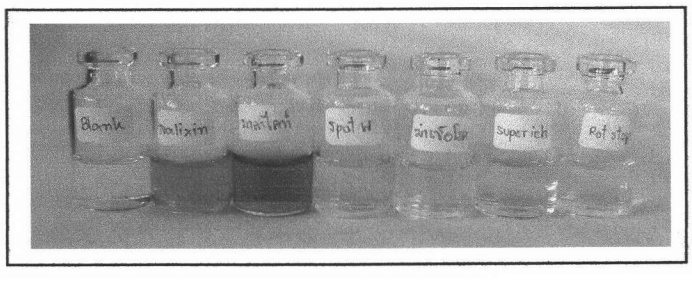
No.	ชื่อยา	สีของยา ก่อนการทดสอบ	การเปลี่ยนแปลง หลังการทดสอบ
1	Rot stop	สารละลายใส ไม่มีสี	ไม่เปลี่ยนแปลง
2	Super Ich	สารละลายใส ไม่มีสี	ไม่เปลี่ยนแปลง
3	Nalixin	สารละลายใส ไม่มีสี	สารละลายใส สีเหลืองอมส้ม
4	Spot W	สารละลายใส ไม่มีสี	ไม่เปลี่ยนแปลง
5	มาลาไคท์ กรีน เอฟ	สารละลายสีเขียวเข้ม	ไม่เปลี่ยนแปลง
6	ยาฆ่าเชื้อโรคสำหรับสัตว์น้ำ	สารละลายใส ไม่มีสี	ไม่เปลี่ยนแปลง

ที่มา : จากการสังเกตด้วยตาเปล่า (Visual test)

จากผลที่เกิดขึ้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าใน Nalixin จะมีนาลิดิซิกหรือนอร์ฟล็อกซาซิน ผสมอยู่ จึงทำการยืนยันผลด้วยเทคนิค HPLC ปรากฏว่ามีการผสมของนาลิดิซิก แอซิด อยู่เนื่องจากค่า Retention time อยู่ในช่วงของนาลิดิซิก แอซิด คือ ช่วง 11.47 นาที พบว่ามีความเข้มข้น เท่ากับ 75 ppm



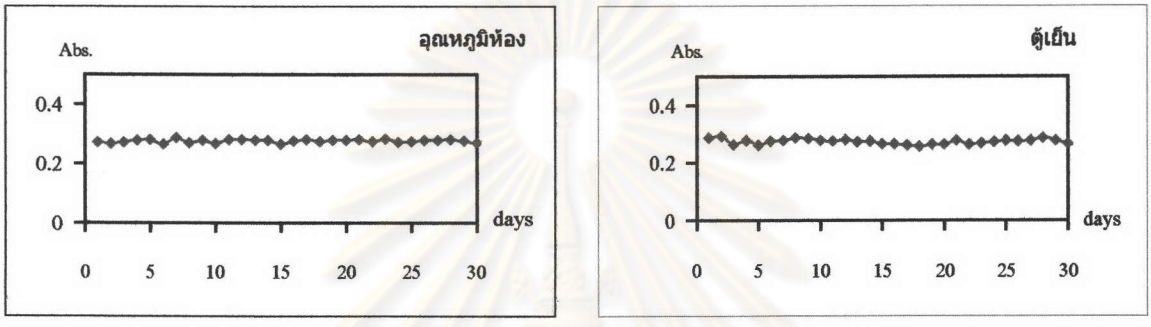
รูปที่ 4.36 สีของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาก่อนการหยดน้ำยาทดสอบ



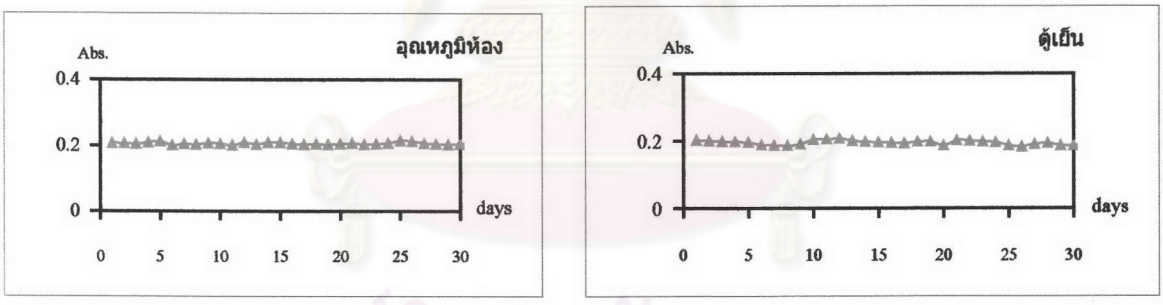
รูปที่ 4.37 สีของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาหลังการหยดน้ำยาทดสอบ

4.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ

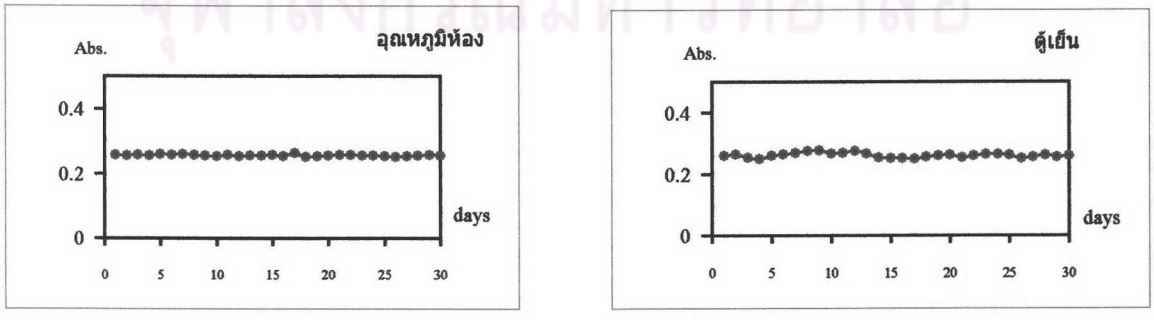
การทดสอบเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ ทำได้โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการหยดน้ำยาทดสอบของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm ทำการวัดทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยทำการเก็บรักษาน้ำยาทดสอบในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 18 องศาเซลเซียส เพื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ได้ผลการทดสอบดังรูปที่ 4.38 ถึง 4.40 และตารางที่ 4.42



รูปที่ 4.38 การดูดกลืนแสงของนาลิดิซิก แอซิดเมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็น



รูปที่ 4.39 การดูดกลืนแสงนอร์ฟลอกซาซินเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็น



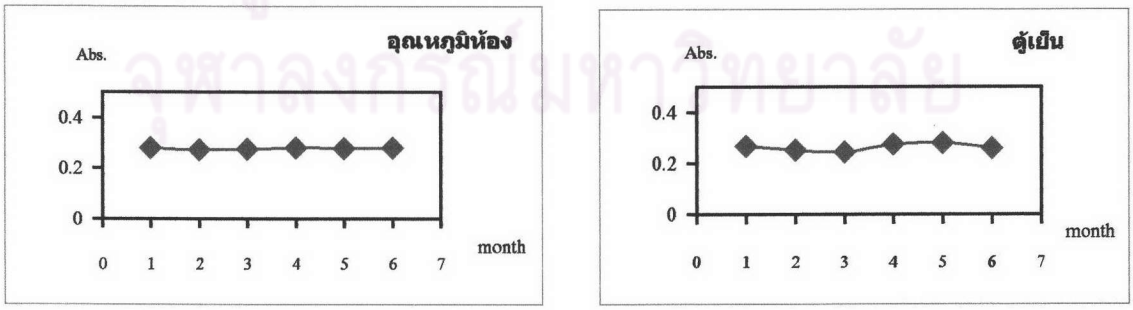
รูปที่ 4.40 การดูดกลืนแสงของฟลูมิควินเมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็น

ตารางที่ 4.42 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนหลังหยดน้ำยาทดสอบเป็นระยะเวลา 1 เดือน เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิต่างกัน

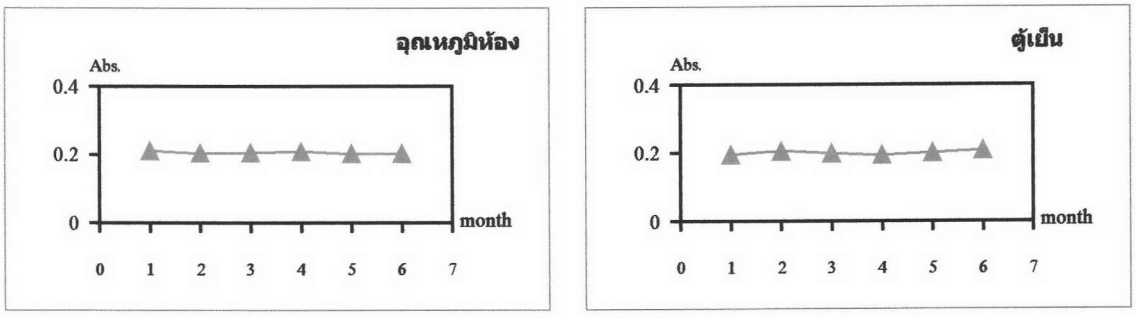
(n = 31 วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง Nalidixic acid		ค่าการดูดกลืนแสง Norfloxacin		ค่าการดูดกลืนแสง Flumequine	
	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น
ค่าเฉลี่ย	0.277	0.273	0.205	0.196	0.257	0.262
SD	0.006	0.009	0.003	0.006	0.003	0.007
RSD	2.17	3.30	1.65	3.06	0.98	2.67

จากตารางที่ 4.42 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงใน 1 เดือนของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน โดยเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้องและการเก็บรักษาในตู้เย็นเปรียบเทียบกัน พบว่า ในระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือน น้ำยาทดสอบไม่ว่าจะเก็บที่อุณหภูมิใดก็ยังมีเสถียรภาพสูง เนื่องจากมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของทั้ง 2 อุณหภูมิมีค่าต่ำกว่า 10

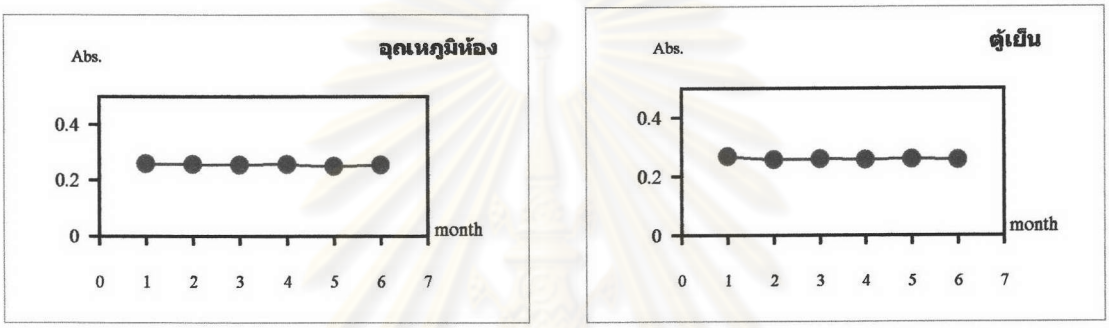
เพื่อเป็นการยืนยันเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ จึงทำการทดลองต่อไปเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยทำการวัดเดือนละ 1 ครั้ง ทั้งหมด 6 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.41 ถึง 4.43 และ ดังตารางที่ 4.43



รูปที่ 4.41 การดูดกลืนแสงของนาลิดิซิก แอซิด ในเวลา 6 เดือน เมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็น



รูปที่ 4.42 การดูดกลืนแสงของนอร์ฟล็อกซาซินในเวลา 6 เดือน
เมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็น



รูปที่ 4.43 การดูดกลืนแสงของฟลูมิควินในเวลา 6 เดือน
เมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็น

ตารางที่ 4.43 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนหลังหยดน้ำยาทดสอบเป็นระยะเวลา 6 เดือน

(n = 6 เดือน)	ค่าการดูดกลืนแสง Nalidixic acid		ค่าการดูดกลืนแสง Norfloxacin		ค่าการดูดกลืนแสง Flumequine	
	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น
ค่าเฉลี่ย	0.277	0.264	0.205	0.201	0.257	0.261
SD	0.006	0.013	0.003	0.006	0.003	0.004
RSD	2.17	4.92	1.65	2.99	0.98	1.53

จากตารางที่ 4.43 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงใน 6 เดือนของนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน โดยเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้องและการเก็บรักษาในตู้เย็นเปรียบเทียบกัน พบว่า ในระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน น้ำยาทดสอบไม่ว่าจะเก็บที่อุณหภูมิใดก็ยังมีเสถียรภาพสูง เนื่องจากมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของทั้ง 2 อุณหภูมิมีค่าต่ำกว่า 5

จากผลการทดลองความมีเสถียรภาพ พบว่า น้ำยาทดสอบสามารถใช้งานได้มากกว่า 6 เดือน เนื่องจากผลการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มควิโนโลนหลังการทดสอบด้วยน้ำยามีค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลงมากนักจากเมื่อเริ่มใช้ทดสอบ

4.8 การศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบอื่น

เนื่องจากในขณะนี้ประเทศไทยยังไม่มีชุดตรวจสอบสำหรับสารในกลุ่มควิโนโลน ดังนั้นการทดสอบในลักษณะชุดตรวจสอบจึงมีเพียงการทดสอบแบบการทดสอบโดยหมู่ฟังก์ชันและการทดสอบด้วยวิธีจากตำรับยา ซึ่งผลการทดสอบที่ได้มีดังต่อไปนี้

4.8.1 ผลการทำปฏิริยาโดยวิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน

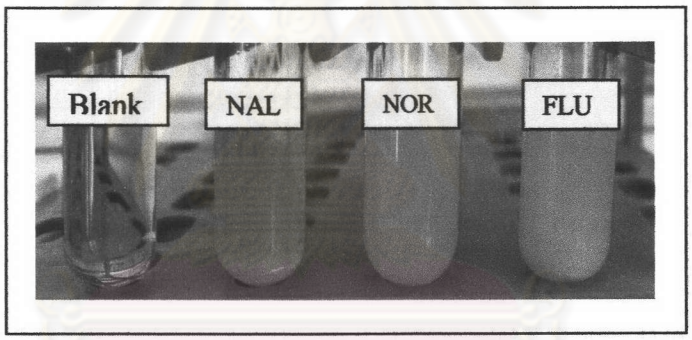
เป็นการศึกษาการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้หลักการของการทดสอบหมู่ฟังก์ชันของที่อยู่ในโครงสร้างหลักของสารกลุ่มควิโนโลนซึ่งก็คือหมู่คาร์บอนิล (C=O) , คาร์บอกซิลิก (- COOH) และแอมีน (NH_2R) ใช้วิธีทดสอบหมู่ต่างๆ ได้ผลดังต่อไปนี้

1. การทดสอบสารประกอบหมู่คาร์บอนิล

การทดสอบสารในกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธี 2,4 Dinitrophenylhydrazine (2 ,4 – DNP) โดยการใช้รีเอเจนต์ 2,4 DNP หากได้ตะกอนสีเหลืองแสดงว่าสารตัวอย่างนั้นมีหมู่คาร์บอนิล (Carbonyl group) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.44 และ รูปที่ 4.44

ตารางที่ 4.44 แสดงผลการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธี 2,4 – DNP

No.	สารตัวอย่าง	การเปลี่ยนแปลง		
		Norfloxacin	Flumequine	Nalidixic acid
1	10 mg	เกิดตะกอนสีเหลือง	เกิดตะกอนสีเหลือง	เกิดตะกอนสีเหลือง
2	1 mg	เกิดตะกอนสีเหลือง	เกิดตะกอนสีเหลือง	เกิดตะกอนสีเหลือง
3	0.1 mg = 100 µg	เกิดตะกอนเล็กน้อย	เกิดตะกอนเล็กน้อย	เกิดตะกอนเล็กน้อย
4	0.01 mg = 10 µg	สารละลายสีส้ม	สารละลายสีส้ม	สารละลายสีส้ม
blank		สารละลายสีส้ม		



รูปที่ 4.44 ลักษณะของสารละลายเมื่อทดสอบด้วย 2,4 – DNP

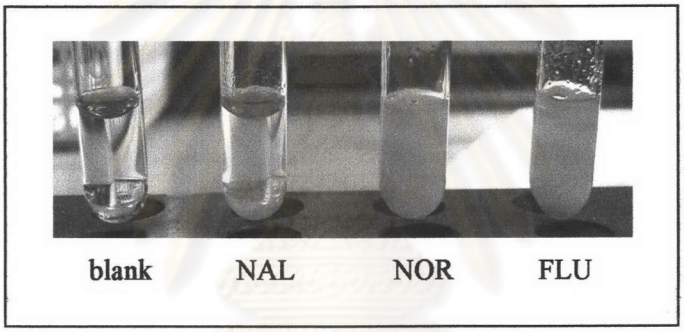
จากตารางที่ 4.44 พบว่า การทดสอบด้วยวิธีนี้เกิดเป็นตะกอนสีเหลืองขึ้นดังรูปที่ 4.44 แสดงว่ามีหมู่ของคาร์บอนิลดังที่ได้คูไว้จากโครงสร้าง แต่การตรวจวัดด้วยวิธีนี้สามารถตรวจวัดได้ต่ำสุดเพียง 1 มิลลิกรัม ถ้าต่ำกว่านี้จะมองเห็นตะกอนไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารในกลุ่มควิโนโลนหรือไม่เนื่องจากระบุได้เพียงว่าเป็นสารที่มีหมู่คาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบ

2. การทดสอบสารประกอบหมู่คาร์บอกซิลิก

ทดสอบด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย $NaHCO_3$ หากผลทดสอบเป็นบวกจะสังเกตเห็นฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ผลการทดสอบกับสารกลุ่มควิโนโลนที่ได้ดังตารางที่ 4.45 และรูปที่ 4.45

ตารางที่ 4.45 แสดงผลการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธีทำปฏิกิริยากับ 5% $NaHCO_3$

No.	สารตัวอย่าง	การเปลี่ยนแปลง		
		Norfloxacin	Flumequine	Nalidixic acid
1	10 mg	เกิดฟองแก๊สเล็กน้อย	เกิดฟองแก๊สเล็กน้อย	เกิดฟองแก๊สเล็กน้อย
2	1 mg	สารละลายขุ่นขาว	สารละลายขุ่นขาว	สารละลายขุ่นขาว
3	0.1 mg = 100 µg	สารละลายขุ่นขาว	สารละลายขุ่นขาว	สารละลายขุ่นขาว
blank		สารละลายใส ไม่เกิดฟองแก๊ส		



รูปที่ 4.45 ลักษณะของสารละลายเมื่อทดสอบด้วย 5% $NaHCO_3$

จากตารางที่ 4.45 พบว่าสารกลุ่มควิโนโลนทำปฏิกิริยากับสารละลาย 5% $NaHCO_3$ เกิดฟองแก๊สขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.45 มองเห็นด้วยตาเปล่าได้ยาก เพราะฉะนั้นการทดสอบด้วยวิธีนี้จึงให้ผลได้ไม่ดีนัก ไม่เหมาะจะทำเป็นชุดตรวจสอบ

3. การทดสอบสารประกอบแอมีน

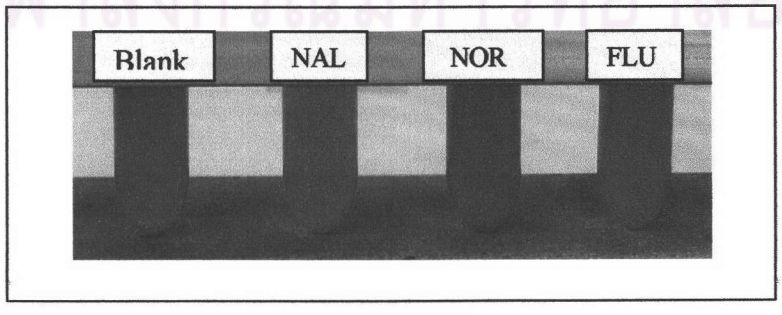
เนื่องจากสารในกลุ่มควิโนโลนเป็นสารที่มีส่วนประกอบของ aliphatic amine จึงทำการทดสอบด้วยวิธี Simon และ Ramini tests เมื่อทำการทดสอบด้วย 2 วิธีนี้ผลที่ได้มีลักษณะของสารละลายเหมือนกัน โดยแสดงดังตารางที่ 4.46 และ 4.47 นั่นคือ เมื่อทำการทดสอบแล้วไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารในกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด โดยสารละลายที่เกิดขึ้นมีสีน้ำตาลอิฐ ดังแสดงในรูปที่ 4.46

ตารางที่ 4.46 แสดงผลการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธี Ramini test

No.	สารตัวอย่าง	การเปลี่ยนแปลง		
		Norfloxacin	Flumequine	Nalidixic acid
1	5 mg	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม
2	1 mg	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม
3	0.1 mg	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม
blank		สารละลายน้ำตาลส้ม		

ตารางที่ 4.47 แสดงผลการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธี Simon test

No.	สารตัวอย่าง	การเปลี่ยนแปลง		
		Norfloxacin	Flumequine	Nalidixic acid
1	5 mg	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม
2	1 mg	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม
3	0.1 mg	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม	สารละลายน้ำตาลส้ม
blank		สารละลายน้ำตาลส้ม		

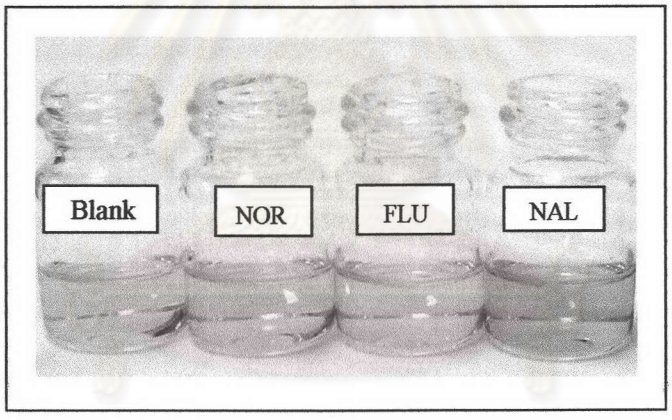


รูปที่ 4.46 ลักษณะของสารละลายสีน้ำตาลส้มเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Simon test

จากตารางที่ 4.46 และ 4.47 จะเห็นได้ว่าการตรวจสอบด้วย 2 วิธีนี้จะไม่สามารถตรวจสอบสารในกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดได้ อาจเป็นเพราะโครงสร้างที่มีความซับซ้อน ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ทั้ง 2 วิธีนี้ในการตรวจสอบได้

4.8.2 การทดสอบตามวิธีจากตำรับยาของประเทศจีน

การทดสอบนาลิดิซิก แอซิดตามตำรับยาของประเทศจีน (Pharmacopoeia of the people's republic of china) ทำการทดสอบโดยชั่งสาร 10 มิลลิกรัม ทำการเติมน้ำ 1 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม Vanillin 10 มิลลิกรัม ต้มเป็นเวลา 2 นาที สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง เมื่อทำการทดสอบตามตำรับยาแล้วผลที่ได้ คือ สามารถทดสอบนาลิดิซิก แอซิดได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50 ppm ส่วนนอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินไม่เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงใดๆ



รูปที่ 4.47 ลักษณะของสารละลายเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีตามตำรับยาของประเทศจีน

จากการทดสอบที่ผ่านมานั้น คือ การทดสอบตามหมู่ฟังก์ชัน ไม่สามารถนำมาใช้กับการตรวจสารในกลุ่มควิโนโลนทั้งนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินได้ เนื่องจากสามารถระบุได้เพียงว่ามีหมู่ฟังก์ชันตามนั้นแต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นควิโนโลนหรือไม่ หรือการทดสอบด้วยวิธีตามตำรับยาประเทศจีนก็ไม่สามารถตรวจสอบนอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินได้ ดังนั้น การเลือกใช้วิธีการทดสอบตามงานวิจัยที่ได้เสนอมาทั้งหมดอาจใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และ ฟลูมิควิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มควิโนโลนได้