สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการศึกษา

การพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในอาหารกุ้งด้วยวิธีคัลเลอริเมริก มีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการศึกษาดังต่อไปนี้

3.1 ขั้นตอนการศึกษา

3.1.1 การศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสี (Colorimetric) ของคลอแรมเฟนิคอลด้วยวิธีต่าง ๆ ที่สภาวะเหมาะสม

3.1.2 การศึกษาความสามารถของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล

3.1.3 การสร้างแถบสีมาตรฐาน

3.1.4 การนำชุดตรวจสอบไปใช้และประเมินชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับ ตัวอย่างอาหารกุ้ง สารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) และดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry เทียบกับเทคนิค HPLC

3.1.5 การศึกษาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ในสารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

3.1.6 การศึกษาสิ่งรบกวน ที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบ

3.1.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีคัลเลอลิเมตริกที่มีในปัจจุบัน

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่

- Chloramphenicol
- Dimethyl sulfoxide (AR grade)
- *N,N* - Dimethylformamide (AR grade)
- Potassium hydroxide
- Sodium hydroxide
- Methanol (HPLC grade)
- Ethanol (HPLC grade)
- Propanol (HPLC grade)
- n-Hexane (AR grade)
- Ethylacetate (HPLC grade)
- Ethylenediamine (AR grade)
- Acetronitrile (HPLC grade)
- Ceric nitrate reagent
- Ferrous sulfate reagent
- Ammonium chloride (NH_4Cl)
- Tollen's reagent
- Calcium chloride
- Zinc powder
- Benzoyl chloride
- Iron(III)chloride ($FeCl_3$)
- Chloroform (HPLC grade)
- Alphanapthol

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.3.1 อุปกรณ์

- หลอดหยด (Droper)
- กระจกนาฬิกา (Watch glass dish)
- หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10 มิลลิลิตร
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5, 10, 25 และ 100 มิลลิลิตร
- ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต (Micro pipette) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร
- ทิปสำหรับไมโครปิเปต
- กรวยกรอง (Funnel filter)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Filter paper)
- โกร่งบดยา
- ขวดทดสอบ (Vial)

3.3.2 เครื่องมือวิจัย

- เครื่องชั่งชนิดละเอียด AB204-S ของ Mettler Toledo
- เครื่องชั่งชนิดละเอียดรุ่น BP211D ของ Sartorius
- เครื่อง Vortex รุ่น Vortex-2 Genie
- เครื่อง UV-Visible spectrophotometer ของ Varian รุ่น Cary 50 Probe
- เครื่อง HPLC ชนิด Photodiode Array Detecter ของ Varian พร้อมด้วยคอลัมน์ Hypersil BDS C18 ของ Thermo Hypersil-Keystone

3.4 การเตรียมการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสารละลาย

3.4.1.1 1 M Sodium hydroxide

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.2 5 M Sodium hydroxide

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.3 10 M Sodium hydroxide

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.4 1 M Potassium hydroxide

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5611 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.5 5 M Potassium hydroxide

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 2.806 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.6 10 M Potassium hydroxide

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 5.611 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10มิลลิลิตร

3.4.1.7 1 M Methanolic sodium hydroxide

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ละลายในเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.8 5 M Methanolic sodium hydroxide

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ละลายในเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.9 1 M Methanolic potassium hydroxide

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5611 กรัม ละลายในเมทานอลปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.10 5 M Methanolic potassium hydroxide

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 2.8055 กรัม ละลายในเมทานอลปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.11 1 M Ethanolic sodium hydroxide

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ละลายในเอทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.12 5 M Ethanolic sodium hydroxide

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ละลายในเอทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.13 1 M Ethanolic Potassium Hydroxide Solution

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5611 กรัม ละลายในเอทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.14 5 M Ethanolic Potassium hydroxide Solution

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 2.8055 กรัม ละลายในเอทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.15 1 M Propanolic Potassium hydroxide

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5611 กรัม ละลายในโพรพานอลปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล (Standard solution) สำหรับใช้ทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสี และใช้กับเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

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

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm

ชั่งคลอแรมเฟนิคอล 0.0250 กรัม นำมาละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 100 ppm

ปิเปตสารละลายสต็อกคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้ได้ 25 มิลลิลิตร

3.4.2.2 Working standard solution ความเข้มข้น 90, 70, 50, 30, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 และ 0.01 ppm

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 90 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 2.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 70 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 1.75 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 50 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 30 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 0.75 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 0.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 0.125 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 100 ppm 0.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 100 ppm 0.125 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm 0.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.05 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm 0.125 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.01 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1 ppm 0.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

3.4.3 การเตรียม Mobile phase สำหรับ HPLC

- โมบายล์เฟสใช้เมทานอลและน้ำกลั่นผสมกันในอัตราส่วน 50 ต่อ 50, MeOH:H_2O (50:50)

- เมทานอล และ น้ำกลั่นชนิด Deionize กรองผ่านพอลิเมอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และไล่อากาศออกภายใต้ระบบสุญญากาศนาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้กับ HPLC

3.4.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล (Standard solution) สำหรับใช้กับเครื่อง HPLC

3.4.4.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 และ 100 ppm

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm

ชั่งคลอแรมเฟนิคอล 0.0100 กรัม นำมาละลายด้วยโมบายล์เฟสแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 100 ppm

ปิเปตสารละลายสต็อกคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.4.2 Working standard solution ความเข้มข้น 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 และ 0.01 ppm

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 100 ppm 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 100 ppm 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1 ppm 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.05 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1 ppm 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.01 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ppm 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.5 วิธีการดำเนินการศึกษา

3.5.1 การศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสี (Colorimetric) ของคลอแรมเฟนิคอล ด้วยวิธีต่าง ๆ ที่สภาวะเหมาะสม

3.5.1.1 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน

3.5.1.1.1 การทดสอบหมู่ไฮดรอกซิล

3.5.1.1.1.1 การทดสอบโดยการเกิดปฏิกิริยากับซีริกไนเตรท (Ceric nitrate reagent)

ชั่งคลอแรมฟีนิคอล 10, 1, 0.1 มิลลิกรัม ในหลอดทดลองที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ หลอดที่ เติม Ceric ammonium nitrate หลอดละ 5 หยด เขย่า สังเกตสี บันทึกผล ทำ Blank เปรียบเทียบในหลอดทดลองที่ 4 (เผด็จ, 2539)

3.5.1.1.2 การทดสอบสารประกอบไนโตรอะโรมาติก

3.5.1.1.2.1 การทดสอบโดยวิธี Ferrous hydroxide test

ชั่งคลอแรมฟีนิคอล 5, 1 และ 0.1 มิลลิกรัม ในหลอดทดลองที่ 1-3 เติม Ferrous sulfate reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม Ethanolic KOH solution 0.7 มิลลิลิตร แล้วรีบปิดหลอดทันทีด้วยจุกคอร์ก เขย่าแรง ๆ และทดสอบว่าสารละลายเป็นด่างหรือไม่ สังเกตสีของตะกอนในระยะเวลา 1 นาที บันทึกผล ทำ Blank เปรียบเทียบในหลอดทดลองที่ 4 (เผด็จ, 2539)

3.5.1.1.2.2 การทดสอบโดยวิธี Zn/NH_4Cl test

ชั่งคลอแรมฟีนิคอล 5, 1 และ 0.1 มิลลิกรัม ในหลอดทดลองที่ 1-3 เติม 50 % (v/v) ethanol 2 มิลลิลิตร เติม NH_4Cl และผง Zn อย่างละ 0.1 กรัม เขย่าแล้วต้มให้เดือด ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นประมาณ 5 นาที กรองสารละลายแล้วจึงนำไปทดสอบกับ Tollen's reagent โดยนำส่วนใสประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เติมด้วย Tollen's reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ ถ้ามีหมู่ไนโตรจะถูกออกซิไดซ์ได้ Silver mirror ฉาบอยู่ข้างหลอดทดลอง บันทึกผล ทำ Blank เปรียบเทียบในหลอดทดลองที่ 4 (เผด็จ, 2539)

3.5.1.1.3 การทดสอบหมู่เอไมด์

3.5.1.1.3.1 การทดสอบด้วยวิธี Ferric hydroxamate test

ชั่งคลอแรมฟีนิคอล 5, 1, 0.1 มิลลิกรัม ในหลอดทดลองที่ 1-3 และ ปิเปตสารละลายคลอแรมเฟนิคอลในเอทานอล ความเข้มข้น 10 และ 1 ppm อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 4 และ 5 (คิดเป็นปริมาณคลอแรมเฟนิคอล 10 และ 1 ไมโครกรัม) เติมสารละลาย 0.5 M $NH_2OH.HCl$ ใน 95% ethanol 1 มิลลิลิตร หยด 10% (w/v) NaOH จนสารละลายเป็นด่างโดยทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส ต้มให้เดือดแล้วทำให้เย็น เติม 1 M HCl จนสารละลายเป็นกรด เติม 5% (w/v) $FeCl_3$ 1 หยด สังเกตสี ถ้าสารมีหมู่เอไมด์จะให้สารละลายสีน้ำเงินหรือสีม่วงแดง ทำ Blank เปรียบเทียบในหลอดทดลองที่ 6 (เผด็จ, 2539)

3.5.1.2 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

โดยทดสอบ Solvent และ Complexing agent ที่เหมาะสม สามารถทำให้คลอแรมเฟนิคอลเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีได้ดีที่สุด ดังการทดลองต่อไปนี้

3.5.1.2.1 การศึกษาการละลายของคลอแรมเฟนิคอล

ชั่งคลอแรมเฟนิคอล 1 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง 8 หลอด และเติม Methanol Ethylacetate Acetronitrile Hexane Ethylenediamine Dimethylformamide (DMF) และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการละลาย

3.5.1.2.2 การศึกษา Solvent และ Complexing agent ที่เหมาะสม

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

ชั่งคลอแรมเฟนิคอล 0.1 มิลลิกรัม ลงในขวดทดสอบ 6 ขวด เติม Methanol Ethylacetate Acetronitrile Hexane Ethylenediamine Dimethylformamide (DMF) และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มิลลิลิตร ลงในขวดทดสอบ เติม Complexing agent ในอัตราส่วน 10 ต่อ 1 คือ 1 M Ethanolic potassium hydroxide ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน สังเกต การเปลี่ยนแปลง

3.5.1.2.2.2 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยใช้ 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

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลในตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ppm ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีปริมาณคลอแรมเฟนิคอลเท่ากับ 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครกรัม ลงในขวดทดสอบความเข้มข้นละ 7 ขวด (5 ชุด) จากนั้นเติม Complexing agent ในอัตราส่วน 10 ต่อ 1 คือ 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 และ 1 M KOH/IPA ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละชุดความเข้มข้นสังเกตสีและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ทำ Blank เปรียบเทียบโดยใช้ DMSO 1 มิลลิลิตร แล้วเติม Complexing agent 100 ไมโครลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลในตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ppm ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีปริมาณคลอแรมเฟนิคอลเท่ากับ 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครกรัมลงในขวดทดสอบความเข้มข้นละ 8 ขวด (5 ชุด) จากนั้นเติม Complexing agent ในอัตราส่วน 10 ต่อ 1 คือ 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 และ 5 M KOH/EtOH ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละชุดความเข้มข้นสังเกตสีและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ทำ Blank เปรียบเทียบโดยใช้ DMSO 1 มิลลิลิตร แล้วเติม Complexing agent 100 ไมโครลิตร

3.5.1.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO และ 1 M KOH/IPA

3.5.1.2.3.1 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO กับ 1 M KOH/IPA

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 30 ppm ลงในหลอดทดลอง 3 มิลลิลิตร เติม Complexing agent ที่ได้จากการทดลองที่ 3.5.1.3.2.2 ปริมาณ 300 ไมโครลิตร (อัตราส่วนสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ส่วน ต่อ Complexing agent 1 ส่วน) จากนั้นจึงวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ทุก 1 นาที ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยใช้ DMSO ผสมกับ 1M KOH/IPA ในอัตราส่วนเดียวกันเป็น Blank

จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น แต่เปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ต่อ Complexing agent เป็น 20:1, 25:1, 30:1 และ 40:1 ซึ่งจะใช้สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 30 ppm 3 มิลลิลิตร กับ 1M KOH/IPA ในปริมาตร 150, 120, 100 และ 75 ไมโครลิตร ตามลำดับ

3.5.1.2.3.2 การศึกษาความคงตัวของสี ที่เกิดจากคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO กับ 1 M KOH/IPAอัตราส่วน 25:1

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 30 ppm ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Complexing agent ที่ให้ผลในอัตราส่วนที่ดีที่สุด จากการทดลองที่ 3.5.1.2.3.1 ปริมาณ 120 ไมโครลิตร จากนั้นจึงวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ทุก 1 นาที นาน 10 นาที และ วัดค่าการดูดกลืนแสงต่อไปทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยใช้ DMSO ผสมกับ 1M KOH/IPA ในอัตราส่วนเดียวกันเป็น Blank สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล กับ Complexing agent ที่ 518 นาโนเมตร ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง

3.5.2 การศึกษาความสามารถของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล

3.5.2.1 การศึกษาช่วงการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล ที่เหมาะสม

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 100, 90, 70, 50, 30, 10, 5, 1, 0.5 และ 0.1 ppm ปริมาณ 1 มิลิลิตร (100-0.1 ไมโครกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร) แต่ละความเข้มข้นลงในขวดทดสอบ เติม 1 M KOH/IPA 40 ไมโครลิตร (อัตราส่วนสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO : 1 M KOH/IPA = 25:1) เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้นโดยเทียบความเข้มสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Visual test) หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นได้

ยืนยันความถูกต้องด้วยการปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 100, 90, 70, 50, 30, 10, 5, 1, 0.5 และ 0.1 ppm ปริมาณ 3 มิลิลิตร แต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง เติม 1 M KOH/IPA 120 ไมโครลิตร (อัตราส่วนสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO : 1 M KOH/IPA = 25:1) เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร โดยใช้ DMSO ผสมกับ 1M KOH/IPA ในอัตราส่วน 25:1 เป็น Blank

จากนั้นเลือกค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 1-100 ppm หลังหยดน้ำยาทดสอบนาน 3 นาที ทุกวันเป็นระยะเวลา 5 วัน เพื่อหาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลกับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง เพื่อหาสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R^2) ของชุดตรวจสอบ

3.5.2.2 การทดสอบเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ

ทดสอบเสถียรภาพของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน DMSO ความเข้มข้น 30 ppm โดยเก็บรักษาสารละลายมาตรฐานในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 284 นาโนเมตร เดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 6 เดือน สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับระยะเวลาที่เก็บรักษา หาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงในระยะเวลา 6 เดือน ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)

ทดสอบเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ 1M KOH/IPA โดยเก็บรักษาน้ำยาทดสอบในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร หลังการหยดน้ำยาทดสอบ 1 M KOH/IPA กับสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้น 30 ppm ในอัตราส่วน 25:1 นาน 3 นาที วันเว้นวันรวม 15 ครั้ง เป็นระยะเวลา 1 เดือน สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับระยะเวลาที่เก็บรักษา หาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงในระยะเวลา 1 เดือน ค่า SD และค่า RSD

ทดสอบเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ 1M KOH/IPA โดยเก็บรักษาน้ำยาทดสอบด้วยขวดสีชาในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ แล้วตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 518 นาโนเมตร หลังการหยดน้ำยาทดสอบ 1 M KOH/IPA กับสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้น 30 ppm ในอัตราส่วน 25:1 นาน 3 นาที วันเว้นวันรวม 15 ครั้ง เป็นระยะเวลา 1 เดือน สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับระยะเวลาที่เก็บรักษา หาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงในระยะเวลา 1 เดือน ค่า SD และค่า RSD

ทำการทดลองต่อไป โดยเก็บรักษาน้ำยาทดสอบ 1M KOH/IPA ด้วยขวดสีชาในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงเดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 6 เดือนสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับระยะเวลาที่เก็บรักษา หาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงในระยะเวลา 6 เดือน ค่า SD และ ค่า RSD

เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) ของวิธีการและระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำยาทดสอบ เพื่อหาอายุการใช้งานและวิธีการที่ดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำยาทดสอบ ที่จะทำให้น้ำยาทดสอบยังคงมีประสิทธิภาพเกิดสีกับคลอแรมเฟนิคอลได้สม่ำเสมอ

3.5.3 การสร้างแถบสีมาตรฐาน

สร้างแถบสีมาตรฐานของชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยเทียบความเข้มสีที่เกิดขึ้นจริง จากการสังเกตด้วยตาเปล่าตามผลการทดสอบข้อ 3.5.2.1 ในช่วงความเข้มข้นต่ำสุดที่สังเกตได้ถึง 100 ppm คือ 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90 และ 100 ppm

3.5.4 การนำชุดตรวจสอบไปใช้ และประเมินชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างอาหารกุ้ง สารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) และดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry เทียบกับเทคนิค HPLC

ชั่งอาหารกุ้งเบอร์ 1 บดละเอียด 2 กรัม ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-5 ที่มีคลอแรมเฟนิคอล บีกเกอร์ละ 0.1 มิลลิกรัม ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน บีกเกอร์ใบที่ 6 มีเฉพาะอาหารกุ้งเพื่อเป็น Blank กำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดตัวอย่างด้วย Hexane 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วน Hexane ทิ้งไป ซ้ำ 5 ครั้งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนตัวอย่างแห้งสนิท

ชั่งสารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) Mineral Premix ยี่ห้อ Toppermin 2 กรัม ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-5 ที่มี คลอแรมเฟนิคอล บีกเกอร์ละ 0.1 มิลลิกรัม ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน บีกเกอร์ใบ ใบที่ 6 มีเฉพาะ Mineral Premix เพื่อเป็น Blank

ชั่งดินบ่อเลี้ยงกุ้งบดละเอียด บีกเกอร์ละ 2 กรัม ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-5 ที่มี คลอแรมเฟนิคอล บีกเกอร์ละ 0.1 มิลลิกรัม ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน บีกเกอร์ใบที่ 6 มีเฉพาะดินบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อเป็น Blank (ดินริมบ่อเลี้ยงกุ้ง ระดับความลึก 2 เซนติเมตรจากจังหวัดฉะเชิงเทรา เก็บโดยใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างดินตามระดับความลึก (Core sampler) ทำจากพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ½ นิ้ว และมีความยาว 30 เซนติเมตร)

ตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารกุ้ง สารเติมในอาหารกุ้งและดินบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยปิเปต DMSO 10 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแต่ละบีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวอย่างตกตะกอน หาปริมาตรส่วนใส (เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ตรวจพบ) กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บส่วนใส จากนั้นปิเปตสารละลายส่วนใสที่ได้ 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดทดสอบเติมน้ำยาทดสอบ 1 M KOH/IPA 20 ไมโครลิตร (25:1) เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงเทียบกับ Blank และอ่านความเข้มข้นจากการเทียบความเข้มสีกับแถบสีมาตรฐาน

3.5.4.1 การวิเคราะห์หาค่าความถูกต้อง (Recovery) และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry

ปิเปตสารละลายส่วนใสรวมทั้ง Blank ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างอาหารกุ้ง สารเติมในอาหารกุ้งและดินบ่อเลี้ยงกุ้ง จากข้อ 3.5.5 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เติม 1M KOH/IPA 120 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาทีและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอล จากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ของกราฟมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ข้อ 3.5.2.1 และนำค่าที่ได้คำนวณหาค่าความถูกต้อง (Recovery) และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) ดังสมการ

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

เมื่อ A = ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างหลังการ Spike สารมาตรฐาน (μg)

B = ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ Spike สารมาตรฐาน (μg)

C = ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ Spike ลงไปในตัวอย่าง (μg)

หาค่าความคลาดเคลื่อนในรูปความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, RSD) ของการสกัดคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ จากสมการ

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD} \times 100}{\overline{X}}$$

เมื่อ RSD = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (Relative Standard Deviation)

SD = ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

X = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง

3.5.4.2 การศึกษาช่วงการตรวจวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลด้วย HPLC ที่เหมาะสม

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 ppm ด้วย HPLC ชนิด Photodiode Array Detecter ที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ Hypersil BDS โมบายล์เฟสใช้เมทานอลและน้ำกลั่นผสมกันในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 อัตราการไหล 1.1 ml/min และปริมาตรที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร แล้วนำผลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่าง Peak area กับ ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลเพื่อหา Linear regression และ ค่า Correlation coefficient (R^2)

3.5.4.3 การวิเคราะห์หาค่าความถูกต้อง (Recovery) ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค HPLC

เลือกสารละลายส่วนใสจากตัวอย่างอาหารกุ้ง สารเติมในอาหารกุ้งและดินบ่อเลี้ยงกุ้ง ตัวอย่างละ 1 ขวด รวมทั้ง Blank ที่ได้จากการสกัดจากข้อ 3.5.4 ปิเปตปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโมบายล์เฟสให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร ฉีด 5 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ย Peak area ที่ได้คำนวณหาความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอลจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ของกราฟมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่ได้จากข้อ 3.5.5.2 และนำค่าที่ได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาค่าความถูกต้อง (Recovery) จากการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC

3.5.5 การศึกษาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ในสารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) ด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

การศึกษานี้เป็นการตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลจากสารเติมในอาหารกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน 12 ยี่ห้อคือ ยากุ้ง, NEU-Prawn1, NEU-Prawn2, คูโอซิน, LPS,แคลฟอร์ต, พาวเวอร์วิท-ซี, ทอปเปอร์มิน, ซีแมกซ์, ไฮ-ซัลฟา, เบต้ามิน, ฟีวรามิกซ์ และ Factor R ดังรูปที่ 3.1

รูปที่ 3.1 แสดงสารเติมในอาหารกุ้ง (Shrimp feed additive) ชนิดต่าง ๆ ที่เกษตรกรใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในกุ้ง

ปิเปตสารเติมในอาหารกุ้งความเข้มข้น 100 ppm ใน DMSO ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (0.1 มิลลิกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร) ลงในขวดทดสอบ หยดน้ำยาทดสอบ 1 M KOH/IPA 40 ไมโครลิตร (25:1) เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหยดน้ำยาทดสอบ อ่านความเข้มข้นจากการเทียบความเข้มสีกับแถบสีมาตรฐาน

หากพบผลบวกจากการทดสอบ ทำการยืนยันผลที่ได้ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer และ HPLC โดยเตรียมสารเติมดังกล่าวให้มีความเข้มข้น 100 ppm ในตัวทำละลาย DMSO จากนั้นปิเปตสารเติมปริมาณ 3 มิลลิลิตร เติม 1M KOH/IPA 120 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร หาความยาวคลื่นสูงสุด และคำนวณหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลจากสมการ Linear regression ของกราฟมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่ได้จากข้อ 3.5.2.1

นำสารเติมอีกส่วนเจือจางให้มีความเข้มข้น 5 ppm ด้วยโมบายล์เฟสแล้วทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC หาค่า Peak area และคำนวณหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลจากสมการ Linear regression ของกราฟมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลจากข้อ 3.5.4.2 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับชุดตรวจสอบ

3.5.6 การศึกษาสิ่งรบกวน ที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบ

การศึกษาสิ่งรบกวน ที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อการใช้ชุดตรวจสอบกับตัวอย่างที่ไม่มีส่วนผสมของคลอแรมเฟนิคอลแต่ให้ผลบวกในการตรวจสอบโดยหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชั่นต่าง ๆ ยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ และยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา หากพบผลบวกลวงจากการทดสอบ ทำการยืนยันผลที่ได้ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer และ HPLC

3.5.6.1 การหา False positive กับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ

หา False positive จากสารตัวอย่างที่มีหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ 20 ชนิดดังต่อไปนี้ Metanol, Ethanol, Phenol, β-napthol, Chloroform, Acetaldehyde, Acetone, Acetic acid, Ethylacetate, Ethylamine, N-butylamine, Aniline, Diethylamine, N-methylaniline, N,n-dimethylaniline, Ethylenediamine, Pyridine, Urea, Acetonitrile และ น้ำตาลทราย

ปิเปตสารตามหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ความเข้มข้น 100 ppm ใน DMSO ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (0.1 มิลลิกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร) ลงในขวดทดสอบ ในกรณีที่สารเป็นของแข็งและ

สารที่เป็นของเหลว ปิเปตปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในขวดทดสอบ เติม DMSO 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 1M KOH/IPA 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหยดน้ำยาทดสอบ ถ้าให้ผลบวกกับน้ำยาทดสอบแสดงว่า น้ำยาทดสอบเกิด False positive กับหมู่ฟังก์ชันนั้น

3.5.7.2 การหา False positive กับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ

หา False positive กับยาปฏิชีวนะที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้ง คือ ยา Florphenicol (ตัวอย่างจาก WHO), Nitrofurazone, Nitrofurantoin, Furazolidone, Furaltadone, Norfloxacin, Nalidixic acid และ Flumequine (จากบริษัท Sigma)

ปิเปตยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 100 ppm ใน DMSO ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (0.1 มิลลิกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร) ลงในขวดทดสอบ และเติม 1M KOH/IPA 40 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหยดน้ำยาทดสอบ ถ้าให้ผลบวกกับน้ำยาทดสอบแสดงว่า น้ำยาทดสอบเกิด False positive กับยาปฏิชีวนะนั้น

3.5.7.3 การหา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

หา False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด 10 ยี่ห้อ ได้แก่ Bleed R, Fungus, Spot W, Super Ich, Rot stop, Nalixin, General aid, Yellow liquid, SC และ มาลาไคท์ กรีน เอฟ ดังรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.2 แสดงยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาชนิดต่าง ๆ

ปิเปตยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาชนิดละ 20 ไมโครลิตร ลงในขวดทดสอบ เติม DMSO 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติม 1M KOH/IPA 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหยดน้ำยาทดสอบ ถ้าให้ผลบวกกับน้ำยาทดสอบแสดงว่า น้ำยาทดสอบเกิด False positive กับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลานั้น

3.5.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีคัลเลอลิเมตริกที่มีในปัจจุบัน

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีคัลเลอลิเมตริกที่มีการคิดค้นเพื่อตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยตรงโดยเลือกวิธีทดสอบเพื่อทำการศึกษา 3 วิธี คือ วิธีตามตำหรับยาของสหราชอณาจักร วิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol และ ชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยในปัจจุบัน เปรียบเทียบ ลักษณะการใช้ และคุณภาพของชุดตรวจสอบในด้านความแม่นยำ ความไว ความสะดวกของวิธีทดสอบ ความคงทน และความเป็นอันตรายของน้ำยาทดสอบ

3.5.7.1 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีตามตำหรับยาของสหราชอณาจักร (British Phamacopoeia)

ชั่งคลอแรมฟีนิคอล 10 มิลลิกรัม ในหลอดทดลองที่ 1 ละลายใน Ethanol 50% (v/v) 1 มิลลิลิตร แ ละ ปี เปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน E thanol 50% (v/v) ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1 และ 0.1 ppm ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 2-6

เติมสารละลาย Calcium chloride 1% (w/v) 3 มิลลิลิตร และ Zinc powder 50 มิลลิกรัม นำไปให้ความร้อนบน water bath เป็นเวลา 10 นาที กรองเอา filtrate ทิ้งไว้ให้เย็น เติม 0.1 มิลลิลิตร ของ Benzoyl chloride แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Iron(III)chloride เติม 2 มิลลิลิตร ของ Chloroform เขย่า สังเกตสีและการเปลี่ยนแปลง สารที่เป็นคลอแรมเฟนิคอลจะได้ชั้นของเหลวใสสีม่วงแดงถึงแดง เทียบความเข้มสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Visual test) หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นได้ทำ Blank เปรียบเทียบ (British Phamacopoeia, 1998)

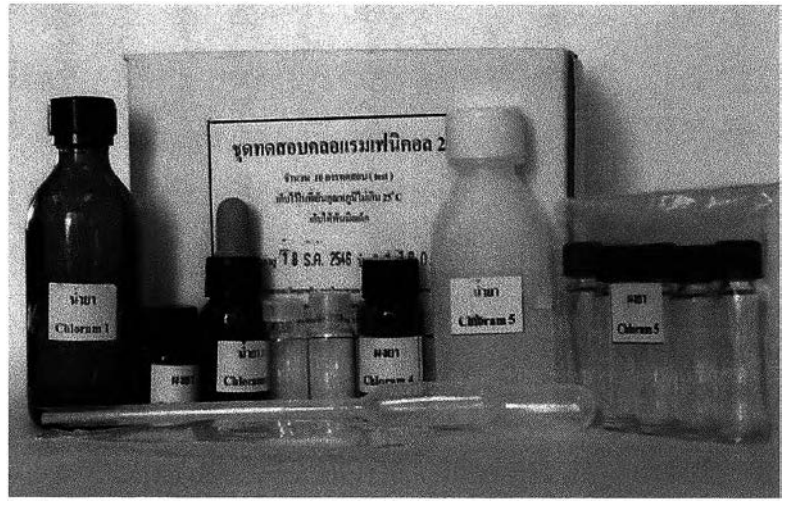
3.5.7.2 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีโดยวิธีทำให้เกิดสีกับ Alphanapthol

เตรียมสารละลาย Alphanapthol ใหม่ ๆ ก่อนใช้ โดยละลาย Alphanapthol 0.02 กรัม ในเมทานอลจำนวนเล็กน้อย แล้วเติม 6 M NaOH 10 มิลลิลิตร

ชั่งคลอแรมฟีนิคอล 10 มิลลิกรัม ในหลอดทดลองที่ 1 ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร และ ปีเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลในเมทานอล ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1 และ 0.1 ppm ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 2-6

เติม 12 M NaOH 1 มิลลิลิตร และสารละลาย Alphanapthol 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำหลอดทดลองไปไว้ในหม้อน้ำเดือดนาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องภายใน 5 นาที โดยระบายความร้อนด้วย ice bath เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สังเกตสีและการเปลี่ยนแปลง สารที่เป็นคลอแรมเฟนิคอลจะได้สารละลายสีน้ำเงิน มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 610 นาโนเมตร เทียบความเข้มสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Visual test) หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นได้ทำ Blank เปรียบเทียบ (Masterson,1968)

3.5.7.3 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยชุดทดสอบคลอแรมเฟนิคอลของกรมวิทยาศาสตร์การ แพทย์



รูปที่ 3.3 แสดงชุดทดสอบคลอแรมเฟนิคอลกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ประกอบด้วยอุปกรณ์และน้ำยาทดสอบคือ

1. ขวดแก้วทดสอบ 10 ขวด
2. หลอดพลาสติกสำหรับตัวอย่างและผงยา หลอดดูดขนาด 3 มิลลิลิตร 2 อัน
3. น้ำยา Chloram 1 1 ขวด
4. ผงยา Chloram 2 1 ขวด
5. น้ำยา Chloram 3 1 ขวด
6. ผงยา Chloram 4 1 ขวด
7. น้ำยา Chloram 5 1 ขวด
8. ผงยา Chloram 5 10 ขวด

การเตรียมน้ำยาผสม Chloram 5 ให้เตรียมก่อนเริ่มทำการทดสอบ โดยเติมน้ำยา Chloram 5 จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงในขวดผงยา Chloram 5 จำนวน 1 ขวด ต่อการทดสอบ 1 ครั้ง เขย่าให้ละลาย

วิธีการทดสอบโดยชั่งคลอแรมฟีนิคอล 10 มิลลิกรัม และ ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลใน Ethanol 50% (v/v) ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1 และ 0.1 ppm ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วทดสอบ

-เติมน้ำยา Chloram 1 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดเขย่าให้ละลาย แบ่งน้ำยาครึ่งหนึ่งใส่ขวดแก้วทดสอบอีกขวดหนึ่งให้เป็น ขวดที่1

-น้ำยาที่เหลือเติมผงยา Chloram 2 ขนาดเท่าปลายหลอดพลาสติก เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

-เมื่อครบเวลารินส่วนใสลงในหลอดทดสอบเปล่าเขียนแจ้ง ขวดที่ 2

-เติมน้ำยา Chloram 3 จำนวน 2 หยด ลงในขวดที่ 1 และ 2 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

-เติมผงยา Chloram 4 ขนาดเท่าปลายหลอดพลาสติก ลงในขวดทดสอบแต่ละขวด (ขวดที่ 1 และ 2) เขย่าให้ละลาย

-เติมน้ำยาผสม Chloram 5 ในขวดทั้งสอง ขวดละ1 มิลลิลิตร สังเกตสีและตะกอนที่เกิดขึ้น

ถ้าตัวอย่างเป็นคลอแรมเฟนิคอลหรือมีคลอแรมเฟนิคอลผสมอยู่ จะแสดงผลคือ ขวดที่ 1 ได้สารละลายสีเหลือง ขวดที่ 2 มีตะกอนสีส้มถึงแดง ด้านความไวของชุดทดสอบระดับต่ำสุดที่คู่มือระบุว่าตรวจได้คือ 100 ไมโครกรัม เทียบความเข้มสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Visual test) หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นได้ทำBlank เปรียบเทียบ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2545)