สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม วิทยานิพนธ์ งานวิจัย
ปท.122134
M 120605

การหาปริมาณยาปฏิชีวนะนอร์ฟลอคซาซินที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และปุ๋ยที่ทำจากมูลสัตว์

Determination of Residual Norfloxacin Antibiotics in Animal Products and Organic Feritilizer produce from Manure

ปนัดดา แทนสุโพธิ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY
สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
รับที่ 15 พ.ค. 2560
วันลงทะเบียน
เลขทะเบียน 249795
เลขเรียกหนังสือ วจ. 571.96 ป156ก 2560

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

พ.ศ. 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2558)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลงตามวัตถุประสงค์เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนในด้านต่างๆ จากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาลัยราชภัฏมหาสารคาม ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย และทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2558 จึงทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ สนับสนุนและคอยให้ความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

คุณค่าและเกียรติภูมิใดอันพึงมีในรายงานวิจัยฉบับนี้ ผู้จัดทำขอมอบเป็นกตเวทิตาคุณแก่บิดามารดาและบูรพาจารย์ทุกท่าน

ปนัดดา แทนสุโพธิ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ชื่อเรื่อง การหาปริมาณยาปฏิชีวนะนอร์ฟลอคซาซินที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และปุ๋ยที่ทำจากมูลสัตว์

ผู้วิจัย ดร.ปนัดดา แทนสุโพธิ์

โปรแกรมวิชา/คณะ เคมี/วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ปีที่พิมพ์ 2560

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการตรวจหายาปฏิชีวนะนอร์ฟลอคซาซินที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ เนื้อหมู และปุ๋ยที่ทำจากมูลสัตว์อย่างง่าย โดยมีขั้นการเตรียมตัวอย่างดังนี้ สกัดตัวอย่างด้วยกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 5.0×10^{-3} $mol.L^{-1}$ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง และกรอง จากนั้นนำมาเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟต ก่อนที่จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี วิสิเบิล สเปกโทรโฟโทเมทรี ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยการเติมสารละลายมาตรฐานนอร์ฟลอคซาซินลงในเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 50 $\mu g.L^{-1}$. ได้ค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 6 $\mu g.L^{-1}$ ค่าความเที่ยงหาจากค่าการเบี่ยงเบนสัมพัทธ์มีค่าอยู่ในช่วง 2 ถึง 14% และได้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 91.7 สำหรับตัวอย่างเนื้อไก่

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Research Title	Determination of Residual Norfloxacin Antibiotics in Animal Products and Organic Feritilizer produce from Manure
Researcher	Dr.Panadda Tansupo
Department/Faculty	Chemistry/Science and Technology
University	Rajabhat Mahasarakham University
Year	2017

ABSTRACT

The development of a simple method for residue monitoring of norfloxacin in chicken meat and pork samples is described. The principal sample preparation steps involved extraction with 5.0×10^{-3} mol.L^{-1} nitric acid, centrifugation and filtration. After that the extracted samples were complexed with ferrous sulphate before analysis by uv-visible spectrophotometry. The validation was performed with a fortified chicken meat sample at level of 50 μg.L^{-1}. The limit of quantitation for norfloxacin was 6 μg.L^{-1}. Precision in terms of repeatability standard deviation ranged from 2 to 14%. The mean recovery values were 91.7% for chicken meat samples.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ

หัวเรื่อง **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย..... 2
1.3 สมมติฐานการวิจัย..... 2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย..... 2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)..... 3
2.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่มควิโนโลน (Quinolones) 4
2.3 ยาปฏิชีวนะนอร์ฟล็อกซาซิน (Norfloxacin) 4
2.4 การนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในการรักษาสัตว์..... 5
2.5 การปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะ..... 6
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
2.6.1 งานวิจัยภายในประเทศ..... 7
2.6.2 งานวิจัยต่างประเทศ..... 9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 12
3.1 เครื่องมือ 12
3.2 อุปกรณ์ 12
3.3 สารเคมี 12
3.4 ลักษณะและรายละเอียดต่างๆ ของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลอง..... 13
3.5 ขั้นตอนการวิจัย..... 13

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

หัวเรื่อง **หน้า**

3.5.1 การเก็บตัวอย่าง 13
3.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารละลายนอร์ฟล็อกซาซินเพื่อใช้..... 13
สร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)
3.5.3 การเตรียมตัวอย่างและวิธีการสกัด 14
3.5.4 การหาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน..... 14
3.5.5 การศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Method validation) 14
บทที่ 4 ผลการวิจัย 16
4.1 การศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Method validation)
4.1.1 กราฟมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน(Norfloxacin) และความเป็นเส้นตรง 16
4.1.2 ความเที่ยง (Precision)..... 17
4.1.3 ความแม่นยำ (Accuracy)..... 18
4.1.4 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detection, LOD) และ 19
ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (Limit of Quantification, LOQ)
4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินในตัวอย่าง..... 20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ..... 22
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 22
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 23
บรรณานุกรม..... 24
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ..... 26
ประวัติผู้วิจัย... 30

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้พบได้ในเนื้อสัตว์	6
3.1	วัสดุและสารเคมี	12
3.2	ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	13
4.1	ช่วงการใช้งานที่เป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สารนอร์ฟล็อกซาซิน	17
4.2	ผลการศึกษาความเที่ยง (Precision) ในการวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซิน (Norfloxacin)	17
4.3	ผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ในการวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซิน	18
4.4	ค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ)	19
4.5	ปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินที่ตรวจพบในตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู ปุ๋ยมูลไก่ และ ปุ๋ยมูลสุกร (n=3)	20

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของนอร์ฟล็อกซาซิน.	5
4.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายนอร์ฟล็อกซาซิน	16

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

การเลี้ยงสัตว์ถือได้ว่าเป็นอาชีพที่ได้รับความนิยม ลำดับต้นๆของประเทศไทย โดยเกษตรกรได้มีการปรับเปลี่ยนและพัฒนาจากการเลี้ยงเพื่อยังชีพ มาเป็นการเลี้ยงแบบอุตสาหกรรม ซึ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตให้ได้สูงสุดในพื้นที่ที่มีอยู่อย่างจำกัด จึงทำให้เกิดโรคระบาดในฟาร์มได้ง่าย เช่น การติดเชื้ออีโคไลในสุกร ไก่ และโค จึงต้องป้องกันและรักษาโรคเหล่านี้โดยการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากโรคติดเชื้อมีการแพร่ระบาดบ่อยครั้งในปัจจุบัน ทำให้ยาปฏิชีวนะเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย

ยากลุ่มควิโนโลน (quinolone) เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ โดยเฉพาะยาenrofloxacinซึ่งจัดว่าเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนที่มีการใช้อย่างกว้างขวาง ในปัจจุบันพบว่ามีการปนเปื้อนจากยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์และปุ๋ยที่ผลิตจากมูลสัตว์โดยทั่วไป ซึ่งมักเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการผลิตสัตว์ในปริมาณสูงเพื่อรักษาสัตว์ป่วย หรือใช้ในปริมาณต่ำในอาหารสัตว์เพื่อป้องกันหรือลดโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ การปรับปรุงประสิทธิภาพของอาหารสัตว์และการเจริญเติบโตของสัตว์ซึ่งจะเป็นการช่วยลด ต้นทุนในการผลิต แต่พบว่าหลังการใช้ยาจะเกิดการตกค้างของสารเมแทบอไลต์ในตัวสัตว์ ซึ่งมีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ที่บริโภคเนื้อสัตว์ซึ่งมีสารตกค้างดังกล่าว โดยทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาขึ้นในร่างกายของมนุษย์ หรือทำให้เกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะในร่างกาย ซึ่งอาจทำให้เกิดอาการแพ้ในผู้ที่แพ้ยาชนิดนี้ได้ ดังนั้น จึงได้มีการกำหนดชนิดและปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้ในอาหารสัตว์และได้กำหนดช่วงเวลาระหว่างการให้ยาสัตว์กับการฆ่า ซึ่งต้องนานพอที่จะทำให้ยาปฏิชีวนะถูกขับออกไปจากร่ายกายสัตว์ได้หมด นอกจากจะมีการตกค้างในเนื้อสัตว์แล้ว โดยทั่วไปเมื่อสัตว์ได้รับยาเข้าสู่ร่างกาย ยาบางส่วนก็จะถูกขับออกมากับสิ่งขับถ่าย ในปัจจุบันจะเห็นได้ว่าภาครัฐได้ส่งเสริมให้มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี แต่หากมีการนำเอามูลสัตว์เหล่านี้ไปผลิตปุ๋ยอินทรีย์และใช้กันอย่างแพร่หลาย ก็อาจจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อมได้

จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น การตรวจหายาปฏิชีวนะที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์จึงเป็นสิ่งจำเป็น และนอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์เป็นตัวอย่างที่มี matrix มากซึ่งจะรบกวนการวิเคราะห์ได้ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงจะทำการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และวิธีการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะชนิดนอร์ฟลอคซาซิน

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อหาวิธีการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะนอร์ฟลอคซาซิน

1.2.2 เพื่อหาปริมาณยานอร์ฟลอคซาซินที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตจากมูลสัตว์

1.2.3 เพื่อยืนยันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตจากมูลสัตว์

1.3 สมมติฐานการวิจัย

เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทตรี สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟลอค-ซาซินในเนื้อสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์ได้อย่างประสบผลสำเร็จ โดยพิจารณาเกณฑ์การยอมรับ ความถูกต้อง และความแม่นยำ ตามมาตรฐานอาหารและยา

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตจากมูลสัตว์ ในเขตจังหวัดมหาสารคาม

1.4.2 ศึกษาเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

1.4.3 นำวิธีที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้นมาตรวจหาปริมาณยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนในตัวอย่างสังเคราะห์และตัวอย่างจริง โดยจะใช้ยานอร์ฟลอคซาซิน (Norfloxacin) เป็นตัวแทนของกลุ่ม

1.4.4 ประเมินผลการวิเคราะห์เทียบกับค่ามาตรฐาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้วิธีการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนอย่างง่าย

1.5.2 ทราบข้อมูลปริมาณยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตจากมูลสัตว์ ที่ทำการสุ่มตัวอย่างในเขตจังหวัดมหาสารคาม

1.5.3 ได้ข้อมูลที่ช่วยให้สามารถประเมินความเสี่ยงของผลกระทบจากการตกค้างของยาปฏิชีวนะ และได้ข้อมูลยืนยันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตจากมูลสัตว์

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การหาปริมาณสารตกค้างของยาปฏิชีวนะนอร์ฟล็อกซาซินในเนื้อไก่ เนื้อหมู ขี้ไก่และ ขี้หมู ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)

ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) หรือยาต้านจุลชีพ หมายถึง ยาที่ผลิตมาจากสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อ ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามคุณสมบัติของยาในการกำจัดเชื้อแต่ละชนิด เช่น ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ยาต้านไวรัส ยาต้านเชื้อรา ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียทั้งในคนและในสัตว์ แต่พบว่ามีการนำยาปฏิชีวนะไปผสมในอาหารสัตว์ เพื่อกระตุ้นการเติบโตในสัตว์สำหรับบริโภค หากยาปฏิชีวนะเข้าไปในร่างกายของสัตว์ติดต่อเป็นประจำอาจเกิดการสะสมและตกค้างอยู่ในตัวสัตว์เมื่อนำสัตว์ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ สารตกค้างจากยาปฏิชีวนะบางกลุ่มเป็นอันตรายอย่างมากต่อผู้บริโภคที่บริโภคเนื้อสัตว์ดังกล่าว ดังนั้น จึงมีการประกาศห้ามใช้ ยาปฏิชีวนะบางกลุ่มในสัตว์ที่จะนำมาเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อการบริโภคของมนุษย์ โดยสหภาพยุโรป (European Union, EU) ได้ออกกฎหมายห้ามใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 เป็นต้นมา และห้ามให้มีการนำเข้าผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีการตกค้าง ของสารปฏิชีวนะบางชนิด) ในปัจจุบันได้มีการประกาศห้ามใช้ในหลายๆ ประเทศ รวมถึงประเทศไทยด้วย ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด อาทิเช่น นอร์ฟลอคซาซิน (norfloxacin) เพนนิซิลิน (penicillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporins) เตตราไซคลิน (tetracyclines) ออกโซลินิค (oxolinic acid) คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicols) แมคโครไลด์ (macrolides) สเปคติโนมัยซิน (spectinomycin) ลินโคซามายด์ (lincosamides) ซัลโฟนามายด์ (sulphonamides) ไนโตรอิมิดาโซล (nitroimidazoles) ไตรเมทโตรพริม (trimethoprim) พอลิมัยซิน (polymycins) ควิโนโลน (quinolones)

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่มควิโนโลน (quinolones)

ยากลุ่ม quinolones หรือปัจจุบันมักเรียกว่า fluoroquinolones เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น โดยพัฒนาโครงสร้างมาจาก nalidixic acid ซึ่งเป็นยาชนิดแรกในกลุ่มนี้ โดยการเพิ่มฟลูออไรด์และเพิ่ม piperazine ring เข้าไปในสูตรโครงสร้าง ทำให้ประสิทธิภาพของยากลุ่ม quinolones สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้กว้างขึ้น โดยยากลุ่มนี้สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและลบแต่ใช้ได้ผลดีในการรักษาการติดเชื้อแกรมลบ นอกจากนี้การเพิ่ม piperazine ring ทำให้สามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียที่ผลิต toxin เช่น *Pseudomonas* และ Vibrio ได้ดีขึ้น

โดยทั่วไปใช้ในการรักษาการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและอุจจาระร่วง ยากลุ่มนี้ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและแบ่งตัว จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriostatics) ยากลุ่มนี้ได้แก่ ofloxacin norfloxacin enrofloxacin danofloxacin ciprofloxacin และ pefloxacin

การแบ่งกลุ่ม quinolones มีหลายแบบ ในที่จะแบ่งตาม American Association of Family Physicians (AAFP) ออกเป็นกลุ่มตามการฆ่าเชื้อ ดังนี้

(1) Frist generation agent: ยากลุ่มนี้ในปัจจุบันมีการใช้รักษาโรคน้อยมาก เนื่องจากมีฤทธิ์แคบกับเชื้อแกรมลบไม่กี่ชนิด รวมทั้งมีการกระจายตัวเข้าไปในร่างกายไม่ดีนัก ได้แก่ nalidixic acid และ cinoxacin

(2) Second generation agent: ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์กว้างขึ้นกับเชื้อแกรมลบและใช้ได้กับ atypical pathogen แต่ต้านแกรมบวกไม่ดีมากนัก ยาในกลุ่มนี้ใช้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการออกซิเจน(aerobic gram-negatibe bacilli) ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ lomefloxacin norfloxacin ofloxacin pefloxacin และ ciprofloxacin ถือว่ามีฤทธิ์ต่อ *Pseudomonas aeruginosa* ดีที่สุด

(3) Third generation agent: ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์กว้างทั้งแกรมบวกและแกรมลบและใช้ได้ดีกับ atypical intercellular pathogen และมีฤทธิ์ต้านแกรมบวกได้ดีขึ้น ได้แก่ levofloxacin sparfloxacin gatifloxacin และ moxifloxacin

(4) Fourth generation agent: ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์มากขึ้นกับเชื้อแกรมบวกและยังคงมีฤทธิ์กว้างกับเชื้อแกรมลบและมีฤทธิ์ต้านเชื้อ anaerobes บางชนิดด้วย ได้แก่ ยา Travafloxacin (ฉัตรชัย, 2552)

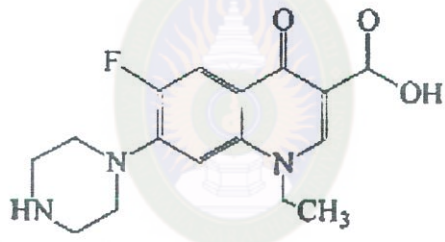
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3 ยาปฏิชีวนะนอร์ฟลอคซาซิน

นอร์ฟลอคซาซินซึ่งอยู่ในกลุ่ม quinolones มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ละลายน้ำได้น้อย โดยจะไม่ละลายในสารละลายที่มีความเป็นเบส แต่สามารถละลายได้ดีในสารละลายที่มีความเป็นกรด มีคุณสมบัติเป็น amphoteric อยู่ในสภาพที่ไม่แตกตัวเป็นไอออนที่ pH ของเลือดและน้ำเลี้ยงเซลล์แต่จะแตกตัวเป็นไอออนที่ pH ต่างๆ นอร์ฟลอคซาซินมีจุดหลอมเหลวที่ 227-228 °C ตกผลึกด้วยเมธีลีนคลอไรด์ (methylene chloride) สามารถดูดความชื้นได้ดีในอากาศ มีการสังเคราะห์ นอร์ฟลอคซาซิน ขึ้นครั้งแรกในปี 1980 ยานอร์ฟลอคซาซินมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพอย่างกว้างขวาง สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีพได้เกือบทั้งหมดและมีผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีพบางชนิด เช่น *Clostridium* รวมทั้ง *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียแกรม

บวก เช่น *Steplrylococcus* และ *Streptococcus* นอกจากนี้ยังรวมไปถึง *Mycoplasma* ยานอร์ฟลอคซาซินจัดอยู่ในกลุ่ม fluoroquinolone ที่มีโครงสร้างและการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียคล้ายคลึงกับ nalidixic acid และ oxolinic acid แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้สูงกว่านอร์ฟลอคซาซินเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยถือได้ว่า ยานอร์ฟลอคซาซิน เป็นตัวยาแรกๆ ในกลุ่ม fluoroquinolone ที่นำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำ ซึ่งปัจจุบัน norfloxacin ก็ยังเป็นที่นิยมใช้กันอยู่ทั้งในการป้องกันและรักษาโรคกุ้ง ปลา ตะพาบน้ำ และยังใช้ในการรักษาอาการเกี่ยวกับทางเดินปัสสาวะของสุกรและสัตว์ปีกอีกด้วย

สูตรเคมี	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$
ชื่อทางเคมี	1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-yl-quinoline-3-carboxylic acid



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ นอร์ฟล็อกซาซิน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

น้ำหนักโมเลกุล	319.33
จุดหลอมเหลว	227 – 228 °C
ชื่อการค้า / ผู้ผลิต	Lexinor
องค์ประกอบ	คาร์บอน 60.18% ไฮโดรเจน 5.68% ฟลูไอรีน 5.95% ไนโตรเจน 13.16% และออกซิเจน 15.03%

2.4 การนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในการรักษาสัตว์

ยาปฏิชีวนะเป็นสารที่ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะยังจัดเป็นยาต้านจุลชีพด้วย การขึ้นทะเบียนยาต้านจุลชีพที่เป็นยารักษาโรคในสัตว์น้ำอยู่ภายใต้การควบคุมของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข โดยมีการขึ้นทะเบียนยารักษาโรคสัตว์น้ำถูกต้องอยู่ 12 ตัวยา ซึ่งแต่ละตัวยาจะมีข้อบ่งใช้กับสัตว์น้ำที่แตกต่างกันตามชนิด ซึ่งยาที่ขึ้นทะเบียนรักษาโรคสัตว์น้ำอย่างถูกต้อง 12 ตัวยา ได้แก่ เอนโรฟล็อกซาซิน (Enrofloxacin), ซาราฟล็อกซาซิน (Sarafloxacin), ออกโซลินิก แอซิด (Oxolinic acid), ออกซีเตตร้าซัยคลิน (Oxytetracyclin), ซัลฟา

ไดเมททอกซีน-ออร์เมทโธพริม (Sulfadimethoxin-Ormethoprim), ซัลฟาไดเมท ทอกซี-ไตรเมทโธพริม (Sulfadimethoxin-Trimethoprim), ซัลฟาไดเมททอกซีน (Sulfadimethoxin), ซัลฟาโมโนเมททอกซีน (Sulfamonomethoxin), ซัลฟาไดอาซีน (Salfadiazine) ไตรเมทโธพริม (Trimethoprim), ออร์เมทโธพริม (Ormethoprim) และโทลทราซูริล (Toltrazuril)

เมื่อประมาณ กว่า 60 ปีที่แล้ว (ค.ศ. 1950) เริ่มมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการเร่งให้สัตว์เลี้ยงเติบโตเร็วขึ้นกว่าปกติ โดยผสมยาปฏิชีวนะในอาหาร น้ำ และพ่นฉีดบนลำตัว ทั้งในอุตสาหกรรมเลี้ยงปศุสัตว์ และเลี้ยงไก่ โดยเฉพาะในฟาร์มไก่เนื้อ มีข้อมูลว่า ปี 2503 ต้องใช้เวลา 63 วัน เพื่อเลี้ยงไก่ให้ได้น้ำหนัก 3.4 ปอนด์ แต่ในปี 2554 ใช้เวลาเพียง 47 วัน เพื่อเลี้ยงไก่ให้ได้น้ำหนัก 5.4 ปอนด์ ซึ่งยืนยันได้ว่ายาปฏิชีวนะ มีบทบาทสำคัญในการเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสัตว์ทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีและสารพิษในเนื้อเยื่อของสัตว์ ถึงแม้ว่าจะเป็นสิ่งที่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรืออันตรายต่อสัตว์แต่จัดเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความสนใจและเป็นกังวลว่า หากได้รับสารตกค้างต่างๆที่อยู่ในอาหารเป็นจำนวนมาก ก็อาจจะก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง เพราะเป็นโรคที่เกิดขึ้นได้จากการได้รับสารพิษที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งในระดับต่างๆเป็นจำนวนบ่อยครั้งและในระยะเวลานาน (เบญจมาศ, 2549) และในปัจจุบันประเทศที่มีการพัฒนาแล้วส่วนใหญ่ เริ่มตระหนักถึงปัญหานี้ จึงเริ่มมีมาตรการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะ ในการผสมในอาหารและน้ำในการเลี้ยงสัตว์ สำหรับในประเทศไทยปัจจุบันยังคงไม่มีมาตรการที่ชัดเจนในการที่จะช่วยลดปัญหานี้ (http://www.bpl.co.th/pweb/index.php/academic-professional, 2009)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้พบได้ในเนื้อสัตว์

ชนิดสารตกค้าง	ชนิดสัตว์	ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณสารตกค้างสูงสุด (mg/kg)
Norfloxacin	สัตว์ปีก	กล้ามเนื้อไก่	0.02
		ไขมันไก่	0.02
		ตับไก่	0.02
		ไตไก่	0.02
		เนื้อไก่	0.02

ที่มา : (World Trade Organization, 2015)

2.5 การปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะ

การปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เกิดเนื่องจากการเลี้ยงสัตว์ในฟาร์มที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งในการรักษาและการป้องกันทำให้เกิดมีการสะสมอยู่ในตัวสัตว์ ทำให้เมื่อนำมาจำหน่ายในรูปเนื้อสด หรือผลิตภัณฑ์แปรรูปจะยังคงมียาเหล่านี้ตกค้างอยู่ และสำหรับการปนเปื้อนสู่

สิ่งแวดล้อมจะเกิดโดยผ่านทางมูล และสิ่งขับถ่ายของสัตว์ และเกิดจากเมื่อมีการนำมูลสัตว์ไปผลิตปุ๋ยอินทรีย์ ก็จะทำให้เกิดการกระจายของยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น มีงานวิจัยที่พบว่ามีการเคลื่อนที่ของยาปฏิชีวนะจากดินไปสู่รากของถั่วเหลือง ในส่วนของยานอร์ฟลอคซาซินนั้นได้มีการตรวจพบในหลายแห่ง เช่น ในมูลของไก่ หมู และวัว พบว่ามีปริมาณตกค้างในมูลไก่สูงสุดถึง 225.45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และนอกจากนี้ยังมีการตรวจพบในกากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสีย และสำหรับน้ำทิ้งในระบบบำบัดน้ำทิ้งชุมชนหลายแห่งก็มีรายงานว่าพบเช่นกัน (ลลิดา, 2554)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 งานวิจัยภายในประเทศ

ในปี ค.ศ 2007 ปริญญา มาสวัสดิ์ ได้ทำการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยใช้เทคนิคโวลแทมเมตรี ที่มีไส้ดินสอเป็นขั้วไฟฟ้า จากการศึกษาด้วยวิธีไซคิวิกโวลแทมเมตรี พบว่าให้แคโทดิกเวฟที่มีกระแสสูงสุดในช่วง -0.2 ถึง -0.6 โวลต์ และในการหาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำนมตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งซึ่งใช้ฟอริซิลเป็นตัวดูดซับก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดิฟเฟอร์เรสเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี พบว่าวิธีดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.5-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และร้อยละการได้กลับคืนของเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเซตราซัยคลิน และดอกซีซัยคลิน เท่ากับ 104 103 105 และ 102 ตามลำดับ และค่าต่ำสุดของการตรวจวัด คือ 0.26 0.29 0.30 และ 0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งถือว่าการสกัดอยู่ในช่วงเชื่อถือได้

ในปี ค.ศ 2012 พวงทอง พวงแก้ว ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณโคลิสตินซัลเฟตในอาหารสัตว์โดยเทคนิคลิคควิดโครมาโตกราฟฟีประสิทธิภาพสูง งานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลิสตินซัลเฟต ให้มีความถูกต้องและแม่นยำ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่าวิธีวิเคราะห์นี้ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสัญญาณกับความเข้มข้นในช่วง 25-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.998 ร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 99.98-115.25 เปอร์เซ็นต์ และ %RSD ต่ำกว่า 7.90 เปอร์เซ็นต์ ขีดต่ำสุดของการตรวจพบ (LOD) และขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 9.46 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 13.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณโคลิสตินซัลเฟส ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพการผลิตยาและอาหารสัตว์

ในปี ค.ศ 2012 สีใส ปารมี และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซินในเภสัชภัณฑ์โดยวิธีสเปคโทรโฟโทเมตริกอย่างง่าย ทำการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างยา เฟอร์รัสซัลเฟตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อัตราส่วน 2.0:1.0:0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และตรวจวัดที่ความความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้เทคนิคยูนิวาริเอดซ์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมจะได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีสมการเส้นตรง $y = 0.0041x + 0.0026$ เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมาของนอร์ฟล็อกซาซินพบที่ความเข้มข้น 12.50 และ 22.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ในช่วง 99.48-100.97 เปอร์เซ็นต์ วิธีนี้สามารถที่จะใช้ในการวิเคราะห์ยานอร์ฟล็อกซาซินได้ ซึ่งข้อดีประกอบไปด้วยค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี มีค่าความถูกต้อง และความแม่นยำที่เหมาะสม และน่าจะสามารถพัฒนาวิธีนี้ในการวิเคราะห์หายาในกลุ่มฟลออโรควิโนโลนของยาตัวอื่นๆ ได้ต่อไป

ในปี ค.ศ. 2014 อุมาพร และคณะ ยากลุ่มไนโตรฟูแรน (nitrofurans) เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ แต่พบว่าหลังการใช้ยาจะเกิดการตกค้างของสารเมแทบอไลต์ในตัวสัตว์ ซึ่งมีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ที่บริโภคเนื้อสัตว์ซึ่งมีสารตกค้างดังกล่าว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสารตกค้างเหล่านี้ด้วยวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี เช่น liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น วิธีทางชีวภาพ เช่น การทดสอบทางจุลชีววิทยา (microbiology test) วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) โดยใช้หลักการของเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของผู้ใช้งาน ทั้งนี้ ELISA มีความเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากเพราะสามารถตรวจวัดสารได้อย่างจำเพาะ ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ และสามารถตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างได้ครั้งละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ในขณะที่วิธีทางเคมีมีความเหมาะสมในการตรวจผลยืนยันในตัวอย่างที่ต้องสงสัยหลังจากการตรวจคัดกรอง

ในปี ค.ศ. 2015 จิราภา อุณหเลขกะ และคณะ ได้ทำการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยาตกค้างกลุ่มควิโนโลน จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ดาโนฟล็อกซาซิน ดิฟล็อกซาซิน เอ็นโรฟล็อกซาซิน ซาราฟล็อกซาซิน ฟลูไมควีน และกรดออคโอลินิค ในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค HPLC-FLD วิธีดังกล่าวมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง อยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.95 มีความแม่น แสดงด้วยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมา และความเที่ยง แสดงด้วยค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้น 10 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในช่วง 65.1-97.8 เปอร์เซ็นต์ และ 0.3-0.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในเนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อวัวจำนวนทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง พบว่าพบว่ามีเนื้อไก่ 1 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบกรดโอโซลินิกปริมาณ 29.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และอีก 2 ตัวอย่าง พบเอนโรฟล็อกซาซิน ปริมาณ 16.1 และ 16.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ยากลุ่มควิโนโลนได้ 6 ชนิด ได้แก่ กรดออคโอลินิค ฟลูมีควีน เดโนฟล็อกซาซิน เอนโรฟล็อกซาซิน ซาราฟล็อกซาซิน และ ดิฟล็อกซาซิน เป็นวิธีที่มีสมรรถนะผ่านเกณฑ์การยอมรับของการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว ตามระบบคุณภาพของ ISO/IEC17025:2005 จึงสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคได้

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ในปี ค.ศ. 2015 มาลี เจริญวิทย์วรกุล ได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และผลการสำรวจปริมาณสารไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ในเนื้อสัตว์ โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS และสกัดแยกสารด้วยการสกัดด้วยของเหลว ผลการทดลองพบว่า ช่วงการวิเคราะห์ที่ 0.1-2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้เป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ระหว่าง 0.9860 - 1.0000 ความแม่นของวิธีแสดงด้วยเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมาอยู่ในช่วง 88.9-112.0 เปอร์เซ็นต์ ความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ประเมินโดย HORRAT ค่า <2 ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) 0.05 - 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าต่ำสุดที่ตรวจปริมาณได้ (LOQ) 0.1 - 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ตกค้างในเนื้อสัตว์ด้วย LC-MS/MS มีความจำเพาะให้ผลการตรวจที่แม่นยำถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยมีความไวในการวัดที่ดี มีประสิทธิภาพ

2.6.2 งานวิจัยต่างประเทศ

ในปี ค.ศ. 2002 Lim และคณะ ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณของนอร์ฟล็อกซาซินในเนื้อเยื่อสัตว์ปีก ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟี-แมสสเปกโทรสโกปี (LC-MS) ที่ได้รับการพัฒนาและตรวจสอบ สารสกัดตัวอย่างถูกแยกออกจากกันบนคอลัมน์ C_{18} แบบ reversed-phase และถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟี-แมสสเปกโทรสโกปี (LC-MS) แบบ gradiently เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย กรดอะซิติกต่ออะซิโตนไนไตรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เท่ากับ 1 และ 5 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ค่าการได้กลับคืนจากการ spike เท่ากับ 87.2 เปอร์เซ็นต์ (ตั้งแต่ 82.5 - 92.7) เปอร์เซ็นต์เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาประสบผลสำเร็จสำหรับการหาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินในกล้ามเนื้อสัตว์ปีก

ในปี ค.ศ. 2004 Shen และคณะ ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณฟลูออโรควิโนโลนนอร์ฟล็อกซาซิน และโอฟล็อกซาซินจากกล้ามเนื้ออกไก่ที่ได้รับการรักษา ด้วยเทคนิคการสกัดแบบซุปเปอร์คริทิคอลฟลูอิค และถูกตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลว ซึ่งใช้ฟูออเรสเซ็นต์เป็นตัวตรวจวัด พบว่าค่าการได้กลับคืนสำหรับการสกัดของฟูออโรควิโนโลน โดยใช้เทคนิคอยู่ในช่วง 70 – 87 เปอร์เซ็นต์ ไก่ที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะฟูออโรควิโนโลน แต่ละชนิด และกล้ามเนื้อที่ถูกสกัดในช่วงเวลาที่กำหนด สำหรับเวลาที่แน่นอนในการหาปริมาณของฟูออโรควิโนโลนในกลุ่มตัวอย่างไก่ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการสกัดแบบซุปเปอร์คริทิคอลฟลูอิค กับเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของฟลูออโรควิโนโลนค่อยๆ ลดลง ส่วนเวลาในกล้ามเนื้อไก่ที่ได้รับการรักษาในช่องปากต้องให้มีความเข้มข้นน้อยกว่า 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 120 ชั่วโมง ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า วิธีการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดแบบซุปเปอร์คริทิคอลฟลูอิค เป็นวิธีการสกัดสำหรับการหาปริมาณของนอร์ฟล็อกซาซิน และโอฟล็อกซาซินในกล้ามเนื้อไก่

ในปี ค.ศ. 2005 Kassab และคณะ ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณของซิโปรฟล็อกซาซิน และนอร์ฟล็อกซาซินในการเตรียมยา ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อพัฒนา และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณซิโปรฟล็อกซาซินและนอร์ฟล็อกซาซินในการเตรียมยา ยาปฏิชีวนะกลุ่มควิโนโลนที่ถูกนำมาวิเคราะห์ โดย

ใช้คอลัมน์ LiChrospher® 100 RP-18 (5 ไมโคเมตร 125 x 4 มิลลิเมตร) และเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำต่ออะซิโตรไนไตรต่อไตรเอทิลเอไมด์ 80 : 20 : 0.3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร ค่าพีเอช ของส่วนผสมสุดท้ายจะถูกปรับเป็น 3.3 ด้วยกรดฟอสฟอริก อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัด UV ที่ความยาวคลื่น 279 นาโนเมตร การวิเคราะห์ถูกดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (24 ± 2 องศาเซลเซียส) CIP และ NOR จะถูกชะภายใน 5 นาที กราฟมาตรฐานเส้นตรง (R = 0.9999) ในช่วงความเข้มข้น 4.0 – 24.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (RSD) มีค่าน้อยกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นการได้กลับคืน เท่ากับ 101.85 เปอร์เซ็นต์

ในปี ค.ศ. 2006 Schulte และคณะ ได้พัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์ยาในกลุ่มควิโนโลนโดยใช้เทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนต์ โดยได้สกัดตัวอย่างเลือดด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลว ซึ่งพบว่ามีค่าการเป็นเส้นตรงสำหรับยา levofloxacin และ moxifloxacin ในช่วง 0.1-15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.2-7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังได้นำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาระดับของความเข้มข้นของยาในน้ำเลือดของอาสาสมัครหลังจากที่มีการรับประทานยาเพียง 1 ครั้ง

ในปี ค.ศ. 2007 Si-Jun และคณะ ได้ทำการศึกษาวิธีการตรวจสอบสารพิษตกค้าง ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาสำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มควิโนโลน 7 ชนิด ซิโปรฟล็อกซาซิน ดาโนฟล็อกซาซิน เอนโรฟล็อกซาซิน ซาราฟล็อกซาซิน ไดฟล็อกซาซิน กรดออคโอลินิค และฟลูมีคลีนในเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อสัตว์ ด้วยเทคนิค HPLC-FLD การวิเคราะห์จะถูกแยกโดยใช้สารละลายกรดฟลอมิคกับอะซิโตนไนไตรเป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้โปรแกรม gradient และถูกกำหนดด้วยการตั้งโปรแกรมให้ฟลูออเรสเซ็นต์เป็นตัวตรวจวัด ช่วงความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 0.3 – 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มากว่า 0.9989 ขีดต่ำสุดของการตรวจวัด เท่ากับ 0.1 – 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดต่ำสุดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.3 – 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยการได้กลับคืนของแต่ละการวิเคราะห์ในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่และหมู อยู่ในช่วง 70.4 เปอร์เซ็นต์ - 105.8 เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำกว่า 9.3 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเข้มข้น 1 – 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการศึกษาพบว่าเป็นวิธีนี้มีความเหมาะสม รวดเร็ว ปลอดภัย มีความไวและความแม่นยำ สำหรับการหาปริมาณสารตกค้างกลุ่มควิโนโลนในตัวอย่างจริง

ในปี ค.ศ. 2007 Lee และคณะ ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณของโอฟล็อกซาซิน นอร์ฟล็อกซาซิน และซิโปรฟล็อกซาซินในตัวอย่างน้ำเสีย ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง และเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลว โดยมีตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซ็นต์ซึ่งพบว่าค่าการได้กลับคืนของฟลูออโรควิโนโลนในตัวอย่างที่ถูก spike อยู่ระหว่าง 87-94 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัมจากผลการวิจัยพบว่าฟลูออโรควิโนโลนรวมถึง โอฟล็อกซาซิน นอร์ฟล็อกซาซิน และซิโปรฟลอกซาซิน ที่ถูกตรวจสอบในตัวอย่างน้ำเสีย มีความเข้มข้นเฉลี่ยระหว่าง 34 และ 251 นาโนกรัม

ในปี ค.ศ. 2007 Cheng และคณะ ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณของนอร์ฟล็อกซาซินในตับหนู ด้วยเทคนิคคาปิลารี่อิเล็กโทรโฟไรซีส โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเลเซอร์เป็นตัวตรวจวัด

การตรวจสอบ กราฟมาตรฐานเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เท่ากับ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ทำการวิเคราะห์ภายในหนึ่งวัน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ทำการวิเคราะห์ระหว่างวัน มีค่าน้อยกว่า 3.7 เปอร์เซ็นต์ และความถูกต้อง เท่ากับ 93.2 เปอร์เซ็นต์ วิธีที่ถูกนำเสนอมีขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณกับความถูกต้องดี และความแม่นยำและมีความจำเพาะ สำหรับความเข้มข้นของนอร์ฟล็อกซาซินเป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้ได้อย่างสัมฤทธิ์ผล

ในปี ค.ศ. 2011 Jinqing และคณะ ได้ทำการศึกษาการปริมาณสารเคมีตกค้างของ ซาราฟล็อกซาซิน ไดฟล็อกซาซิน นอร์ฟล็อกซาซิน และปิฟล็อกซาซินโดยใช้เทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ในตัวอย่างปลาพบว่าช่วงไดนามิกของ ซาราฟล็อกซาซินในการทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ เท่ากับ 0.004 – 18 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOD และ IC_{50} เท่ากับ 0.002 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.32 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากเพิ่มประสิทธิภาพ ในทางสรีรศาสตร์ที่ค่าพีเอช 7.4 เหมาะสำหรับเทคนิค immunoassays และการทดสอบนี้สามารถทนต่ออะซิโตนไนไตรล์ 10% ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า มีปฏิกิริยาข้ามกันสูง ไดฟล็อกซาซิน 85.5 เปอร์เซ็นต์ นอร์ฟล็อกซาซิน 61.7 เปอร์เซ็นต์ และพีฟล็อกซาซิน 34.8 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้การเจือจางตัวอย่างปลา 10 เท่า สมการเส้นโค้งการถดถอยสำหรับ Sarafloxacin $y = 1.0114x - 0.4003$ $R^2 = 0.9901$ Difloxacin $y = 0.9782x + 0.2754$, $R^2 = 0.9807$ Norfloxacin $y = 0.9892x + 0.0489$, $R^2 = 0.9843$ และ Pefloxacin $y = 0.9797x + 0.8017$, $R^2 = 0.9844$ ผลการวิจัยพบว่าเทคนิค immunoassay นี้สามารถนำไปใช้สำหรับการตรวจสอบยาปฏิชีวนะกลุ่มฟูออโรควิโนโลน พร้อมกัน 4 ชนิดในตัวอย่างปลาได้

ในปี ค.ศ. 2010 Chang และคณะ ได้พัฒนาเทคนิคที่ง่าย และรวดเร็วในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนจำนวน 18 ชนิด ในผลิตภัณฑ์สัตว์ โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry สกัดสารตัวอย่างด้วยสารละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนทริล และ 1% กรดฟอร์มิค และกำจัดไขมันด้วยการสกัดด้วยเฮกเซน คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ XDB C-8 (150 mm x 4.6 mm, 5 um) โดยใช้ระบบการชะแบบเกรเดียน 20 mM ammonium formate ใน 0.1% formic acid

ในปี ค.ศ. 2012 Yun-Kai Lv และคณะ ได้ทำการศึกษาการปลูกถ่ายนอร์ฟล็อกซาซินเข้าไปในเนื้อเยื่อพอลิเมอร์บนพื้นผิวซิลิกาสำหรับการสกัดด้วยเฟสของแข็ง ของฟลูออโรควิโนโลน ในตัวอย่างปลา โดยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นการได้กลับคืนมาของ นอร์ฟล็อกซาซิน โอฟล็อกซาซินและ ซิโปรฟล็อกซาซิน มีค่าอยู่ในช่วง 89.3 - 94.8 เปอร์เซ็นต์ 69.3 - 102.8 เปอร์เซ็นต์และ 85 - 90.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่า 6.5 เปอร์เซ็นต์ ข้อจำกัดของการตรวจสอบอยู่ในช่วง 2.65 - 3.65 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ข้อจำกัดเชิงปริมาณอยู่ในช่วง 8.82-12.16 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับควบคู่กับ SPE-HPLC ที่ได้รับการยืนยันให้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยก สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณของยาตกค้างในเนื้อปลาได้อย่างรวดเร็ว

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ในปี ค.ศ. 2015 Yao และคณะ ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณของยาปฏิชีวนะกลุ่มควิโนโลน 11 ชนิด ในนมวัว โดยใช้เทคนิค immunoaffinity stir bar sorptive microextraction และโครมาโทกราฟีของเหลวใช้ฟูออเรสเซ็นต์เป็นตัวตรวจวัด เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาและตรวจสอบ ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่ถูกพัฒนามีขีดจำกัดการตรวจสอบสำหรับควิโนโลนแต่ละชนิด อยู่ในช่วง 0.05 – 0.1 นาโนกรัมต่อกรัม ความแม่นยำที่ทำการวิเคราะห์ภายในหนึ่งวัน และทำการวิเคราะห์ระหว่างวัน อยู่ในช่วง 3.2 – 11.9 เปอร์เซ็นต์ และ 5.2 – 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วิธีที่ถูกนำเสนอในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์ยากลุ่มควิโนโลนในตัวอย่างนมวัว แสดงให้เห็นถึงการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ความปลอดภัย ของอาหารสัตว์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตรเมทตรี Lamda 12

3.1.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ MSE MISTRAL 1000

3.1.3 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.2.2 บีกเกอร์

3.2.3 ปิเปตต์ขนาด 1 5 10 25 มิลลิลิตร

3.2.4 หลอดหยดสาร

3.2.5 ลูกยางดูดปิเปตต์

3.2.6 ช้อนตักสาร

3.2.7 กระดาษกรองเบอร์ 42

3.2.8 กรวยกรองสาร

3.2.9 หลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.3 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 วัสดุและสารเคมี

สารเคมี	เกรดสารเคมี	ผู้ผลิต
เฟอรัสซัลเฟต (Fe_2SO_4)	ISO-For analysis	Carlo Erba
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	ISO-For analysis	Carlo Erba
กรดไนตริก (HNO_3)	ISO-For analysis	Carlo Erba
ยานอร์ฟล็อกซาซิน	AR	Sigma Aldrich

3.4 ลักษณะและรายละเอียดต่างๆ ของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลอง

สุ่มเลือกตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลอง โดยสุ่มเลือกตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมูจากร้านค้า 3 แหล่ง ปุ๋ยมูลไก่ และปุ๋ยมูลสุกร โดยมีรายละเอียดของแต่ละตัวอย่างดังนี้

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

แหล่งที่มา	ตัวอย่าง	ตัวอย่างและแหล่งที่ซื้อ
1	A	เนื้อหมูจากร้าน A
2	B	เนื้อหมูจากร้าน B
3	C	เนื้อหมูจากร้าน C
4	D	เนื้อไก่จากร้าน A
5	E	เนื้อไก่จากร้าน B
6	F	เนื้อไก่จากร้าน C
7	X	ปุ๋ยมูลสุกร
8	Y	ปุ๋ยมูลไก่

3.5 ขั้นตอนการวิจัย

3.51 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู ปุ๋ยมูลไก่และปุ๋ยมูลสุกรโดยการซื้อจากร้านค้าตามท้องตลาด 3 แห่ง ในอำเภอเมืองมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.5.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน (Calibration Curve)

เตรียมสต็อกของสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซิน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำกราฟมาตรฐานโดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซิน ให้มีความเข้มข้น 10 20 30 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 5.0×10^{-3} โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.5.3 การเตรียมตัวอย่างและวิธีการสกัด

ชั่งตัวอย่างแต่ละชนิด (เนื้อไก่ เนื้อหมูที่บดละเอียด ปุ๋ยมูลไก่ และปุ๋ยมูลสุกร) มา 0.70 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร เติมกรดไนตริกความเข้มข้น 5.0×10^{-3} โมลต่อลิตร 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ โดยวิธีการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทตรี ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

การ fortified ตัวอย่างโดยการเติมสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำโดยชั่งตัวอย่างแต่ละชนิดมา 0.70 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร เติมสารละลายมาตรฐานนอร์ฟล็อกซาซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในที่มืด 15 นาที แล้วเติมกรดไนตริก ความเข้มข้น 5.0×10^{-3} โมลต่อลิตร 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์โดยการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนและนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตรเมทตรี (Si-Jun และคณะ, 2007)

3.5.4 การหาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน

ศึกษาวิธีการวิเคราะห์โดยวิธีการทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนโดยปิเปตตัวอย่างใส่หลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2.5×10^{-2} เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 0.15 มิลลิลิตรลงไป และเติมสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 4.0×10^{-1} โมลต่อลิตร จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีในที่มืด ซึ่งปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่าง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเฟอรัสซัลเฟตจะให้สารประกอบที่มีสีเหลือง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร (สีใส ปารมี และคณะ, 2012)

3.5.5 การศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Method validation)

(1) ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงความเข้มข้นที่ทำการวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ช่วงความเข้มข้น 10-150 ไมโครกรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับความเข้มข้น โดยให้เครื่องอ่านค่าซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเส้นระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นในหน่วยไมโครกรัมต่อลิตร แล้วคำนวณค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R^2)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(2) ความเที่ยง (Precision)

ศึกษาความเที่ยงของเครื่องที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซินที่ทราบความเข้มข้น ศึกษาความเที่ยงของเครื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่เครื่องอ่านได้ โดยให้เครื่องอ่านค่าซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, %RSD)

(3) ความแม่นยำ (Accuracy)

ศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์ของเครื่อง โดยใช้สารละลายมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซินที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์ของเครื่องได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เครื่องอ่านได้ นำมาคำนวณหาค่าร้อยละของการกลับคืน (%Recovery) ดังสมการ

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นที่อ่านได้}}{\text{ค่าความเข้มข้นจริง}} \times 100$$

(4) ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (Limit of Quantification, LOQ)

LOD คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือวัดได้ โดยปกติยอมรับกันว่าสัญญาณมากกว่า 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของการวัด blank (3σ หรือ 3SD) และ LOQ คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าสัญญาณมากกว่า 10 เท่า ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของการวัด blank ในการศึกษานี้ได้ทำการหา LOD และ LOQ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยและค่า SD แล้วนำมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ดังสมการ

$$\text{LOD} = \text{ค่าเฉลี่ยของสารละลาย blank} + 3\text{SD}$$

$$\text{LOQ} = \text{ค่าเฉลี่ยของสารละลาย blank} + 10\text{SD}$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการวิจัย

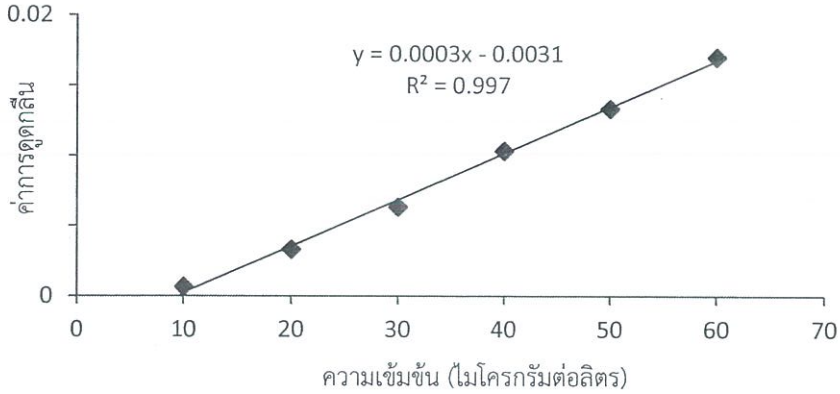
4.1 การศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Method validation)

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยการศึกษาความเที่ยง (Precision) ความแม่นยำ (Accuracy) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (Limit of Quantification, LOQ) ของเครื่องมือเพื่อให้ทราบว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมและให้ผลการทดลองที่มีความถูกต้อง สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้

4.1.1 กราฟมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน (Norfloxacin) และความเป็นเส้นตรง

ศึกษาความเป็นเส้นตรงโดยการสร้างกราฟมาตรฐานสร้างจากสารละลายมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ความเข้มข้น 10 20 30 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยวิธีการทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนก่อน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 440.0 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับความเข้มข้นโดยให้เครื่องอ่านค่าซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเส้นระหว่างค่าค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นในหน่วยไมโครกรัมต่อลิตร และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R^2) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4.1 จากกราฟได้ค่าความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 0.997 ซึ่งค่าความเป็นเส้นตรง เข้าใกล้ 1 แสดงว่าช่วงความเข้มข้นที่ทำการตรวจวัดมีความเป็นเส้นตรง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายนอร์ฟล็อกซาซิน

ตารางที่ 4.1 ช่วงการใช้งานที่เป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สารนอร์ฟล็อกซาซิน

Parameters	Values
ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range) (ppb)	10-60
สมการเส้นตรง	y = 0.0003x - 0.0031
ค่าความเป็นเส้นตรง (R^2)	0.997

4.1.2 ความเที่ยง (Precision)

ศึกษาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยการนำสารละลายมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ทราบความเข้มข้นมาตรวจวัดและศึกษาความเที่ยงของเครื่องจากค่าความเข้มข้นที่เครื่องอ่านได้ โดยให้เครื่องอ่านค่าซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่า (%RSD) ได้ค่าความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาความเที่ยง (Precision) ในการวิเคราะห์ นอร์ฟล็อกซาซิน

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย±SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
10	0.004	0.003	0.003	0.003±0.0004	14.1421
20	0.007	0.007	0.007	0.007±0.0000	0.0000
30	0.010	0.011	0.011	0.011±0.0000	4.4194
40	0.015	0.013	0.013	0.014±0.0009	6.8986
50	0.019	0.018	0.018	0.018±0.0005	2.5713
60	0.025	0.023	0.023	0.024±0.0009	3.9837
70	0.027	0.025	0.025	0.026±0.0009	3.6733
80	0.032	0.030	0.031	0.031±0.0008	2.6339

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซิน อยู่ในช่วง 0.0000-14.1421 ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ (โดยปกติ

ค่า %RSD ของการวิเคราะห์ในระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ไม่ควรเกิน 15% ซึ่งเป็นค่าที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนด)

4.1.3 ความแม่นยำ (Accuracy)

ความแม่นยำในการวิเคราะห์ของเครื่อง โดยการนำสารละลายมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ทราบความเข้มข้นมาตรวจวัดและศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์ของเครื่อง โดยพิจารณาจากค่าร้อยละของการกลับคืน (%Recovery) ดังสมการ

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นที่อ่านได้}}{\text{ค่าความเข้มข้นจริง}} \times 100$$

จากการทดลองได้ผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ในการวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซิน โดยวิธีการ fortified sample ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร

วิเคราะห์ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.0429
2	0.0379
3	0.0432
4	0.0373
5	0.0372
6	0.0428
7	0.0435
ค่าเฉลี่ย	0.0407
SD	0.0028
%Recovery	91.7523

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 พบว่า ค่าร้อยละการกลับคืนของการวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซิน เท่ากับ 91.7523 ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้เช่นกัน (โดยปกติ %Recovery ของการวิเคราะห์จะอยู่ในช่วง 80-120%)

4.1.4 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (Limit of Quantification, LOQ)

เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือวัดได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ (LOQ) ในการศึกษานี้ได้ทำการหา LOD และ LOQ โดยการทำ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แล้วนำมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ดังสมการ

LOD = ค่าเฉลี่ยสารละลาย blank + 3SD

LOQ = ค่าเฉลี่ยของสารละลาย blank + 10SD

จากการทดลองได้ค่า LOD และ LOQ ของนอร์ฟล็อกซาซิน ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ)

วิเคราะห์ครั้งที่	ปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินที่ตรวจพบ (ไมโครกรัม/ลิตร)
1	0.001
2	0.000
3	0.000
4	0.000
5	0.001
6	0.001
7	0.000
8	0.001
9	0.000
10	0.000
ค่าเฉลี่ย	0.001
SD	0.001
LOD	0.002
LOQ	0.006

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

จากตารางได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือวัดได้ (LOD) ของนอร์ฟล็อกซาซิน (norfloxacin) เท่ากับ 0.002 ไมโครกรัมต่อลิตร และได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ (LOQ) ของนอร์ฟล็อกซาซิน (norfloxacin) เท่ากับ 0.006 ไมโครกรัมต่อลิตร

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินในตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู (สุ่มเก็บตัวอย่างจากจากร้านค้าตามท้องตลาด 3 แห่ง) ปุ๋ยมูลไก่ และปุ๋ยมูลสุกร ทำการเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.1 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยวัดปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน ตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) ได้ผลการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ตรวจพบในตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู ปุ๋ยมูลไก่ และ ปุ๋ยมูลสุกร (n=3)

ตัวอย่าง	ปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน (Norfloxacin) ที่ตรวจพบ (ppb)±SD
A	0.0149 ±0.0027
B	0.0268 ±0.0057
C	0.0300 ±0.0059
D	0.0124±0.0022
E	0.0166±0.0007
F	0.0130±0.0039
X	0.0100±0.0019
Y	0.2036±0.0404

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน ในตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู ปุ๋ยมูลไก่ และปุ๋ยมูลสุกร พบว่าตัวอย่างที่นำมาทดลองส่วนใหญ่มีการตรวจพบนอร์ฟล็อกซาซิน โดยปริมาณของนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 0.0100-0.2036 ไมโครกรัมต่อลิตร จากข้อมูลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง X มีปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน น้อยกว่าตัวอย่างอื่นๆ และจากการหาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน ในตัวอย่างทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ยังคงมีปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ยังไม่พบตัวอย่างที่มีปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน ที่เกินกว่าค่ากำหนดตามประกาศของสำนักงานควบคุมอาหารและยา โดยยินยอมให้มีนอร์ฟล็อกซาซิน ปนเปื้อนในอาหารได้ไม่เกิน 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากข้อมูลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า ผู้บริโภคมีโอกาสเสี่ยงได้รับนอร์ฟล็อกซาซิน ซึ่งสารปนเปื้อนนี้ถ้าถูกสะสมในร่างกายของผู้บริโภคเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้ ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 2

การวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน ในตัวอย่างครั้งนี้ ถึงแม้ว่าจะวิเคราะห์ตัวอย่างได้เพียงจำนวนหนึ่งไม่ใช่ทั้งหมดที่ขายในท้องตลาด แต่ผู้วิจัยคาดว่า ข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไป

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม วิทยานิพนธ์ งานวิจัย

ประกอบการพิจารณาเลือกซื้อเนื้อไก่ เนื้อหมู ให้มีความปลอดภัยจากอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากนอร์ฟล็อกซาซิน เหล่านี้ได้ดีขึ้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

249795

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโตเมทตรี ได้ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู จากร้านค้า 3 แหล่ง ปุ๋ยมูลสุกร และปุ๋ยมูลไก่ ในตลาดภายในเขตอำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างดัดแปลงจากงานวิจัยของ Si-Jun และคณะ (2007) และ สีใส ปารมี และคณะ (2012) ทำการสกัดตัวอย่างโดยใช้กรดไนตริกเข้มข้น 5×10^{-3} โมลต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้มาทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารละลายเฟอรัสซัลเฟต อัตราส่วน 2.0:1.0:0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะให้สารประกอบที่มีสีเหลืองก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยค่าความยาวคลื่นที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซิน มีค่าเท่ากับ 440.0 นาโนเมตร

ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Method validation) โดยการศึกษาความเที่ยง (Precision) ของเครื่องมือโดยการหาค่า %RSD ศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของเครื่องมือโดยการหาค่า %Recovery ศึกษาความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการวิเคราะห์โดยดูค่าความเป็นเส้นตรง (R^2) ของกราฟมาตรฐาน หาค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และหาค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัดที่สามารถหาปริมาณ (LOQ) จากการทดลองพบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของการวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซิน อยู่ในช่วง 0.0000-14.14214 และ เท่ากับ 91.75 ตามลำดับ ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ที่ได้นี้อยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ ส่วนการศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงความเข้มข้นที่ทำการวิเคราะห์พบว่าค่าความเป็นเส้นตรง (R^2) ของกราฟมาตรฐานของนอร์ฟล็อกซาซิน มีค่าเท่ากับ 0.997 ซึ่งมีค่าใกล้ 1 แสดงว่า ช่วงความเข้มข้นที่ทำการตรวจวัดมีความเป็นเส้นตรง ส่วนการหาค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) ของนอร์ฟล็อกซาซิน มีค่าเท่ากับ 0.002 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.006 ไมโครกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินในตัวอย่าง ด้วยเทคนิควี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตรเมทตรี พบว่าตัวอย่าง 8 ตัวอย่าง มีการตรวจพบยาปฏิชีวนะนอร์ฟล็อกซาซิน โดยมีการตรวจพบในช่วง 0.0100-0.2036 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐานของสำนักควบคุมอาหารและยา 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัย ราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากระยะเวลาในการทำวิจัยค่อนข้างจำกัด งานวิจัยนี้จึงยังมีประเด็นที่ควรศึกษาได้อีกหลายประการ เช่น

(1) ศึกษาหาปริมาณนอร์ฟล็อกซาซินในตัวอย่างไก่ และหมูส่วนอื่นๆ เช่น ตับ ไต ไขมัน และกล้ามเนื้อ เป็นต้น

(2) ศึกษาหาปริมาณยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างเนื้อไก่ และเนื้อหมู ที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ เช่น ไนโตรฟูเรนเมตาบอไลท์ เลโวฟล็อกซาซิน ไซโปรฟล็อกซาซิน และอีรีโทรมัยซีน เป็นต้น

(3) ในการวิเคราะห์หาสารที่มีปริมาณน้อยๆ ควรใช้เครื่องแก้วที่มีความสะอาด โดยล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำยาทำความสะอาดเครื่องแก้วแล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นแช่ในสารละลายกรดไนตริก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนอีกครั้งแล้วอบให้แห้งก่อนนำไปใช้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

จิราภา อุณหเลขกะ และลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ. 2558. **การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยาตกค้างกลุ่มควิโนโลนในเนื้อสัตว์โดยเทคนิค HPLC-FLD.**สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี.

เบญจมาศ ปัทมาลัย. 2549. **สารตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ปีก.** ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปริญญา มาสวัสดิ์. 2558. **การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยใช้เทคนิคโวลแทมเมตรีที่มีไส้ดินสอเป็นขั้วไฟฟ้า.** ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก.

พวงทอง พวงแก้ว. 2555. **การหาปริมาณโคลิสตินซัลเฟตในอาหารสัตว์โดยใช้เทคนิคลิคควิดโครมาโตกราฟฟีประสิทธิภาพสูง.** สาขาเคมีวิเคราะห์ ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

มาลี เจริญวิทย์วรกุล. 2558. **การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และผลการสำรวจปริมาณสารไนโตรฟูแรนเมตาบอไลท์ในเนื้อสัตว์ โดย LC-MS/MS.** สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี.

ลลิดา แสงอาทิตย์. 2554. **การดูดซับยาปฏิชีวนะ Norfloxacin โดยเถ้าแกลบที่ pH 5-8.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยศิลปกร.

สีใส ปารมี และ วิรัช เรืองศรีตระกูล. 2555. **การวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซินในเภสัชภัณฑ์ โดยวิธีสเปคโทรโฟโทเมตริกอย่างง่าย.** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น.

มาลินี ลิ้นโภคา. 2525. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. http://www.fisheries.go.th/ quality /ยาต้านจุลชีพ.pdf

สำนักงานสถิติแห่งชาติ. 2009. **5 อันดับโรคเรื้อรังของคนไทย.** 5 เมษายน, 2016. http://www.bpl.co.th/pweb/index.php/academic-professional.

Ching-Ling Cheng, Chia-Hung Fu and Chen-Hsi Chou. 2007. **Determination of norfloxacin in rat liver perfusate using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** Journal of Chromatography, 856, 381–385.

Hing-Biu Lee, Thomas E. Peart and M. Lewina Svoboa . 2007. **Determination of**

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1139, 45–52.

Jiang Jinqing, Zhang Haitang และ Wang Ziliang. 2011. **Multiresidue Determination of Sarafloxacin, Difloxacin, Norfloxacin, and Pefloxacin in Fish using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.** Procedia Environmental Sciences, 8, 301 – 306.

Jonghwan Lim, Byungkwon Park and Hyoin Yun. 2002. **Sensitive liquid chromatographic–mass spectrometric assay for norfloxacin in poultry tissue.** Journal of Chromatography B, 772, 185–189.Jing Yu Shen, Mi Ra Kim, Chang Joo Lee, In Seon Kim, Kang Bong Lee and Jae Han Shim. 2004. **Supercritical fluid extraction of the fluoroquinolones norfloxacin and ofloxacin from orally treated-chicken breast muscles.** Analytica Chimica Acta, 513, 451–455.

Kai Yao, Wei Zhang, Linyan Yang, Jianfang Gong, Liuan Li, Tianming Jin and Cun Li. 2015. **Determination of 11 quinolones in bovine milk using immunoaffinitystir bar sorptive microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection.** Journal of Chromatography B, 1003, 67–73.

Nájla Mohamad Kassab, Anil Kumar Singh, Erika Rosa Maria Kedor-Hackmam and Maria Inês Rocha Miritello Santoro. 2005. **Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 41, 507-513.

Yun-Kai Lv, Yong Ma, Xiao-Bo Zhao, Cui-Ling Jia and Han-Wen Sun. 2012. **Grafting of norfloxacin imprinted polymeric membranes on silica surface for the selective solid-phase extraction of fluoroquinolones in fish samples.** Talanta, 89, 270–275.

Zhao Si-Jun, Li Cun, Jiang Hai-Yang, Li Bing-Yu and Shen Jian-Zhong. 2007.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Simultaneous Determination of 7 Quinolones Residues in Animal Muscle Tissues by High Performance Liquid Chromatography. Chinese Journal of Anaiytical Chemistry, 35, 786–790.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1. วิธีการเตรียมสารเคมีและการคำนวณ

1.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการหากราฟมาตรฐาน

1.1.1 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน 10 20 30 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยปิเปตสารละลายนอร์ฟลอกซาซินเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร จำนวน 1 2 3 4 5 และ 6 ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลต่อลิตร

การคำนวณ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องตวงมา

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

เช่นต้องการสารละลายนอร์ฟล็อกซาซินเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตรจากความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต้องเตรียมดังนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

$$1000 \times V_1 = 30 \times 100$$

$$V_1 = \frac{30 \times 100}{1000}$$

$$V_1 = 3 \text{ มิลลิลิตร}$$

1.2 การหาค่าความเที่ยงและความแม่นยำ

ความเที่ยง (Precision) เตรียมตัวอย่างที่จะใช้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน working range โดยแต่ละระดับเตรียมให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์เพื่อศึกษาความเที่ยง อย่างน้อย 3 ซ้ำ ทั้ง repeatability หรือ within-laboratory reproducibility

1. วิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ทุกๆระดับความเข้มข้น ระดับละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน

2. คำนวณค่า SD ของแต่ละความเข้มข้น

3. คำนวณ %RSD จะได้ repeatability ที่ความเข้มข้นนั้นๆ

การคำนวณค่า SD

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

การคำนวณค่า %RSD

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

ความแม่นยำเป็นคุณลักษณะของวิธีที่แสดงความใกล้เคียงของผลการทดสอบต่อค่าจริงหรือค่าอ้างอิง

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์นอกจากจะแสดงด้วยค่า Trueness ดังกล่าวแล้วอาจแสดงด้วยการหาเปอร์เซ็นการกลับคืน (%Recovery) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของวิธีที่มีต่อสารที่สนใจในตัวอย่าง ซึ่งหากทำโดยการเติมสารที่ทราบปริมาณแน่นอน ลงในตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ศึกษา เปอร์เซ็นการกลับคืนที่ได้อาจสูงกว่าความเป็นจริงเพราะสถานะของสารที่เติมอาจมีความแตกต่างจากสถานะของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างแม้จะเป็นสารเดียวกันเนื่องจากการจับกับเนื้อตัวอย่างอาจไม่เหมือนกันทำให้การสกัดมีความยากง่ายต่างกัน

การคำนวณค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery)

$$\text{ค่าร้อยละการกลับคืน} = \frac{\text{ค่าที่ได้รับจากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าที่ระบุไว้ในสารมาตรฐาน}} \times 100$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.3 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

Limit of detection (LOD) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ด้วยความเชื่อมั่น 99% โดยที่ความเข้มข้นระดับนี้ ไม่อาจบอกเป็นปริมาณที่มีความถูกต้อง และเที่ยงตรงในระดับที่ยอมรับได้ เนื่องจากความไม่แน่นอนมีค่าสูง

Limit of quantitation (LOQ) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ ที่ความเข้มข้นระดับนี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่นและเที่ยงตรงในระดับที่ยอมรับได้

การคำนวณค่า LOD

LOD = ค่าเฉลี่ยของสารละลาย blank + 3SD

การคำนวณค่า LOQ

LOQ = ค่าเฉลี่ยของสารละลาย blank + 10SD

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาวปนัดดา แทนสุโพธิ์

   (ภาษาอังกฤษ) Miss Panadda Tansupo

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3 4099 00087 95 1

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)**

   สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม เลขที่ 80 ถนนนครสวรรค์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44000

   โทรศัพท์ 0-4374-2620 ต่อ 126, 206

   โทรศัพท์มือถือ 080-4001572 **โทรสาร** 0-4374-2620

   E-mail panaddanew@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

   ปริญญาเอก ปรด. (เคมี) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

   ปริญญาโท วท.ม. (เคมีวิเคราะห์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

   ปริญญาตรี วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

   - Organic Agriculture
   - Biotechnology
   - Environmental Chemistry
   - Material Science

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

   7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

บทความวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Suwannasom, P, **Tansupo, P.**, and Ruangviriyachai 2016. A bone-based catalyst for biodiesel production from waste cooking oil. Energy Source, Part A. 38(21): p. 3167-3173.

Suwannasom, P, Sriraksa, R., **Tansupo, P.**, and Ruangviriyachai 2016. Optimization of biodiesel production from waste cooking oil using waste bone as a catalyst. Energy Source, Part A. 38(21): p. 3221-3228.

Tansupo, P., et al. 2010. Optimized separation procedures for the simultaneous assay of three plant hormones in liquid biofertilizers. Phytochemical Analysis. 21 (2) : p. 157-162 ; March-April,. Impact Factor 2.48.

Tansupo, P., et al. 2008. Effect of environmental conditions on the mobilization of copper (II) and iron (III) by pyoverdin I in artificial contaminated soils." ScienceAsia, 34 (3) : p. 287-292.

Tansupo, P., et al. 2007. Removal of heavy metals from artificially waste water samples based on micelle-templated silica modified with pyoverdin I. Journal of Environmental Sciences, 21 (7) : p. 1009-1016. Impact Factor 2.34.

Tansupo, P., et al. 2007. Effect of pyoverdin I produced by *Pseudomonas aeruginosa* on the mobilization of copper (II) and iron (III) contaminated in natural soil and sea sand samples. International Journal of Pure & Applied Chemistry. 2 (1) : p. 93-98.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ผลงานวิชาการอื่นๆ (เช่น Proceeding หรือ ตำรา)

Panadda Tansupo, Thanonchat Imsombat, Patcharin Buapan, Benjamaporn Juthapad, Sukanya Phugerung and Nathakon Kortpat. Preparation of biosorbent from ground fish scales for the removal of copper from wastewater. Poster presentation at 38st Congress on Science and Technology of Thailand. October 17-19, 2012 Chaimai University, Chaimai.

Panadda Tansupo and Chalerm Ruangviriyachai. 2555 Potential of pyoverdin I on metals remediation from contaminated soil. การประชุมวิชาการ "วิทยาศาสตร์การวิจัย" ครั้งที่ 4 วันที่ 13-14 มีนาคม 2555 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

Tansupo, P., Suwannasom, P., Jutapad, B. and Buapan, P. 2012 Use of fish scales as biosorption for the removal of Cu(II) ion" at ICSSS 2012. Rajabhat Maha Sarakham University, Maha Sarakham.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY