การพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มควิโนโลนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก

นางสาวกุสุมา เอกสาโรจน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-17-4965-1
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TEST KIT DEVELOPMENT FOR QUINOLONES IN ANIMAL FEED BY COLORIMETRIC METHOD

Miss Kusuma Eaksarod

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science
(Inter-department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-17-4965-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มควิโนโลนในอาหารสัตว์ ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก
โดย	นางสาวกุสุมา เอกสาโรจน์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ปารมี เพ็งปรีชา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. กัลยา ติงศภัทิย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.ปารมี เพ็งปรีชา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา เลิศปรัชญา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุสุมา เอกสาโรจน์ : การพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มควิโนโลนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก (TEST KIT DEVELOPMENT FOR QUINOLONES IN ANIMAL FEED BY COLORIMETRIC METHOD) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร.สมใจ เพ็งปรีชา, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ปารมี เพ็งปรีชา ; 149 หน้า.

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มควิโนโลนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีได้ชัดเจนที่สุดเมื่อมีการใช้ กรดไนตริก 32.5% ในน้ำ ร่วมกับ 10% เฟอริกไนเตรทโนนาไฮเดรทในน้ำที่มี 1% กรดไนตริก ที่อัตราส่วน 10:1 สีที่เกิดจากการทดสอบของนาลิดิซิกแอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน คือ สีเหลือง, สีเหลืองอมส้ม และสีส้ม ตามลำดับ ซึ่งมองเห็นในระดับความเข้มข้นต่ำสุด คือ 10 ppm สีที่ได้มีความคงตัวมากกว่า 2 ชั่วโมง เมื่อนำไปทำการทดสอบกับตัวอย่างอาหารสัตว์ 4 ชนิด พบว่า สีที่เกิดขึ้นเป็นไปตามแถบสีมาตรฐานที่ความเข้มข้นช่วง 10 ถึง 500 ppm เมื่อทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง ยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) อยู่ในช่วง 0.44 ถึง 4.56 และค่าการกลับคืน (%Recovery) อยู่ในช่วง 80.25 ถึง 92.48% การเปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC ที่ความเข้มข้นช่วง 0.1-10 ppm มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) อยู่ในช่วง 0.70 ถึง 6.30 และค่าการกลับคืน (%Recovery) อยู่ในช่วง 71.20 ถึง 94.40% ชุดตรวจสอบนี้ไม่เกิดผลบวกลวง (false positive) กับสารปฏิชีวนะอื่นๆ เช่น คลอแรมฟินิคอล, ไนโตรฟูราโซน, ไนโตรฟูแรนโตอิน, ฟูราโซลิโดน, ฟูราลตาโดน ชุดตรวจสอบนี้มีข้อจำกัดการใช้งานกับสารละลายที่มีค่าพีเอช ≥ 7 อย่างไรก็ดีการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบนี้เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ตรวจสอบสารกลุ่มควิโนโลนเบื้องต้นก่อนการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) ลายมือชื่อนิสิต กุสุมา เอกสาโรจน์

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4689057220 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORD : QUINOLONES / ANIMAL FEED / COLORIMETRIC METHOD

KUSUMA EAKSAROD : TEST KIT DEVELOPMENT FOR QUINOLONES IN ANIMAL FEED BY COLORIMETRIC METHOD. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMCHAI PENGPRECHA, Ph.D., THESIS COADVISOR: PARAMEE PENGPRECHA, Ph.D., 149 pp. ISBN 974-17-4965-1

Colorimetric method was developed for determination of 3 quinolones in animal feed. This test-kit gave the best result when used the solution of 32.5% nitric acid in water in combination with the solution of 10% iron(III) nitrate nonahydrate ($Fe(NO_3)_3x9H_2O$) in water with 1% nitric acid at the ratio of 10 : 1. The color of nalidixic acid , norfloxacin and flumequine changed from colorless to yellow, yellow-orange and orange , respectively. The color band strips were obtain in the range of 10 to 500 ppm. The color was stable for more than 2 hours. The method validation with 4 animal feeds by UV-VIS Spectrophotometer gave 0.44 – 4.56 % RSD and % recovery in a range of 80.25 – 92.48. In the comparison with HPLC technique in the range of 0.1 – 10 ppm, %RSD between 0.70 – 6.30 and % recovery in a range of 71.20 - 94.40 % were obtained. This test-kit did not give any false positive results with other antibiotics such as chloramphenical, nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone. This test-kit could not be used in the solution with pH ≥ 7. However, this test-kit is an alternative method for screening test for quinolone antibiotics before contaminating into the environment.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study Environmental Science (Inter-department) Student's signature Kusuma Eaksarod

Academic year 2005 Advisor's signature Somchai Pengprecha

Co-advisor's signature Paramee Pengprecha

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. ปารมี เพ็งปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขรายละเอียดต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา เลิศปรัชญา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี และ สหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่และความสะดวกในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ตัณฑุลานิ และหน่วยวิจัยซุปราโมเลคิวลาร์ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ UV-Visible Spectrophotometer

ขอขอบพระคุณโรงเรียนซางตาครูสคอนแวนท์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ทำให้ผู้วิจัยได้รับความรู้และฝึกความอดทนได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคน โดยเฉพาะคุณภัทรชัย วิเศษบรรจง , คุณพัฒน์ธิดา ทองขาว, คุณรวิพรรณ ทองห่อ , คุณอุมาพร อนันควานิช, คุณกิติยา น้อยม่วง และคุณปริญา รัตนา ที่คอยรับฟังปัญหาเป็นกำลังใจให้เสมอมาและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

ที่สำคัญที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่อบรมเลี้ยงดู รวมทั้งพี่สาวและน้องสาวที่ให้การส่งเสริม สนับสนุนการศึกษาเป็นอย่างดีมาตลอด อีกทั้งยังเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งในการทำให้สามารถสำเร็จการศึกษาตามเจตนารมณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญรูป ..... ฒ
คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์ ..... ต
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย 3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี 4
2.1.1 ยาต้านจุลชีพ 4
2.1.1.1 ประเภทของยาต้านจุลชีพ 5
2.1.1.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ 6
2.1.1.3 อันตรายจากยาต้านจุลชีพ 7
2.1.2 ยาต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ 8
2.1.2.1 การใช้ยาต้านจุลชีพในอาหารสัตว์ 8
2.1.2.2 ปัญหาจากการใช้ยาต้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์ 9
2.1.2.3 การป้องกันการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพ 11
2.1.2.4 มาตรฐานระหว่างประเทศ 12
2.1.3 สารกลุ่มควิโนโลน 14
2.1.3.1 โครงสร้างทางเคมี 14
2.1.3.2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ 16
2.1.3.3 กลไกการออกฤทธิ์ 16

หน้า

2.1.3.4 ฤทธิ์แทรกแซง 17
2.1.3.5 ปฏิกิริยาระหว่างยา 17
2.1.4 สารกลุ่มควิโนโลนที่ทำการศึกษา 18
2.1.4.1 Nalidixic Acid 18
2.1.4.2 Norfloxacin 20
2.1.4.3 Flumequine 22
2.1.4.4 ปัญหาการใช้ยาในกลุ่มควิโนโลน 24
2.1.5 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ 25
2.1.5.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 26
2.1.5.2 Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 26
2.1.5.3 Mass Spectrometry (MS) 27
2.1.5.4 Colorimetric method 27
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 29
2.2.1 การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มควิโนโลน ที่ปนเปื้อนในอาหาร, เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ชนิดต่างๆ 29
2.2.2 การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของสารกลุ่มควิโนโลน ในสิ่งแวดล้อม 31
2.2.3 การวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มควิโนโลน 31
บทที่ 3 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการศึกษา 34
3.1 ขั้นตอนการศึกษา 34
3.2 สารเคมี 35
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ 35
3.3.1 อุปกรณ์ 35
3.3.2 เครื่องมือวิจัย 36
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย 36
3.4.1 การเตรียมการทดลอง 36
3.4.1.1 การเตรียมสารละลาย 36
3.4.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานควิโนโลนสำหรับทดสอบ การเกิดสีและใช้กับเครื่อง UV-Visible spectrophotometer 38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

3.4.1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานควิโนโลนสำหรับใช้กับเครื่อง HPLC....39
3.4.2 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีที่สภาวะเหมาะสม....40
3.4.2.1 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม....40
3.4.2.1.1 ศึกษาความสามารถในการละลายของสารในกลุ่มควิโนโลน....40
3.4.2.1.2 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ....40
3.4.2.1.3 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับComplexing agents....41
3.4.2.1.4 การศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสม....42
3.4.2.2 การศึกษา Complexing agent ที่เหมาะสม....42
3.4.2.2.1 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่างๆ....42
3.4.2.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของ Complexing agent ที่เหมาะสม....43
3.4.2.3 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวทำละลายและ Complexing agent....43
3.4.2.4 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม....43
3.4.2.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม....44
3.4.2.6 ศึกษาความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น....44
3.4.3 การศึกษาความสามารถในการตรวจวัดสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก....44
3.4.4 การสร้างแถบสีมาตรฐาน....45
3.4.5 ศึกษาการตรวจวัดควิโนโลนด้วยเทคนิค HPLC....45
3.4.6 ตรวจสอบความใช้ได้ (Validate) กับตัวอย่างชนิดต่างๆ....45
3.4.6.1 การศึกษาในอาหารสัตว์....45
3.4.6.2 การศึกษาในยาสำหรับสัตว์....48
3.4.7 ศึกษาการเกิดผลบวกลวงเมื่อใช้ชุดทดสอบ....49
3.4.7.1 การหาผลบวกลวงกับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่างๆ....49
3.4.7.2 การหาผลบวกลวงกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ....49
3.4.7.3 การหาผลบวกลวงกับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา....49
3.4.8 การศึกษาเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ....50
3.4.9 การศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบอื่น....50

หน้า

บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล 52
4.1 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีที่สภาวะเหมาะสม 53
4.1.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม 53
4.1.1.1 ผลการศึกษาความสามารถในการละลายของสารในกลุ่มควิโนโลน 53
4.1.1.2 ผลการศึกษาการเกิดสีโดยใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ 54
4.1.1.3 ผลการศึกษาการเกิดสีโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับ Complexing agent 55
4.1.1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสม 58
4.1.2 ผลการศึกษา Complexing agent ที่เหมาะสม 60
4.1.2.1 ผลศึกษาการเกิดสีโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่างๆ 60
4.1.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ Complexing agent ที่เหมาะสม 62
4.1.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวทำละลายและComplexing agent 65
4.1.4 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม 67
4.1.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม 69
4.1.6 ผลการศึกษาความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น 71
4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดสารกลุ่มควิโนโลนโดยวิธีดัลเลอริเมตริก 73
4.3 การสร้างแถบสีมาตรฐาน 80
4.4. ผลการศึกษาการตรวจวัดควิโนโลนด้วยเทคนิค HPLC 82
4.5 ผลตรวจสอบความใช้ได้ (Validate) กับตัวอย่างชนิดต่างๆ 84
4.5.1 ผลการศึกษาในอาหารสัตว์ 84
4.5.2 ผลการศึกษาในยาสำหรับสัตว์ 91
4.6 การศึกษาการเกิดผลบวกลวงเมื่อใช้ชุดทดสอบ 93
4.6.1 ผลการหาการเกิดผลบวกลวงตามหมู่ฟังก์ชัน 93
4.6.2 ผลการหา False positive กับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ 94
4.6.3 ผลการหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา 95
4.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ 97
4.8 ผลการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบอื่น 100
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 105

หน้า

5.1 สรุปผลการศึกษา 105
5.2 ข้อเสนอแนะ 107
รายการอ้างอิง 108
ภาคผนวก 113
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 149

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงการแบ่งกลุ่มของสารกลุ่มควิโนโลน 15
2.2 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของนาลิดิซิก แอซิด 19
2.3 แสดงคุณสมบัติการละลายของนาลิดิซิก แอซิด ที่ 23 °C 19
2.4 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของนอร์ฟล็อกซาซิน 21
2.5 แสดงคุณสมบัติการละลายของนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ 25 °C 21
2.6 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของฟลูมิควิน 23
2.7 แสดงคุณสมบัติการละลายของฟลูมิควินที่ 25 °C 23
3.1 แสดงชนิด Complexing agent ที่ทำการทดลอง 41
3.2 อาหารสัตว์ที่ใช้ในการทดสอบ 46
4.1 แสดงความสามารถในการละลายของสารควิโนโลนในตัวทำละลายชนิดต่างๆ 53
4.2 แสดงชนิดComplexing agent ที่ทำการทดลอง 54
4.3 แสดงสีที่เกิดขึ้นของสารกลุ่มควิโนโลนเมื่อใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ 55
4.4 แสดงสีของควิโนโลนโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ร่วมกับ Complexing agent 56
4.5 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดและค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 100 ppm ในตัวทำละลายต่างๆ 57
4.6 แสดงสีของควิโนโลน 100 ppm เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลาย 58
4.7 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดและค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลาย 59
4.8 แสดงสีที่เกิดขึ้นของนาลิดิซิก แอซิด 60
4.9 แสดงสีที่เกิดขึ้นของนอร์ฟล็อกซาซิน 61
4.10 แสดงสีที่เกิดขึ้นของฟลูมิควิน 62
4.11 แสดงการเกิดสีของควิโนโลน 100 ppm ด้วย Complexing agent ความเข้มข้นระดับต่างๆ 63
4.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนความเข้มข้น 100 ppm เมื่อใช้ Complexing agent ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ 64
4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิด 100 ppm โดยใช้อัตราส่วนของกรดไนตริก : 10% $Fe(NO_3)_3$ ที่แตกต่างกัน 65
4.14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซิน 100 ppm โดยใช้อัตราส่วนของกรดไนตริก : 10% $Fe(NO_3)_3$ ที่แตกต่างกัน 66

ตารางที่ หน้า

4.15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูมิควิน 100 ppm โดยใช้อัตราส่วนของกรดไนตริก : 10% $Fe(NO_3)_3$ ที่แตกต่างกัน 66
4.16 แสดงการเกิดสีของสารควิโนโลน 100 ppm ทดสอบที่ค่า pH ต่างกัน 67
4.17 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดและค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 100 ppm เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลาย 68
4.18 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของนาลิดิซิก แอซิด 100 ppm ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 69
4.19 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของนอร์ฟล็อกซาซิน 100 ppm ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 69
4.20 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของฟลูมิควิน 100 ppm ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 70
4.21 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด 100 ppm ที่เวลาต่างกัน 72
4.22 แสดงสีที่มองเห็นและความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 0.2 mg หลังจากใช้น้ำยาทดสอบ 73
4.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น สีที่ถูกดูดกลืน (Color Transmitted) และ สีที่เกิดขึ้นจริง (Complementary Color) 75
4.24 แสดงผลการตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนที่ความเข้มข้น 10 ppm ถึง 500 ppm และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ หลังใช้น้ำยาทดสอบ 76
4.25 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิดที่ 430 นาโนเมตร 77
4.26 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ 440 นาโนเมตร 78
4.27 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูมิควินที่ 470 นาโนเมตร 79
4.28 ค่า Retention time เฉลี่ยของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดของเทคนิค HPLC 82
4.29 ค่า Linear of regression และ R^2 ของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนจากเทคนิค HPLC 84
4.30 การวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วยตาเปล่าเทียบกับแถบสีมาตรฐาน 86
4.31 ค่าความแม่นยำและค่าความถูกต้องของนาลิดิซิก แอซิดด้วยชุดตรวจสอบ 87
4.32 ค่าความแม่นยำและค่าความถูกต้องของนอร์ฟล็อกซาซินด้วยชุดตรวจสอบ 88
4.33 ค่าความแม่นยำและค่าความถูกต้องของฟลูมิควินด้วยชุดตรวจสอบ 88
4.34 ค่า RSD และค่า%Recovery ของนาลิดิซิก แอซิดด้วยเทคนิคHPLC 89
4.35 ค่า RSD และค่า%Recoveryของนอร์ฟล็อกซาซินด้วยเทคนิคHPLC 90
4.36 ค่า RSD และค่า%Recovery ของฟลูมิควินด้วยเทคนิคHPLC 90
4.37 แสดงสีที่เกิดขึ้นกับยาสำหรับสัตว์ชนิดต่างๆหลังหยดน้ำยาทดสอบ 92
4.38 แสดงปริมาณของควิโนโลนที่อยู่ในยาสัตว์โดยการวัดด้วย UV และ HPLC 93
4.39 แสดงผลการหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชัน 94

ตารางที่ หน้า

4.40 แสดงผลการหา False positive กับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ 95
4.41 แสดงผลการหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา 96
4.42 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนหลังหยดน้ำยาทดสอบเป็นระยะเวลา 1 เดือน 98
4.43 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนหลังหยดน้ำยาทดสอบเป็นระยะเวลา 6 เดือน 99
4.44 แสดงผลการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธี 2,4 – DNP 101
4.45 แสดงผลการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธีทำปฏิกิริยากับ 5% $NaHCO_3$ 102
4.46 แสดงผลการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธี Ramini test 103
4.47 แสดงผลการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธี Simon test 103
ก-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิดที่ 430 nm 115
ก-2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซินที่ 440 nm 115
ก-3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูมิควินที่ 470 nm 116
ง-1 แสดงสูตรของอาหารไก่ไข่เล็ก (อายุ 0-6 สัปดาห์) 135
ง-2 แสดงสูตรของอาหารไก่ไข่ (กินอาหาร 90-100 กรัม/วัน) 136
ง-3 แสดงสูตรของอาหารไก่เนื้อ 137
ง-4 แสดงสูตรของอาหารสุกร 138
ง-5 แสดงสูตรของอาหารปลานิล 139
ง-6 แสดงสูตรของอาหารกุ้งกุลาดำ 139

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 กราฟแสดงการใช้ยาต้านจุลชีพในประเทศสหรัฐอเมริกา 4
2.2 แสดงสูตรโครงสร้างโดยทั่วไปของสารกลุ่มควิโนโลน 14
2.3 แสดงความสามารถในการละลายของควิโนโลนเมื่อเปลี่ยนแปลงค่า pH 15
2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของนาลิดิซิก แอซิด 18
2.5 แสดงลักษณะผลึกและสีของนาลิดิซิก แอซิด 18
2.6 แสดงสูตรโครงสร้างของนอร์ฟล็อกซาซิน 20
2.7 แสดงลักษณะผลึกและสีของนอร์ฟล็อกซาซิน 21
2.8 แสดงสูตรโครงสร้างของสารฟลูมิควิน 22
2.9 แสดงลักษณะผลึกและสีของฟลูมิควิน 23
2.10 การกระจายตัวของควิโนโลนในสิ่งแวดล้อม 25
2.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสีกับเวลา 28
4.1 กราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนเมื่อเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย 57
4.2 กราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนตัวทำละลาย 59
4.3 แสดงสีที่เกิดขึ้นของนาลิดิซิก แอซิดหลังหยดน้ำยาทดสอบ 63
4.4 แสดงสีที่เกิดขึ้นของนอร์ฟล็อกซาซินหลังหยดน้ำยาทดสอบ 64
4.5 แสดงสีที่เกิดขึ้นของฟลูมิควินหลังหยดน้ำยาทดสอบ 64
4.6 สารละลายเมื่อปรับค่า pH มีค่ามากกว่า 7 67
4.7 กราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของควิโนโลนเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 70
4.8 กราฟแสดงความคงตัวของนาลิดิซิก แอซิดที่ช่วงเวลาต่างๆ 71
4.9 กราฟแสดงความคงตัวของนอร์ฟล็อกซาซินที่ช่วงเวลาต่างๆ 71
4.10 กราฟแสดงความคงตัวของฟลูมิควินที่ช่วงเวลาต่างๆ 72
4.11 แสดงสีที่เกิดขึ้นของสารกลุ่มควิโนโลนทั้ง 0.2 มิลลิกรัม 73
4.12 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของนาลิดิซิก แอซิดความเข้มข้น 100 ppm 74
4.13 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของนอร์ฟล็อกซาซินความเข้มข้น 100 ppm 74
4.14 การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของฟลูมิควินความเข้มข้น 100 ppm 74
4.15 Calibration range ของนาลิดิซิก แอซิดที่ความเข้มข้น 10 ถึง 500 ppm 77
4.16 Calibration range ของนอร์ฟล็อกซาซินที่ความเข้มข้น 10 ถึง 500 ppm 78
4.17 Calibration range ของฟลูมิควินที่ความเข้มข้น 10 ถึง 500 ppm 79

รูปที่ หน้า

4.18 สีที่เกิดขึ้นของสารกลุ่มควิโนโลนหลังหยดน้ำยาทดสอบ 80
4.19 แถบสีมาตรฐานของนาลิดิซิก แอซิด 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm 81
4.20 แถบสีมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm 81
4.21 แถบสีมาตรฐานของฟลูมิควิน 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm 81
4.22 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายผสม 1 ppm 82
4.23 Calibration rangeของนาลิดิซิก แอซิดที่ความเข้มข้น 0.1–10 ppm 83
4.24 Calibration rangeของนอร์ฟล็อกซาซินที่ความเข้มข้น 0.1–10 ppm 83
4.25 Calibration rangeของฟลูมิควินที่ความเข้มข้น 0.1–10 ppm 83
4.26 อาหารไก่ (ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ) 85
4.27 อาหารไก่ (หลังหยดน้ำยาทดสอบ) 85
4.28 อาหารกุ้ง (ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ) 85
4.29 อาหารกุ้ง (หลังหยดน้ำยาทดสอบ) 85
4.30 อาหารสุกร(ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ) 85
4.31 อาหารสุกร(หลังหยดน้ำยาทดสอบ) 85
4.32 อาหารปลา (ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ) 85
4.33 อาหารปลา (หลังหยดน้ำยาทดสอบ) 85
4.34 ยาดูโอซินเมื่อทำการทดสอบ 91
4.35 ยาที่ใช้สำหรับสัตว์ก่อนและหลังทำการทดสอบ 92
4.36 สีของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาก่อนการหยดน้ำยาทดสอบ 96
4.37 สีของยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาหลังการหยดน้ำยาทดสอบ 96
4.38 การดูดกลืนแสงของนาลิดิซิก แอซิด เมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้อง และตู้เย็น 97
4.39 การดูดกลืนแสงของนอร์ฟลอกซาซินเมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้อง และตู้เย็น 97
4.40 การดูดกลืนแสงของฟลูมิควินเมื่อเก็บรักษาน้ำยาทดสอบที่อุณหภูมิห้อง และตู้เย็น 97
4.41 การดูดกลืนแสงของนาลิดิซิก แอซิด เมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 6 เดือน 98
4.42 การดูดกลืนแสงของนอร์ฟล็อกซาซินเมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 6 เดือน 98
4.43 การดูดกลืนแสงของฟลูมิควินเมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 6 เดือน 98
4.44 ลักษณะของสารละลายเมื่อทดสอบด้วย 2,4-DNP 101

รูปที่ หน้า

4.45 ลักษณะของสารละลายเมื่อทดสอบด้วย 5% $NaHCO_3$ 102
4.46 ลักษณะของสารละลายสีน้ำตาลส้มเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Simon test 103
4.47 ลักษณะของสารละลายเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีตามตำรับยาของประเทศจีน 104
ข-1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 0 ppm 118
ข-2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม 1 ppm 119
ข-3 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิด 10 ppm 120
ข-4 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานฟลูมิควิน 10 ppm 121
ข-5 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซิน 10 ppm 122
ข-6 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของอาหารสุกรก่อนเติมสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 123
ข-7 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5 ppm ที่เติมในอาหารสุกร 124
ข-8 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของอาหารไก่ก่อนเติมสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 125
ข-9 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5 ppm ที่เติมในอาหารไก่ 126
ข-10 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของอาหารกุ้งกุลาดำก่อนเติมสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 127
ข-11 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5 ppm ที่เติมในอาหารกุ้ง 128
ข-12 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของอาหารปลาก่อนเติมสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 129
ข-13 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5 ppm ที่เติมในอาหารปลา 130
ข-14 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของดูโอซินความเข้มข้น 100 ppm 131

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

NAL	Nalidixic acid
NOR	Norfloxacin
FLU	Flumequine
ppb	Part per billion
ppm	Part per million
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy- Mass Spectroscopy
UV	Ultraviolet
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย