อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2556C102

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์เตตราไซคลินในน้ำนม
โดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีควบคู่กับ
เทคนิคโครงข่ายประสาทเทียม

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 12 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 1679407 6
เลขเรียกหนังสือ 3 SF
251
ป458ร
2557

คณะผู้วิจัย สังกัด
1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปริญญา มาสวัสดิ์ คณะวิทยาศาสตร์
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธพงษ์ อุดแน่น คณะวิทยาศาสตร์

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์เตตราไซคลินในน้ำนมโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีควบคู่กับเทคนิคโครงข่ายประสาทเทียม” ดำเนินการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ตลอดจนคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

สุดท้ายนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวรุ่งรัตน์ อุระเพ็ญ ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

หากมีข้อผิดพลาดประการใดในรายงานการวิจัยฉบับนี้ คณะผู้วิจัยใคร่ขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2557

ชื่อโครงการ **การพัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์เตตราไซคลินในน้ำนมโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีควบคู่กับเทคนิคโครงข่ายประสาทเทียม**

Development of the method for the determination of tetracycline in milk by digital image-based colorimetry coupling with artificial neural network

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปริญญา มาสวัสดิ์
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
หมายเลขโทรศัพท์ 055-963439
ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยสาขา เคมี
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2556
จำนวนเงิน 180,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี
ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2556 ถึง 30 เมษายน 2557

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลินที่ตกค้างในตัวอย่างน้ำนม โดยอาศัยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย ให้ขีดจำกัดการตรวจวัดในระดับที่ต่ำ ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลา นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวไม่ต้องเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ผลทุกครั้งเหมือนเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐาน จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินคือ ใช้ตัวทำละลายเป็นกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร และมีการใช้สารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีสารละลายเตตราไซคลินให้มีความเข้มมากขึ้นคือ สารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกไนเตรต และอัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมระหว่างสารละลายมาตรฐานเหล็ก(II) ต่อสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินคือ 1:2 และสำหรับการวิเคราะห์หาออกซีเตตราไซคลินมีสภาวะที่เหมาะสมที่เลือกคือ ใช้ตัวทำละลายเป็นกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร และสารเคมีที่ใช้เพื่อช่วยเพิ่มสีของสารละลายออกซีเตตราไซคลินให้มีความเข้มมากขึ้นคือ สารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ไนเตรตในอัตราส่วน 4:1 จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทั้ง 2 พบว่าสำหรับการวิเคราะห์เตตราไซคลิน สภาวะดังกล่าวเหมาะกับเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีมากกว่าเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี โดยพบปริมาณเตตราไซคลินในน้ำนมวัวน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณของเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการวิเคราะห์ออกซีเตตราไซคลินพบว่าสภาวะดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ได้ทั้ง 2 เทคนิค โดยพบปริมาณออกซีเตตราไซคลินอยู่ในช่วง 0.50 – 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.40 – 0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี และเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี ตามลำดับ และมีค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 111-115 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณเท่ากับ 0.0203 และ 0.0679 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนขีดจำกัด

ต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Abstract

Digital image-based colorimetry (DIC) was developed for determination of tetracycline (TC) and oxytetracycline (OTC) residues in milk. This method was provided low limit of detections, low cost, short analysis time and without the calibration curve construction. The results were compared with those obtained by UV-Visible spectrophotometry which is the standard method. The TC and OTC were dissolved in 5 and 6 mol/L of HCl, respectively. Ferric nitrate solution (mole ratio (Fe(III) : TC) of 1:2) and copper nitrate solution (mole ratio (Cu(II) : OTC) of 1:4) were used for enhancing color. It can be concluded that DIC is the most suitable technique for TC analysis. The TC amount found in cow milk was less than 1 mg/L. For the OTC analysis, it was found that the optimum conditions can be used for both methods. Standard curve was created in UV-VIS spectrophotometry for determining OTC from linear equation and the amount of OTC was found to be in the range of 0.40-0.55 mg/L. The recoveries for OTC were 111-115%. Limit of detection and limit of quantitation were 0.0203 and 0.0679 mg/L, respectively. Finally, the limit of quantitation for TC and OTC by DIC were 1 mg/L.

สรุปผลการดำเนินงานของโครงการโดยย่อ (Executive Summary)

ปัญหาการตกค้างของยากลุ่มเตตราไซคลินในน้ำนมเกิดจาก การใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลินเป็นอาหารเสริมให้กับโคนมเพื่อเพิ่มผลผลิตหรือแม้แต่การรักษาโรคที่เกิดกับโคนม เช่น โรคเต้านมอักเสบ โรคมดลูกอักเสบ เป็นต้น การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ ในโคนมส่งผลกระทบต่อการตกค้างของยาปฏิชีวนะดังกล่าวในน้ำนมและเกิดการถ่ายโอนสู่ผู้บริโภคได้เนื่องจากน้ำนมหรือผลิตภัณฑ์จากนมถือได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคนนิยมบริโภคทั่วทั้งโลกเพราะนมเป็นอาหารธรรมชาติที่มีความสมบูรณ์ และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมด้วยธาตุอาหารครบทุกหมู่ คือ โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ คาร์โบไฮเดรต และไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลนม หรือแล็กโทส (lactose) และโปรตีนที่เรียกว่า เคซีน (Casein) จะพบในธรรมชาติคือในนมหรือน้ำนมเท่านั้น นมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาร่างกายและสมองของเด็กและเยาวชน ดังนั้นทางองค์กรต่างๆ จึงได้มีการกำหนดมาตรฐานปริมาณสารเตตราไซคลิน (เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และออกซีเตตราไซคลิน) ตกค้างสูงสุดในผลิตภัณฑ์สินค้าปศุสัตว์ชนิดนม เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพร่างกายของผู้บริโภค โดยมาตรฐานที่ทางองค์กรต่างๆ ได้กำหนดปริมาณดังนี้ กระทรวงสาธารณะสุข สหภาพยุโรป CODEX และญี่ปุ่นกำหนดค่าสูงสุดไว้ที่ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่สำหรับ FAD ได้กำหนดค่าตกค้างสูงสุดของเตตราไซคลินในนมอยู่ที่ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากมาตรฐานดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าปริมาณการตกค้างในน้ำนมของกลุ่มยาเตตราไซคลินมีความสำคัญอย่างยิ่งดังนั้นจึงมีนักวิจัยต่างๆ ให้ความสนใจเพื่อวิเคราะห์หายากลุ่มเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนมด้วยวิธีที่แตกต่างกันไปมากมาย ยกตัวอย่างเช่น เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เทคนิคอิมมูโนแอสเซย์ (Immunoassays) เทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสแบบคาปิลลารี (Capillary Electrophoresis; CE) เทคนิคโฟล์วอินเจคชันอะนาไลซิส (Flow injection analysis) และเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry, MS) เป็นต้น แต่เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องของราคาที่แพง และเครื่องมือมีขนาดใหญ่เคลื่อนย้ายลำบาก นอกจากนี้ผู้ทำการทดลองต้องมีความชำนาญอย่างมากในการใช้เครื่องมือ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคใหม่มาใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลิน และออกซีเตตราไซคลินที่ตกค้างในตัวอย่างน้ำนม

งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคที่ใหม่ คือเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีควบคู่กับโครงข่ายประสาทเทียม (Digital image-based colorimetry – Artificial neural networks; DIC-ANNs) โดยเป็นเทคนิคที่ใช้กล้องถ่ายภาพขนาดเล็ก (Webcam) ที่มีเซนเซอร์ชนิดซีมอส (Complementary Metal Oxide Semiconductor, CMOS) สำหรับถ่ายภาพในเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี แล้วประมวลผลข้อมูลด้วยโครงข่ายประสาทเทียม ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกปลอดภัย ประหยัดและรวดเร็วกว่าวิธีเดิม นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังลดการสร้างกราฟมาตรฐานทุกครั้งด้วย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนมด้วยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีและทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับเทคนิค

มาตรฐานคือเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี พบว่าสำหรับเตตราไซคลินสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษามีความเหมาะสมกับเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีมากกว่าเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี โดยพบปริมาณเตตราไซคลินที่ตกค้างในน้ำนมน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราไซคลินพบว่าสำหรับสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองสามารถวิเคราะห์ได้ทั้ง 2 เทคนิคข้างต้น และพบว่าปริมาณออกซีเตตราไซคลินอยู่ในช่วง 0.50 – 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.40 – 0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีและเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี ตามลำดับ และมีค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 111-115 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณเท่ากับ 0.0203 และ 0.0679 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีของทั้งเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลินเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเนื่องจากเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่เน้นการถ่ายภาพสีของสารละลาย ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการเกิดสีของสารละลายเตตราไซคลินพบว่าเมื่อเกิดการรวมตัวกับสารละลายเฟอร์ริกไนเตรตจะมีลักษณะของสีที่เข้มขึ้น และสำหรับออกซีเตตราไซคลินมีการใช้คอปเปอร์ไนเตรตในการเพิ่มความเข้มของสีด้วยเช่นเดียวกัน

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการโดยย่อ	ง
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ	ฒ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 สมมติฐานของงานวิจัย	2
1.3 เตตราไซคลิน	3
1.3.1 สมบัติทางเคมี	4
1.3.2 สมบัติทางกายภาพ	5
1.3.3 การดูดซึม การกระจาย การขับถ่ายและการออกฤทธิ์	6
1.3.4 การดื้อยา	7
1.3.5 ปฏิกิริยาระหว่างยา	7
1.3.6 การใช้และวิธีใช้ยา	8
1.4 น้ำนม	8
1.4.1 ประเภทของนม	8
1.4.2 กระบวนการผลิตนม	10
1.4.3 เกณฑ์มาตรฐานสำหรับควบคุมสิ่งปนเปื้อน ของสารกลุ่มเตตราไซคลินในนม	10
1.5 ผลกระทบต่อเตตราไซคลิน	11
1.5.1 ผลต่อระบบทางเดินอาหาร	**11**
1.5.2 การติดเชื้อแทรกซ้อน	**11**
1.5.3 ผลต่อกระดูกและฟัน	**11**

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
1.5.4 ปฏิกิริยาต่อผิวหนัง	11
1.5.5 ผลต่อตับ	11
1.5.6 ผลต่อไต	11
1.5.7 อื่นๆ	11
1.6 เทคนิคการวิเคราะห์หาเตตราไซคลิน	12
1.6.1 อิมมูโนแอสเซย์ (Immunoassays)	12
1.6.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography)	12
1.6.3 เทคนิคยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโทเมตรี (UV-VIS Spectro photometry)	13
1.6.4 เทคนิคคาปิลารี อิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary electrophoresis)	13
1.6.5 โฟล์วอินเจคชันอะนาไลซิส (Flow injection analysis)	13
1.6.6 ฟลูออเรสเซนต์สเปคโทรสโคปี (Fluorescence spectroscopy)	14
1.6.7 แมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry)	14
1.7 เทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี (Digital image – based colorimetry)	15
1.8 หลักการของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer)	16
1.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
1.10 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	23
1.11 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	23
1.12 ประโยชน์ที่จะได้รับ	23
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	24
2.1.1 เครื่องมือ	24
2.1.2 อุปกรณ์ และสารเคมี	24

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.2 วิธีการเตรียมสาร	25
2.2.1 สารละลายไฮโดรคลอริก	25
2.2.2 สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน	25
2.2.3 สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลิน	26
2.2.4 สารละลายมาตรฐานเหล็ก(III)	26
2.2.5 สารละลายมาตรฐานคอปเปอร์(II)	26
2.2.6 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก	26
2.2.7 สารละลาย McIlvaine–ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)	26
2.3 วิธีการทดลอง	27
2.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม	27
2.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม	30
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม	35
3.1.1 การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินมีสีเข้มที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำๆ	35
3.1.2 การทำชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินด้วยตาเปล่าและถ่ายภาพได้ชัดเจน โดยที่ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ต้องไม่เกิน 1	36
3.1.3 การศึกษาหาสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้น	38
3.1.4 การศึกษาหาอัตราส่วนโดยโมล (Mole ratio) ที่เหมาะสมระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินกับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III)	39
3.1.5 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมหลังจากเตรียมสาระลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ลงไปตามอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์	41

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวแล้วตรวจวัดด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี และเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี	42
3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม	50
3.2.1 การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินมีสีเข้มที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำๆ	50
3.2.2 การศึกษาหาสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้น	51
3.2.3 การศึกษาหาอัตราส่วนโดยโมล (Mole ratio) ที่เหมาะสมระหว่างสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินกับสารละลายมาตรฐานทองแดง(II)	51
3.2.4 การศึกษาหาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้มโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี	53
3.2.5 การศึกษาหาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้มโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโทเมตรี	54
3.2.6 การหาค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้ม	56
3.2.7 การศึกษาหา ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ)	58
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	60
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก ก	69
Output ที่ได้จากโครงการ	75
ภาคผนวก 1	76

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 ขนาดการใช้ยาเตตราไซคลินชนิดต่างๆ ในผู้ใหญ่	8
2.1 ปริมาตรในการปิเปตสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร	27
2.2 ปริมาตรในการปิเปตสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (TC) และสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เพื่อให้ได้ปริมาตรตรงตามอัตราส่วนโดยโมลที่กำหนดไว้	28
2.3 อัตราส่วนโดยโมลของทองแดง(II) กับออกซีเตตราไซคลิน	31
3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดที่ความยาวคลื่น 274.5 นาโนเมตร	37
3.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้ม ที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร	44
3.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้ม ที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร	46
3.4 ค่าความเข้มสีในระบบ RGB ของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก (III) ในอัตราส่วน 2 : 1	48
3.5 ผลการตรวจสอบค่าความเข้มสีในระบบ RGB ของชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1 กับสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้ม โดยทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง	49
3.6 ปริมาณออกซีเตตราไซคลินที่ตรวจพบในนมทั้ง 3 ชนิดโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี	54
3.7 ปริมาณออกซีเตตราไซคลินที่ตรวจพบในนมทั้ง 3 ชนิดโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี	56
3.8 ค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของตัวอย่างนมชนิดต่างๆ	58

สารบัญรูป

รูป	หน้า
1.1 โครงสร้างของสารกลุ่มเตตราไซคลิน : (a) Chlortetracycline ; (b) Oxytetracycline ; (c) Tetracycline ; (d) Doxycycline ; (e) Minocycline ; (f) Demethylchlortetracycline ; (g) Methacycline	5
1.2 เครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์	15
1.3 แสดงการถ่ายภาพด้วยกล้องโทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะชนิด iPhone 4S	16
1.4 ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี	18
3.1 ภาพถ่ายของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในแต่ละความเข้มข้น	35
3.2 ภาพถ่ายชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลาย	36
3.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร	36
3.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร	37
3.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร	38
3.6 สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร; A : ไม่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III), B : เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III)	38
3.7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นโดยโมล เท่ากับ 9 : 1	39
3.8 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นโดยโมล เท่ากับ 5.5 : 1	40
3.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง [TC] / [Fe(III)] กับค่าการดูดกลืนแสงโดยวัดที่ความยาวคลื่น 288 นาโนเมตร ; โดย [TC] คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (โมลต่อลิตร), [Fe] คือ ความเข้มข้นของเหล็ก(III) (โมลต่อลิตร)	40

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป	หน้า
3.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง [TC] / [Fe(III)] กับค่าการดูดกลืนแสงโดยวัดที่ความยาวคลื่น 434 นาโนเมตร ; โดย [TC] คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (โมลต่อลิตร), [Fe] คือ ความเข้มข้นของเหล็ก(III) (โมลต่อลิตร)	41
3.11 ภาพถ่ายสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 1 (A), 5 (B) และ 10 (C) มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที ตามลำดับ	42
3.12 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 4 : 1	43
3.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน และค่าการดูดกลืนแสงที่มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 4 : 1	43
3.14 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตรกส่วน 2 : 1	45
3.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน และค่าการดูดกลืนแสงที่มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1	45
3.16 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที (A) : ไม่เติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (B) : เติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1	46
3.17 สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก (III) ในอัตราส่วน 4 : 1 (A) และ 2 : 1 (B)	47
3.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1 และค่าความเข้มสีในระบบ RGB	48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป	หน้า
3.19 สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1	49
3.20 สารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที(A) นมวัวพาสเจอไรซ์(B) และนมวัวสดต้ม(C) ที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก (III) ที่เข้มข้น 2.6×10^{-5} มิลลิกรัมต่อลิตร	50
3.21 ภาพถ่ายสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1,000 ppm ที่ละลายด้วยตัวทำละลายต่างๆ ; (A) น้ำปราศจากไอออน, (B) – (I) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 – 10 โมลต่อลิตร, (J) – (K) กรดอะซิติกเข้มข้น 1% และ 10% โดยปริมาตร, (L) เมทานอล ตามลำดับ	50
3.22 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างออกซีเตตราไซคลินกับโลหะต่างๆ ; (A) ออกซีเตตราไซคลินกับเหล็ก(III), (B) ออกซีเตตราไซคลินกับทองแดง(II), (C) ออกซีเตตราไซคลินกับนิกเกิล(II), (D) ออกซีเตตราไซคลินกับสังกะสี(II), (E) ออกซีเตตราไซคลินกับแมงกานีส(II) และ (F) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของออกซีเตตราไซคลิน	52
3.23 ภาพถ่ายสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1,000 ppm เมื่อไม่เติม (ซ้าย) และเติม (ขวา) เหล็ก(III) (A), ทองแดง(II) (B), นิกเกิล(II) (C), สังกะสี(II) (D) และแมงกานีส(II) (E)	52
3.24 แสดงจุดตัดของเส้นตรงสองเส้นจากกราฟที่ได้ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนของ [L]/[M] ครั้งที่ 1 (A), ครั้งที่ 2 (B) และครั้งที่ 3 (C) ตามลำดับ	53
3.25 ภาพถ่ายสีของตัวอย่างนม UHT (ซ้าย) เทียบกับสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	54
3.26 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของออกซีเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	55
3.27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินสำหรับตัวอย่างนม UHT	55
3.28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินสำหรับตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์	55
3.29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินสำหรับตัวอย่างนมสดต้ม	56

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

อุตสาหกรรมโคนม (Dairy Industry)[1] ถือว่าเป็นอีกหนึ่งอุตสาหกรรมที่สำคัญในประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นศูนย์กลางในการผลิตน้ำนมดิบอันดับหนึ่งในอาเซียน เพราะสามารถผลิตน้ำนมดิบได้มากถึง 1 ล้านตันต่อปี ซึ่งการเลี้ยงโคนมของประเทศไทยเริ่มขึ้นอย่างจริงจังเมื่อ ปี พ.ศ. 2512 พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ ทรงมีพระราชดำริให้จัดตั้งศูนย์รวบรวมน้ำนมสวนจิตรลดาและโรงนมผงสวนดุสิต เพื่อศึกษาการแปรรูปนมผง (Powdered Milk) และได้ขยายตัวเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ส่วนใหญ่ในอุตสาหกรรมโคนมนิยมใช้สารเสริมในอาหารสัตว์ (feed additive)[2] โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ให้เร็วขึ้น และนอกจากนี้ยังใช้สำหรับรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ เช่นโรคเต้านมอักเสบ และมดลูกอักเสบ เป็นต้น ซึ่งอาหารเสริมที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเตตราไซคลิน (Tetracyclines antibiotic) โดยถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ และใช้เป็นอาหารเสริมให้กับโคนมมีทั้งการผสมในอาหารหลักและการฉีดเข้าโดยตรง ดังนั้นจึงส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์จากโคนม เนื่องจากการถ่ายโอนของยาปฏิชีวนะที่อาจเกิดการตกค้างในน้ำนมและสามารถโอนถ่ายสู่ผู้บริโภคได้ ซึ่งอุตสาหกรรมนมเป็นอุตสาหกรรมที่นำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์จากนมได้หลายประเภท เช่น นมพร่องมันเนย นมสดพร้อมดื่ม นมพาสเจอร์ไรส์ นม UHT โยเกิร์ต เนย ไอศกรีม เป็นต้น โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับคนทุกเพศทุกวัย ไม่ว่าจะเป็นเด็ก วัยรุ่น หญิงตั้งครรภ์ หรือแม้แต่ผู้สูงอายุ เนื่องจากนมเป็นอาหารธรรมชาติที่มีความสมบูรณ์ และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง[3] อุดมด้วยธาตุอาหารครบทุกหมู่ คือ โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ คาร์โบไฮเดรต และไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลนม หรือแล็กโทส (lactose) และโปรตีนที่เรียกว่า เคซีน (Casein) จะพบในธรรมชาติคือในนมหรือน้ำนมเท่านั้น ดังนั้นนมจึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณการบริโภคเป็นจำนวนมากทั่วทั้งโลกและมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาร่างกายและสมองของเด็กและเยาวชน และเนื่องจากนมเป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญและคนส่วนมากทั่วโลกนิยมบริโภคแล้วการตกค้างของยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลินในนมที่สามารถถ่ายโอนมาสู่ผู้บริโภคนี้เอง ดังนั้นทางองค์กรต่างๆ จึงได้มีการกำหนดมาตรฐานปริมาณสารเตตราไซคลิน (เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และออกซีเตตราไซคลิน) ตกค้างสูงสุดในผลิตภัณฑ์สินค้าปศุสัตว์ชนิดนม[4] เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพร่างกายของผู้บริโภค โดยมาตรฐานที่ทางองค์กรต่างๆ ได้กำหนดปริมาณดังนี้ กระทรวงสาธารณะสุข สหภาพยุโรป CODEX และญี่ปุ่นกำหนดค่าสูงสุดไว้ที่ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่สำหรับ FAD ได้กำหนดค่าตกค้างสูงสุดของเตตราไซคลินในนมอยู่ที่ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นจึงเห็นได้ชัดว่าการควบคุมเรื่องของการตกค้างยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์นมถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างมากในตลาดการส่งออก จึงส่งผลให้มีการคุมเข้มอย่างมากในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์นมก่อนที่จะส่งออก ดังนั้นจึงมีผู้วิจัย

มากมายมีความสนใจที่จะวิเคราะห์หาปริมาณของเตตราไซคลินที่ตกค้างในน้ำนมด้วยเทคนิคต่างๆ มากมาย ยกตัวอย่างเช่น เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) [5] เทคนิคอิมมูโนแอสเซย์ (Immunoassays) [6] เทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสแบบคาปิลลารี (Capillary Electrophoresis; CE) [7] เทคนิคโฟล์วอินเจคชันอะนาไลซิส (Flow injection analysis) [8] และเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry, MS) [9] เป็นต้น ถึงแม้ว่าเทคนิคดังกล่าวจะมีความไว และความแม่นยำสูง แต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องของราคาที่แพง และเครื่องมือมีขนาดใหญ่ เคลื่อนย้ายลำบาก อีกทั้งการทดลองยังต้องอาศัยความชำนาญของผู้วิเคราะห์อีกด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคที่ใหม่ คือเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีควบคู่กับโครงข่ายประสาทเทียม (Digital image-based colorimetry – Artificial neural networks; DIC-ANNs) [10] โดยเป็นเทคนิคที่ใช้กล้องถ่ายภาพขนาดเล็ก (Webcam) ที่มีเซนเซอร์ชนิดซีมอส (Complementary Metal Oxide Semiconductor, CMOS) สำหรับถ่ายภาพในเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี (Digital image-based colorimetry; DIC) แล้วประมวลผลข้อมูลด้วยโครงข่ายประสาทเทียม (Artificial neural networks; ANNs) ซึ่งในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะนำเทคนิค DIC-ANNs มาประยุกต์ใช้สำหรับการหาปริมาณเตตราไซคลินในน้ำนม เนื่องจากเตตราไซคลินในน้ำนมสามารถส่งผลถึงผู้บริโภคได้ โดยสารเตตราไซคลินนั้นจะออกฤทธิ์กว้างไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิด [11] ซึ่งจะไปทำลาย normal flora โดยเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวานหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง จะทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนจากเชื้อรา และแบคทีเรียอื่นๆ เช่น ทำให้เกิดท้องเดิน มีไข้จากเชื้อ Stephylococci เกิดการติดเชื้อรา Candida alicans ในช่องปาก ลำคอ ช่องคลอด หรือทางเดินอาหาร ส่งผลต่อกระดูกและฟัน โดยเตตราไซคลินจะไปจับกับแคลเซียมที่กระดูกและฟันทำให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตที่กระดูกและฟัน เตตราไซคลินที่เกาะบริเวณฟันจะทำให้ฟันมีสีน้ำตาล เมื่อถูกแสงสีน้ำตาลจะยิ่งเข้มขึ้น และเนื่องจากยากลุ่มนี้สามารถผ่านรกได้จึงไม่ควรใช้ขณะตั้งครรภ์เพราะจะทำให้ฟันของทารกมีสีน้ำตาลได้ แต่จะไม่มีผลต่อฟันแท้ นอกจากนี้เตตราไซคลินทุกชนิดยังทำให้ผิวหนังแพ้ต่อแสง ผิวไหม้ รู้สึกชาบริเวณที่ถูกแสงอีกด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการตรวจวัดปริมาณเตตราไซคลินในน้ำนมก่อนที่จะนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และการตกค้างในผลิตภัณฑ์ก่อนนำจำหน่าย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิค DIC-ANNs ในการหาปริมาณเตตราไซคลินในน้ำนม โดยวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวก ปลอดภัย ประหยัดและรวดเร็วกว่าวิธีเดิม

1.2 สมมติฐานของงานวิจัย

เครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์ควบคู่กับการประมวลผลข้อมูลในรูปแบบโครงข่ายประสาทเทียม (DIC-ANNs) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ออกแบบและสร้างขึ้นภายในห้องปฏิบัติการสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในน้ำนมได้อย่างรวดเร็ว สะดวก และปลอดภัย

1.3 เตตราไซคลิน

เตตราไซคลิน (Tetracyclines)[12, 13] เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดต่อและระงับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งในคนและสัตว์ โดยรักษาโรคติดเชื้อในท่อทางเดินปัสสาวะรักษาลำไส้อักเสบ หลอดลมอักเสบ รักษาโรคบิดมีเชื้อ รักษาแผล ฝี หนอง อาการอักเสบต่างๆ เนื่องจากการติดเชื้อ ซึ่งยาเตตราไซคลินเกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นโดยการสกัดเชื้อรา Strepmyces riosus เมื่อปี 2493 โดยนักวิทยาศาสตร์ที่ชื่อ Benjamin Duggar พบว่าเป็นยาที่ออกฤทธิ์ได้ในขอบเขตกว้าง สามารถออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของริกเกตเชียและโปรโตซัวบางชนิดอีกด้วย ซึ่งยาในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 7 ชนิด [14] แต่ที่เกษตรกรนำมาใช้อย่างกว้างขวางมีด้วยกันพียง 3 ชนิด คือ คลอเตตราไซคลิน (Chlortetracycline) ออกซีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline) และเตตราไซคลิน (Tetracycline) ยาตัวนี้ถูกใช้มายาวนานเกือบ 70 ปี ในอดีตถูกนำมาใช้ในการรักษาอหิวาตกโรค วงการแพทย์ยังนำยานี้มาใช้รักษาสิวหลอดลมอักเสบ กามโรค เช่น ซิฟิลิส เป็นต้น และสำหรับในสัตว์พบว่ายาเตตราไซคลินถูกนำมาใช้ในทางปศุสัตว์เป็นส่วนใหญ่ โดยนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลผลิต และรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ ซึ่งส่วนมากจะนำยาผสมกับอาหารให้กับสัตว์กิน ตัวอย่างสัตว์ที่พบว่ามีการใช้ยาเตตราไซคลินในอาหารสัตว์มีทั้งสัตว์น้ำ และปศุสัตว์ เช่น ไก่ หมู โคนม โคเนื้อ แพะ กุ้ง และปลา เป็นต้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมยากลุ่มเตตราไซคลินถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งซึ่งไม่เพียงแต่นำมาผสมในอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตและการเจริญเติบโตเท่านั้นแต่ยากลุ่มนี้ยังนำมาใช้เพื่อรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม[15] ซึ่งปัญหาเต้านมอักเสบนับว่าเป็นปัญหาที่มีความสำคัญยิ่งต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม เนื่องจากมีผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของน้ำนมที่โคนมผลิตได้ โดยการรักษาส่วนใหญ่จะใช้ยาปฏิชีวนะฉีดเข้าไปในเต้านมโดยตรง

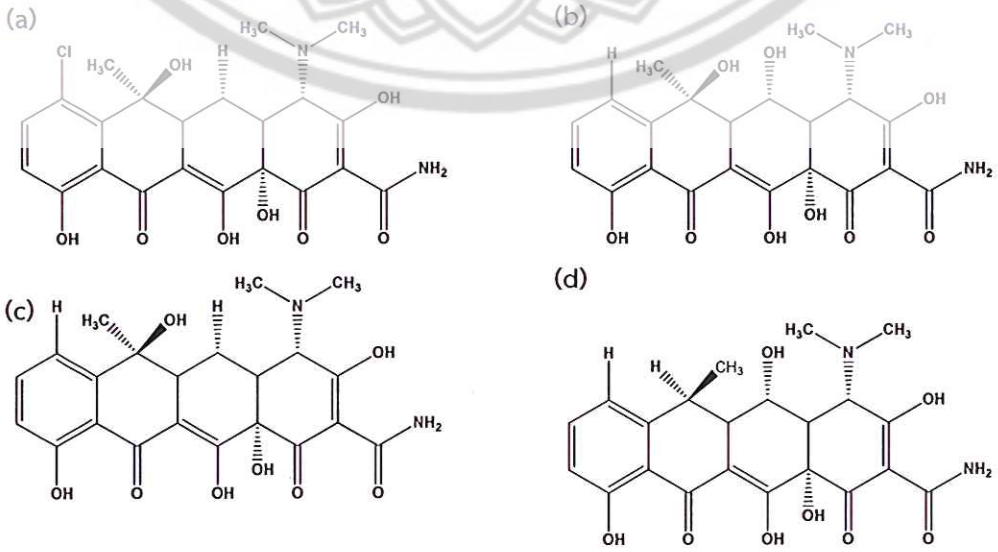
ปริมาณการใช้เตตราไซคลินในฟาร์มพบมากทั่วทั้งโลก[16] โดยเฉพาะในสหรัฐฯ พบว่ามีการใช้เตตราไซคลินมากที่สุดในโลกคือ 3200 ตันต่อปี รองลงมาคือเกาหลี 732 ตันต่อปี ยุโรป (ประกอบด้วย สวีเดน เดนมาร์ก และฝรั่งเศส) 2575 ตันต่อปี และอังกฤษ 228 ตันต่อปี ตามลำดับ นอกจากนี้ในสหรัฐฯ ยังพบการใช้เตตราไซคลินในการรักษาสัตว์ในฟาร์มมากถึง 80% และในญี่ปุ่นพบถึง 60% ของยาปฏิชีวนะ และจากข้อมูลในปี 2011[17] พบว่าเตตราไซคลินถูกขายเพื่อใช้ในปศุสัตว์มากที่สุดในจำนวนยาปฏิชีวนะทุกชนิด (5.5 ล้านกิโลกรัม) เนื่องจากเตตราไซคลินเป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์กว้าง (Broad spectrum) ครอบคลุมเชื้อแอโรบิคแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ แอนแอโรบิคแบคทีเรีย Spirochetle Rickettiae Mycoplasma และ Chlamydia แล้วยังมีราคาไม่แพง[18] ดังนั้นเตตราไซคลินจึงถูกนำมาใช้เป็นยาสำหรับปศุสัตว์อย่างแพร่หลาย ซึ่งการใช้ยาที่มีจำนวนมากนี่เองจึงส่งผลต่อการตกค้างของเตตราไซคลินในน้ำนมเพราะว่าเตตราไซคลินมีอัตราการเมตาบอลิซึมในโคนมถึง 25-75% [19] และเตตราไซคลินยังมีการถ่ายโอนไปสู่น้ำนมและส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภค

1.3.1 สมบัติทางเคมี[20, 21]

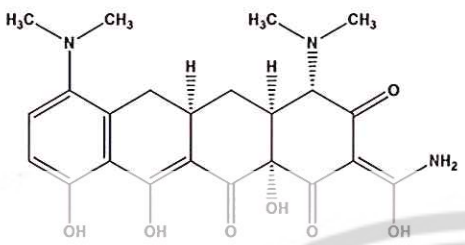
เตตราไซคลินมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น มีรสขม เตตราไซคลินที่เป็นเบสละลายน้ำได้จำกัด แต่ในรูปเกลือโซเดียมและไฮโดรคลอไรด์จะละลายน้ำได้ดี เตตราไซคลินคงตัวในพีเอช (pH) เป็นกรดอ่อน (pH 3-6) เตตราไซคลินสามารถรวมตัวกับไอออนประเภท Divalent และ Trivalent ได้แก่ แคลซียม (Ca) อะลูมิเนียม (Al) เหล็ก (Fe) และสังกะสี (Zn) รวมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อเกิดการรวมตัวในทางเดินอาหาร ยาก็จะไม่ดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต ดังนั้นในการผลิตยากลุ่มเตตราไซคลินจึงเตรียมยาในรูปเกลือเพื่อทำให้ยาไม่สามารถรวมตัวกับไอออนโดยเฉพาะแคลเซียม เช่น Tetracycline phosphate complex

เตตราไซคลินมีคุณสมบัติในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Chelating property) โดยจะจับแน่นกับโลหะที่มีวาเลนซ์ 2 และ 3 เช่น แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) อะลูมิเนียม (Al) และเหล็ก (Ag) เป็นต้น แล้วเกิดสารประกอบไม่สลายตัวและเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ เช่น ที่พีเอช (pH) ต่ำกว่า 2 กลุ่มไฮดรอกซีของยาเตตราไซคลินจะแยกตัวออกกลายเป็นแอนไฮโดรเตตราไซคลิน ซึ่งไม่มีฤทธิ์ในการรักษาโรค

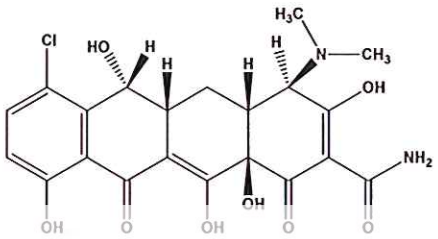
ออกซีเตตราไซคลินมีสูตรทางเคมี $C_{22}H_{24}N_2O_9$ และมีน้ำหนักโมเลกุล 460.434 g/mol และเตตราไซคลินมีสูตรทางเคมี $C_{22}H_{24}N_2O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 444.43 g/mol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูป 1.1 (b) และ 1.1 (c) ตามลำดับ โดยยาในกลุ่มเตตราไซคลินทุกชนิดมีสูตรโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน ถ้ามีเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยากลุ่มเตตราไซคลินชนิดใดชนิดหนึ่ง ก็สามารถดื้อต่อยาเตตราไซคลินชนิดอื่นๆ ได้ด้วย ตัวยาในกลุ่มนี้ได้แก่ เตตราไซคลิน (Tetracycline) คลอเตตราไซคลิน (Chlortetracycline) ออกซีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline) ดีออกซีไซคลิน (Deoxycycline) ไมโนไซคลิน (Minocycline) ดีเมทริลคลอเตตราไซคลิน (Demethylchortetracycline) และเมตราไซคลิน (Methacycline) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพหลายจำพวก และยังมีผลต่อจุลชีพแกรมบวกและแกรมลบอื่นๆ อีกหลายชนิด



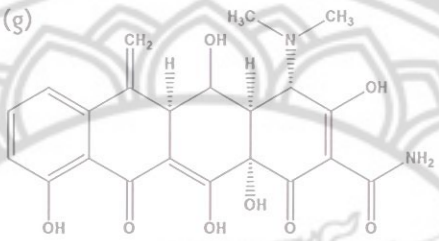
(e)



(f)



(g)



รูป 1.1 โครงสร้างของสารกลุ่มเตตราไซคลิน : (a) Chlortetracycline ; (b) Oxytetracycline ; (c) Tetracycline ; (d) Doxycycline ; (e) Minocycline ; (f) Demethylchlortetracycline ; (g) Methacycline

1.3.2 สมบัติทางกายภาพ[22]

เตตราไซคลินมีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง (Yellow crystalline powder) ไม่มีกลิ่น มีความเสถียรสูงในอากาศ แต่ถ้าถูกแสงมากจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ ความสามารถในการออกฤทธิ์ของเตตราไซคลินจะลดลงเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีพีเอช (pH) ต่ำกว่า 2 และจะสลายตัวอย่างรวดเร็วในสารละลายด่าง (Alkaline hydroxide solutions) เตตราไซคลินมีค่า specific rotation, $[\alpha]_D25$ ตั้งแต่ -254° ถึง -270° (ใน 0.1 N HCl) และ $[\alpha]_D25$ = -239° (ในเมทานอล) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25°C) เตตราไซคลิน 1 กรัม จะละลายได้ในน้ำประมาณ 2,500 มิลลิลิตร และในแอลกอฮอล์ประมาณ 50 มิลลิลิตร ยานี้ละลายได้ดีในกรดไฮโดรคลอริกเจือจางและสารละลายด่าง ไม่สามารถละลายในคลอโรฟอร์มและอีเทอร์ เตตราไซคลินจะละลายได้ดีกว่าคลอเตตราไซคลิน และยากลุ่มนี้จะเกิด epimerization โดยเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าพีเอช (pH) สูงยากลุ่มเตตราไซคลินจะเกิด isomerization ไปเป็นไอโซเตตราไซคลินโดยเฉพาะอย่างยิ่งยาคลอเตตราไซคลินจะเกิดการสลายตัวได้เร็วที่สุดซึ่งจะเปลี่ยนเป็นไอโซคลอเตตราไซคลินทันทีที่พีเอช (pH) 7.5 คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของยากลุ่มเตตราไซคลินคือสามารถรวมตัวกับอิออนของพวกไดวาเลนท์และไตรวาเลนท์เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำซึ่งสารละลายออกซีเตตราไซคลินจะมีสีคล้ำได้เร็วกว่าสารละลายเตตราไซคลินและสารละลายคลอเตตราไซคลิน

1.3.3 การดูดซึม การกระจาย การขับถ่ายและการออกฤทธิ์[22]

1.3.3.1 การดูดซึม

เตตราไซคลินชนิดต่างๆ นั้นมีความแตกต่างกันในแง่ของการจับโปรตีน อัตราการดูดซึมและอัตราของการขับถ่ายออกจากร่างกาย เช่น ออกซีเตตราไซคลินจับกับโปรตีนได้เพียง 20% ในขณะที่คลอเตตราไซคลินจับได้มากถึง 50-70% ส่วนค่าครึ่งชีวิตของยานั้นก็อาจจะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 6 – 120 ชั่วโมง

เตตราไซคลินชนิดรับประทานนั้นถูกดูดซึมได้ดีทางกระเพาะอาหารและลำไส้ในเวลาที่ท้องว่าง แต่เนื่องจากยาระคายเคืองกระเพาะอาหารทำให้มีอาการคลื่นไส้อาเจียนได้ จึงควรรับประทานเตตราไซคลินหลังอาหารทันที นอกจากนี้ยาและสารบางอย่างสามารถจะทำปฏิกิริยากับเตตราไซคลินเกิดสารประกอบเชิงซ้อนทำให้ดูดซึมไม่ได้ เช่น แคลเซียมในนมและอาหารที่ทำจากนม เมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของแคลเซียมทำให้ตัวยาไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้จึงลดการดูดซึมของยาไป นอกจากนี้พวกยาลดกรดต่างๆ ได้แก่ อะลูมินัมไฮดรอกไซด์ เจล (Aluminum hydroxide gel), โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate), แคลเซียมและแมกนีเซียมซัลเฟต (Calcium and Magnesium sulfate) และเหล็กสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้ ทั้งนี้ยาลดกรดยังไปเพิ่มพีเอช (pH) ของทางเดินอาหาร ทำให้ความคงตัวของเตตราไซคลินเปลี่ยนแปลงไป โดยปกติเตตราไซคลินมีความคงตัวดีในภาวะเป็นกรด ดังนั้นจึงไม่ควรผสมยากลุ่มนี้กับกลุ่มเพนนิซิลินและ Cephalosporins เพราะกลุ่มยาดังกล่าวถูกทำให้หมดฤทธิ์ในภาวะที่เป็นกรด

1.3.3.2 การกระจายตัวของยา

ยาจะเข้ารวมตัวกับโปรตีนและยาจะกระจายไปยังส่วนต่างๆ ได้ดีในสมอง น้ำลาย ของเหลวต่างๆ ในร่างกาย (Body fluid), น้ำไขข้อ (Synovial fluid), น้ำอสุจิ (Semen), ของเหลวในต่อมลูกหมาก (Prostatic fluid), กระจกตา (Cornea), แก้วตา (Lens) แต่ในของเหลวในลูกตา (Vitreous human) และน้ำไขสันหลังยาจะเข้าไปได้น้อย นอกจากนี้ยายังผ่านรกสู่ครรภ์และน้ำคร่ำ (amniotic fluid) ได้ดี ซึ่งเตตราไซคลินจะถูกเก็บไว้มากใน Reticuloendothelial cells ของตับ ม้าม ไขกระดูก และฟันส่วน Enamel

1.3.3.3 การขับออก

เตตราไซคลินจะถูกขับออกทางปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ ประมาณ 10% จะขับออกมากับอุจจาระโดยผ่านออกทางลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังถูกขับออกมาทางน้ำดี โดยขบวนการที่เรียกว่า “Biliary recycling” หรือ “Enterohepatic cycle”

1.3.3.4 การออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์

1. เตตราไซคลินจะออกฤทธิ์ลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Baterostatic)

2. ฤทธิ์ทางชีวเคมีของกลุ่มยาเตตราไซคลิน อาจแยกเป็น 3 ประการ มีรายงานว่าฤทธิ์ทั้ง 3 ประการนี้จะมีผลต่อจุลชีพและต่อเซลล์ของร่างกายด้วย ซึ่งเรียงลำดับความสำคัญดังต่อไปนี้

2.1) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของจุลชีพ โดยไปขัดขวางหน้าที่ของอาร์เอ็นเอ คือไม่ให้ไปเกาะกับไรโบโซม ทำให้ขบวนการสังเคราะห์โปรตีนของจุลชีพเสียไป

2.2) มีฤทธิ์รบกวนขบวนการฟอสฟอรีเลชั่นของการสร้างกลูโคส (Phosphorylation of glucose) ทั้งของจุลชีพและเซลล์ร่างกาย

2.3) มีฤทธิ์เป็นคีเลตติ้งเอเจนต์ต่อโลหะทั้งชนิดไตรวาเนท์และไดวาเลนท์ ยากลุ่มนี้จึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่มที่โลหะดังกล่าวเป็นโคแฟคเตอร์ร่วมอยู่ด้วย

1.3.4 การดื้อยา[20]

เชื้อแบคทีเรียดื้อยากลุ่มเตตราไซคลินทั้งแบบโครโมโซม (Chromosome) และ พลาสมิด (Plasmid) N.gonorrhoeae ดื้อต่อเตตราไซคลินโดยวิธี Mutation คือการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม ส่วน E.coil ดื้อแบบพลาสมิดจะถ่ายทอดระหว่างสายพันธุ์เดียวกันหรือถ่ายทอดไปยังสายพันธุ์อื่นหรือ species อื่นได้ เชื้อจะดื้อต่อยานี้ โดยลดการซึมผ่านของเตตราไซคลินเข้าไปในเซลล์ของเชื้อและทำให้ยาสะสมอยู่ในเซลล์น้อยลง นอกจากเชื้อจะดื้อต่อเตตราไซคลินชนิดต่างๆ แล้วยังอาจดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น คลอแรมเฟนิคอล ซัลฟา และอะมิโนกลัยโคไซด์

การแบ่งชนิดของเตตราไซคลินอาจจำแนกตามระยะเวลาการออกฤทธิ์ออกเป็น 3 ประเภท คือ

1.3.4.1 Short - acting ได้แก่ Tetracycline hydrochloride, Chlortetracycline, Oxytetracycline

1.3.4.2 Intermediate - acting ได้แก่ Demeclocycline, Methacycline

1.3.4.3 Long - acting ได้แก่ Doxycycline, Minocycline

1.3.5 ปฏิกิริยาระหว่างยา[20]

1.3.5.1 แคลเซียม อะลูมิเนียม แมกนีเซียม เหล็ก จะรวมตัวกับเตตราไซคลินทำให้การดูดซึมจากทางเดินอาหารได้น้อยลง จะมีระดับยาในเลือดต่ำ ยาเหล่านี้จะใช้ไม่ได้ผลในกรณีการติดเชื้อรุนแรงที่ต้องการระดับยาสูง

1.3.5.2 Carbamazepine, Phenytoin และ Barbiturate จะทำให้ Doxycycline เปลี่ยนสภาพที่ตับเร็วขึ้น ค่าครึ่งชีวิตจะลดลง

1.3.5.3 เตตราไซคลินจะทำให้ Digoxin มี Bioavailability เพิ่มขึ้น มีระดับยา Digoxin ในเลือดสูงมากจนอาจทำให้เป็นพิษ ปฏิกิริยาระหว่างยานี้คงฤทธิ์อยู่นานเป็นเดือน ถึงแม้ว่าจะหยุดยาเตตราไซคลินแล้ว

1.3.5.4 ผู้ป่วยที่ได้รับยาสลบ Methoxyflurane ขณะผ่าตัด ถ้าให้เตตราไซคลินจะเสริมการเป็นพิษต่อไต อาการรุนแรงและถึงตายได้

1.3.5.5 เตตราไซคลินจะทำให้ยาต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดรับประทาน เช่น Coumarin ออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นเนื่องจากเตตราไซคลินยับยั้งฤทธิ์ของ Prothrombin

1.3.5.6 เตตราไซคลินต้านฤทธิ์เพนนิซิลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

1.3.6 การใช้และวิธีใช้ยา[20]

เตตราไซคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ค่อนข้างอันตราย ดังนั้นในการใช้ควรใช้อย่างระมัดระวัง ซึ่งขนาดการใช้ยาแสดงดังตาราง 1.1

ตาราง 1.1 ขนาดการใช้ยาเตตราไซคลินชนิดต่างๆ ในผู้ใหญ่

ชนิดของยา	ปริมาณยาทั้งหมดต่อวัน (กรัม)	จำนวน Doses
Chlortetracycline	1	4 (250 มิลลิกรัม 4 ครั้ง/วัน)
Doxycycline	1	4 (250 มิลลิกรัม 4 ครั้ง/วัน)
Oxycycline	1	4 (250 มิลลิกรัม 4 ครั้ง/วัน)
Tetracycline	0.6	4 (250 มิลลิกรัม 4 ครั้ง/วัน) หรือ 2 (300 มิลลิกรัม 2 ครั้ง/วัน)

1.4 น้ำนม[23]

นมเป็นของเหลวที่หลั่งออกมาจากเต้านมของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ว่าจะเป็นคน หรือสัตว์อื่นๆ ที่เลี้ยงลูกด้วยนมมักจะเป็นสีขาว ตามสัญชาติญาณของสัตว์ที่เกิดใหม่แม้เพียงแค่วันแรกนมก็เป็นสิ่งที่สามารถใช้เป็นอาหารได้ทันที แถมยังมีประโยชน์มากมาย โดยนมนั้นมีส่วนประกอบที่สำคัญได้แก่ น้ำ ไขมัน โปรตีน น้ำตาล และเถ้า นมแม้จะมีปริมาณวิตามินซี และเหล็กต่ำ แต่ก็จัดว่าเป็นอาหารที่เกือบสมบูรณ์ที่สุดของมนุษย์รวมทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และที่สำคัญน้ำตาลนมหรือแล็กโทส (Lactose) และโปรตีนที่เรียกว่า เคซีน (Casein) จะพบในธรรมชาติคือในนมเท่านั้น นมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาร่างกายและสมองของเด็กและเยาวชน นอกจากนี้ยังเหมาะสมสำหรับคนทุกเพศทุกวัยด้วย

1.4.1 ประเภทของนม

นมแบ่งออกเป็นประเภท ตามกระบวนการผลิต อาจแบ่งได้เป็น 6 ประเภท ดังนี้

1.4.1.1 นมสด

คือนมธรรมชาติที่รีดมาจากแม่โค นำมาผลิตเป็นนมสดได้ 3 ชนิด คือ นมสดธรรมดา นมสดพร่องมันเนย และนมสดขาดมันเนย

1.4.1.2 นมผง

คือนมสดที่ทำให้น้ำระเหยไปจนเป็นผง มี 3 ชนิด คือนมผงธรรมดา หรือนมผงพร้อมมันเนย (Dry whole milk) นมผงพร่องมันเนย และนมผงขาดมันเนย (Skimmed milk)

1.4.1.3 นมข้น

คือนมสดที่ระเหยเอาน้ำบางส่วนออก จึงมีความเข้มข้นมากขึ้น และอาจมีการเติมน้ำตาลหรือไม่ก็ได้ มี 4 ชนิด คือ นมข้นไม่หวาน นมข้นหวาน นมข้นขาดมันเนยไม่หวาน และนมข้นขาดมันเนยชนิดหวาน การทำให้นมข้นมีรสหวาน โดยการเติมน้ำตาลมักใช้ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 45-50 เป็นความเข้มข้นที่ช่วยเก็บรักษาคุณภาพผลิตภัณฑ์นมข้นหวานไว้ได้นาน เพราะน้ำตาลช่วยเพิ่มความดันออสโมติก ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโต จะเห็นได้ว่านมข้นหวานเป็นนมที่มีปริมาณน้ำตาลสูงมาก และยิ่งถ้าเป็นนมข้นขาดมันเนยชนิดหวานจะมีคุณค่าทางอาหารต่ำ มีน้ำตาลสูง จึงมีคุณค่าต่อเด็กน้อย และมีผลทำให้เกิดฟันผุได้ค่อนข้างมาก

1.4.1.4 นมคืนรูป

คือผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากการนำเอาส่วนประกอบของนมสด ซึ่งได้แยกออกแล้วมาผสมกันขึ้นใหม่ มีลักษณะเช่นเดียวกับนมสดหรือนมข้น มี 5 ชนิด คือ นมคืนรูปธรรมดา นมข้นคืนรูปไม่หวาน นมข้นคืนรูปหวาน นมข้นขาดมันเนยคืนรูปไม่หวาน นมแปลงไขมัน

1.4.1.5 นมปรุงแต่ง (Falvoured milk)

คือนมหรือนมผงที่ปรุงแต่งด้วยสี กลิ่น หรือรส ไม่ว่าจะมีการเติมวัตถุที่มีคุณค่าทางอาหารอื่นใดหรือไม่ สิ่งที่นำมาปรุงแต่งต้องไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพนมปรุงแต่งมี 2 ชนิด คือ ชนิดเหลว และชนิดแห้ง นมปรุงแต่งที่นิยมมีหลายชนิด เช่น

1. นมปรุงแต่งรสหวาน
2. นมปรุงแต่งช็อกโกแลต

ประกอบด้วยน้ำนมประมาณร้อยละ 94 น้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 และผงโกโก้ร้อยละ 1 ผงโกโก้ทำให้การดูดซึมแคลเซียม และฟอสฟอรัสลดลง

3. นมปรุงแต่งกาแฟ

ประกอบด้วยน้ำนมประมาณร้อยละ 94 น้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 และผงกาแฟร้อยละ 1

4. นมปรุงแต่งรสสตรอเบอร์รี่

ประกอบด้วยน้ำนมประมาณร้อยละ 9 5 น้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 นมปรุงแต่งทุกชนิดมักเติมน้ำตาลซูโครสเพื่อช่วยเพิ่มรสหวาน แต่ละชนิดมีสัดส่วนของน้ำตาลไม่เท่ากัน นมปรุงแต่งรสผลไม้ เช่น รสส้ม รสสตรอเบอร์รี่ มักเติมน้ำตาลในปริมาณมากขึ้น เพื่อปรับ

รสเปรี้ยวให้กลมกล่อม

1.4.1.6 นมเปรี้ยว (Cultured milk)

คือนมหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมที่หมักด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดพิษ อาจเติมวัตถุอื่นที่จำเป็นต่อกรรมวิธีการผลิตหรือปรุงแต่งสี กลิ่น รส ด้วยก็ได้ นมเปรี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการเปลี่ยนน้ำตาลในนมให้เป็นกรดและมักปรุงแต่งรสโดยเติมน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 15 นมเปรี้ยวบางชนิดมีนมขาดมันเนยเพียงร้อยละ 50 ส่วนประกอบที่เหลือเป็นน้ำตาล จึงมีคุณค่าทางอาหารน้อย ไม่เหมาะให้เด็กดื่ม เช่น ยาคูลท์ เป็นเครื่องดื่มที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นมิตร

1.4.2 กระบวนการผลิตนม[24] [25]

แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1.4.2.1 แบบพาสเจอร์ไรส์เซชั่น (Pasteurization process)

เป็นกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยใช้อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส โดยอุณหภูมิในการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์อยู่ที่ 85 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ทั้งนี้จะผ่านกรรมวิธีการทำนมให้เป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ก็ได้ นมที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อนี้ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส ระยะเวลาไม่เกิน 3 วันนับตั้งแต่วันที่บรรจุในภาชนะบรรจุ

1.4.2.2 แบบเทอร์ไมซ์เซชั่น (Thermization process)

เป็นกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนเพื่อการฆ่าเชื้อเบื้องต้นโดยใช้อุณหภูมิ 63-65 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และเก็บรักษาไว้ในแท็งค์ไม่เกิน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ต้องผ่านกรรมวิธีทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน นมที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อนี้เก็บในอุณหภูมิห้องได้ไม่น้อยกว่า 7 วัน ส่วนใหญ่บรรจุกระป๋อง

1.4.2.3 แบบยู.เอช.ที (Ultra High Temperature: U.H.T. process)

เป็นกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิเกินกว่า 133 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า 1 วินาที ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ทั้งหมดรวมทั้งสปอร์ของแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง (Thermophilic bacteria) นอกจากนี้ต้องบรรจุในภาชนะและสภาวะที่ปราศจากเชื้อและต้องผ่านกรรมวิธีทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน นมที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อนี้เก็บในอุณหภูมิห้องได้นานไม่น้อยกว่า 7 วันนับตั้งแต่วันที่บรรจุ วิธีนี้พบว่าแพร่หลายที่สุดในขณะนี้ เนื่องจากกรรมวิธีนี้ทำให้นมมีการเปลี่ยนแปลงด้านกลิ่นและสีน้อยมาก ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่ต้องเก็บในตู้เย็นจึงสะดวกและเหมาะสมสำหรับการนำไปไหนด้วย ปกติแล้วนมที่ใช้กรรมวิธีฆ่าเชื้อแบบนี้จะอยู่นานถึง 6 เดือน

1.4.3 เกณฑ์มาตรฐานสำหรับควบคุมสิ่งปนเปื้อนของสารกลุ่มเตตราไซคลินในนม [26]

กำหนดไว้โดย The European Agency for the Evaluation of Medicines

Products (EMEA) ว่าให้มีดอกซีไซคลิน คลอเตตราไซคลิน ออกซีเตตราไซคลิน และเตตราไซคลินในตัวอย่างนมได้ไม่เกิน 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

1.5 ผลกระทบจากเตตราไซคลิน [20]

ถึงแม้ว่าเตตราไซคลินเป็นยาที่ใช้ในการต้านแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด แต่มันมีผลข้างเคียงซึ่งออกฤทธิ์ต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น

1.5.1 ผลต่อระบบทางเดินอาหาร

เตตราไซคลินจะระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหาร ความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับขนาดของยาที่ใช้ อาการที่พบคือ คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ท้องเสีย ท้องอืด ท้องเฟ้อ แสบหน้าอก นอกจากนี้อาจทำให้เกิดการอักเสบที่ปาก ที่ลิ้น เจ็บคอ จึงควรให้เตตราไซคลินหลังรับประทานอาหารทันที และไม่ควรให้ยาก่อนนอน

1.5.2 การติดเชื้อแทรกซ้อน

เตตราไซคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิดโดยจะไปทำลาย Normal flora โดยเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวานหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกับบกพร่อง จะทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนจากเชื้อรา และแบคทีเรียอื่นๆ เช่น ทำให้เกิดท้องเดิน มีไข้จากเชื้อ Staphylococci เกิดการติดเชื้อรา Candida albicans ในช่องปาก ลำคอ ช่องคลอด หรือทางเดินอาหาร

1.5.3 ผลต่อกระดูกและฟัน

โดยเตตราไซคลินจะไปจับกับแคลเซียมที่กระดูกและฟัน ยับยั้งการเจริญของกระดูกและฟัน เตตราไซคลินที่เกาะบริเวณฟันจะทำให้ฟันมีสีน้ำตาล เมื่อถูกแสงสีน้ำตาลจะยิ่งเข้มขึ้นเนื่องจากยากลุ่มนี้สามารถผ่านรกได้ ดังนั้นถ้าใช้ขณะตั้งครรภ์จะทำให้ฟันน้ำนมของทารกมีสีน้ำตาล แต่จะไม่มีผลต่อฟันแท้ จึงไม่ควรใช้ยากลุ่มนี้ในหญิงมีครรภ์

1.5.4 ปฏิกิริยาต่อผิวหนัง

เตตราไซคลินทุกชนิดทำให้ผิวหนังแพ้ต่อแสง ผิวไหม้ รู้สึกซาบริเวณที่ถูกแสง

1.5.5 ผลต่อตับ

เตตราไซคลินอาจทำลายตับได้ ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย ดีซ่าน อาจมีผลต่อตับอ่อนอักเสบร่วมด้วย

1.5.6 ผลต่อไต

เตตราไซคลินซึ่งหมดอายุจะมีพิษต่อไต เกิดอาการพิษที่เรียกว่า “Fanconi-like-syndrome” กล่าวคือ จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน กรดอะมิโน น้ำตาลกลูโคส แลแคลเซียม โดยเกิดจากการที่ได้รับยาสลบ Methoxyflurane ขณะผ่าตัด ถ้าได้รับเตตราไซคลินจะเสริมอาการเป็นพิษต่อไต อาการอาจรุนแรงถึงตายได้

1.5.7 อื่นๆ

การแพ้ยาเตตราไซคลินพบได้ไม่บ่อยเท่ายาเพนิซิลลิน โดยลักษณะผื่นแพ้ขึ้นที่เดิมทุกครั้งที่ใช้ยาเตตราไซคลิน เรียกว่า “Fix-drug eruption” พบได้ที่อวัยวะเพศและอาจพบที่อื่นๆ ได้

1.6 เทคนิคการวิเคราะห์หาเตตราไซคลินในน้ำนม

สำหรับการวิเคราะห์หายากลุ่มเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนมมีการใช้เทคนิคต่างๆ มากมาย ยกตัวอย่างเช่น

1.6.1 อิมมูโนแอสเซย์ (Immunoassays)[27] เป็นวิธีการวิเคราะห์ในแบบวัฏภาคของแข็งที่มีแอนติเจนหรือแอนติบอดี้ซึ่งใช้เป็นตัวตรวจสอบติดอยู่กับผิวของของแข็ง ซึ่งมักเป็นโพลีเมอร์อย่างเช่น โพลีไวนิลคลอไรด์ วิธีอิมมูโนแอสเซย์ทุกแบบมีการใช้ระบบแจ้งเพื่อแสดงให้ทราบว่าได้มีการตรวจสอบเป้าหมายเฉพาะแล้ว เรดิโออิมมูโนแอสเซย์ (radioimmunoassays) มีการใส่ไอโซโทปกัมมันตรังสีเข้าไปในโมเลกุลเพื่อเป็นตัวแจ้งชี้ (radioactive indicator label) เอ็นไซม์อิมมูโนแอสเซย์ที่ทำปฏิกิริยากับซับสเตรตต่างๆ ซึ่งแสดงคุณสมบัติฟลูออเรสเซนซ์ กัมมันตรังสี เคมิลูมิเนสเซนส์ (chemiluminescence) การเกิดสีสำหรับฟลูออเรสเซนซ์อิมมูโนแอสเซย์ ใช้สีย้อมเรืองแสง (fluorescent dye) สำหรับแสดงปฏิกิริยาบวกในฟลูออเรสเซนซ์อิมมูโนแอสเซย์ อิมมูโนแอสเซย์วัฏภาคของแข็งที่ใช้ค้นหาแอนติเจนของจุลินทรีย์มักใช้เทคนิคแซนด์วิชพร้อมด้วยระบบแจ้งโดยตรงหรือแจ้งโดยอ้อม แอนติบอดี้ติดอยู่กับวัฏภาคของแข็งใส่ตัวอย่างลงไปข้างแอนติเจน ส่วนที่ไม่ได้ติดกำจัดออกไปด้วยการล้าง แอนติเจนที่ถูกจับใช้พิสูจน์ทราบโดยการเติมแอนติบอดี้ของตัวตรวจสอบ (detector antibody, DA) ในระบบแจ้งโดยตรง ติดฉลาก (label) DA ด้วยตัวแจ้ง ส่วนการตรวจสอบโดยอ้อมไม่มีการติดฉลาก แต่ตรวจพิสูจน์ด้วยการเติมแอนติบอดี้ ซึ่งติดฉลากเข้าไปในตัว DA วิธีอิมมูโนแอสเซย์รูปแบบต่างๆ มากมายได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจสอบไวรัสและแบคทีเรีย

1.6.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)[28] เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบใน Stationary Phase ของคอลัมน์โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับ Detector จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (Analytes or Solutes) ได้อย่างต่อเนื่องสามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low Volatile Substation) หรือน้ำหนักโมเลกุลสูง (High Molecular Weight Compounds) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย สามารถใช้วิเคราะห์สารได้หลากหลาย ให้ผลที่ถูกต้อง มีความแม่นยำสูงและรวดเร็ว นอกจากนี้ HPLC สามารถแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารหลายชนิดได้พร้อมกัน (Simultaneous analysis)

1.6.3 เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโทเมตรี (UV-VIS Spectrophotometry)[28, 29] เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และ สารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในการระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้

1.6.4 เทคนิคคาปิลารี อิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary electrophoresis ; CE)[30] จัดว่าเป็นเทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์ มีพัฒนาการมาจาก Electrophoresis ที่ใช้กันมานาน และยังใช้กันมากถึงปัจจุบันในการวิเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลิก ใน CE นั้นการแยกสารเกิดขึ้นภายใน Capillary ซึ่งมีขนาดเล็กมาก (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 - 100 mm) ทำให้สามารถกระจายความร้อนที่เกิดจากการที่มีกระแสไฟฟ้าผ่านได้ดีกว่า Electrophoresis แบบดั้งเดิม ผลที่ตามมาคือลดการแพร่ (Diffusion) ของสารที่ทำการวิเคราะห์ ทำให้ได้ประสิทธิภาพในการแยกสูง (High Efficiency) และสมบูรณ์ (High Resolution) หลักการของ CE เป็นเช่นเดียวกับ Electrophoresis คือ สารที่มีขนาดและประจุต่างชนิดกันจะแสดงลักษณะการเคลื่อนที่ต่างกัน เนื่องจากแรงดูดและแรงผลักเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า (Electric Field) หลักการนี้พบโดย Tiselius ในปี ค.ศ. 1933 ผู้ซึ่งต่อมาได้รับรางวัลโนเบิลไพรส์

1.6.5 โฟล์วอินเจคชันอะนาไลซิส (Flow injection analysis ; FIA)[28, 31] เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่มีสารละลายไหลอย่างต่อเนื่องภายในระบบท่อพลาสติกหรือ เทฟลอน (teflon) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาดเล็ก (0.51.0 mm) โดยไม่มีช่องอากาศคั่น ซึ่งทำได้โดยการฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่กระแสของรีเอเจนต์ (reagent) ที่ไหลอยู่ในระบบท่ออย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมและคงที่ตลอดการทดลอง สารละลายตัวอย่างจะแพร่กระจายในกระแสของรีเอเจนต์ภายในท่อ เกิดเป็น sample plug และแล้วจะถูกพาไปยังอุปกรณ์ที่เกิดการผสมแล้วเกิดปฏิกิริยา (mixing reactor) เป็นที่ซึ่งเกิดปฏิกิริยาเคมี เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ขึ้นแล้วไหลตามกระแสรีเอเจนต์เข้าสู่ โฟล์วธรูเซล (flow through cell) ของเครื่องตรวจวัด (detector) โดยเทคนิคดังกล่าวมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง อาทิ อุตสาหกรรม การแพทย์ เกษตรกรรม ฯลฯ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความหลากหลายในตัวสามารถดัดแปลงได้หลายรูปแบบ เช่น FI-spectrophotometry, FI-atomic absorption spectrophotometry, stopped flow system

เป็นต้น

1.6.6 ฟลูออเรสเซนต์สเปคโทรสโคปี (Fluorescence spectroscopy)[32] เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสารโดยการอาศัยการดูดกลืนรังสียูวีที่ส่งผลให้โมเลกุลถูกกระตุ้นและมีการสั่นภายในโมเลกุลจากระดับชั้นพลังงานสถานะพื้น (ground state) ไปสู่ระดับชั้นพลังงานที่สูงขึ้น (excited state) เรียกว่าการดูดพลังงาน (excite energy) โมเลกุลที่มีการเคลื่อนที่ไปอยู่ในระดับของชั้นพลังงานที่สูงจะไม่มีความเสถียร จึงมีการปลดปล่อยพลังงานและตกลงมาในชั้นระดับพลังงานที่ต่ำกว่า พลังงานที่โมเลกุลปลดปล่อยจากระดับชั้นพลังงานกระตุ้นชั้นที่หนึ่งสู่ระดับชั้นพลังงานสถานะพื้นจะทำให้เกิดการคายโฟตอน (emission of photon) ทำให้เกิดสเปกตรัมในช่วงฟลูออเรสเซนต์ ณ ค่าพลังงานที่กระตุ้นที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด ซึ่งการเรืองแสงแบ่งออกเป็นการเรืองแสงของโมเลกุลหรือ Molecular Fluorescence และการเรืองแสงของอะตอม หรือ Atomic Fluorescence ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่เร็ว มีความไว โดยฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีเป็นเทคนิคสำหรับการประเมินคุณสมบัติทายกายภาพและทางเคมีของสารโดยการวิเคราะห์ความเข้มและลักษณะของแสงที่ปล่อยออกมาในรูปแบบของการเรืองแสง หรือฟลูออเรสเซนส์ เทคนิคนี้ถูกใช้อย่างกว้างขวางมานานกว่าร้อยปีในสาขาวิทยาศาสตร์ และถูกในมาประยุกต์ใช้ในงานหลายประเภทด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาทางพิษวิทยา การศึกษาทางการแพทย์ การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น วิตามิน และสารอาหาร สารอินทรีย์ พลาสติก ยางสังเคราะห์และยางธรรมชาติ และอื่นๆ อีกมากมาย

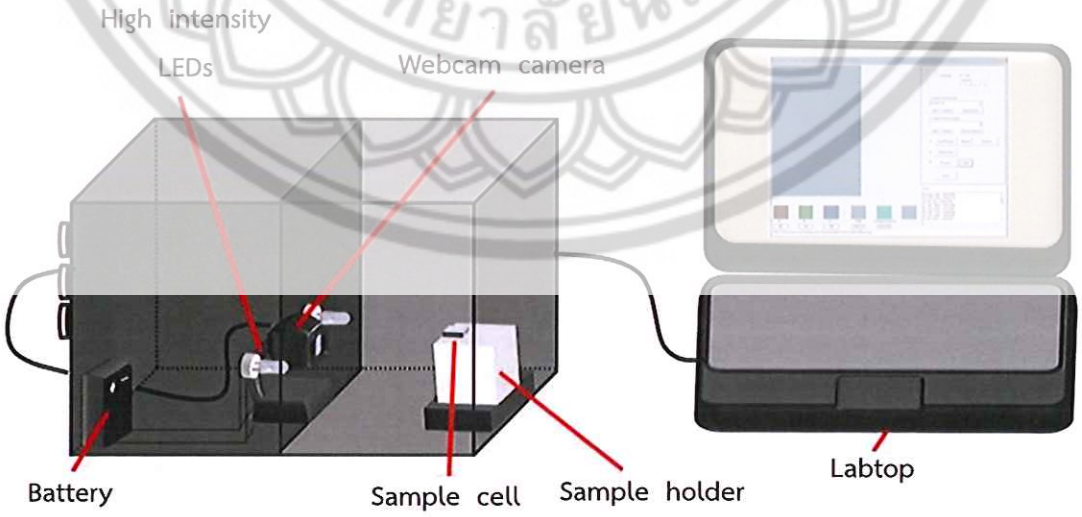
1.6.7 แมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry) [28, 33] คือเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้หลักการการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออน (ionization) ในส่วนประกอบแรกของเครื่องมือที่เรียกว่า ส่วนผลิตไอออน (ionization source) โดยมีวิธีการเปลี่ยนสารตัวอย่างหลายวิธี เช่น ใช้ลำอิเล็กตรอนเข้าชน (electron impact) เป็นต้น เมื่อสารตัวอย่างเปลี่ยนไปเป็นไอออนแล้วจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ที่มีหลายประเภทเช่นกัน ตัวอย่างเช่น ควอดรูโพล (Quadrupole) ที่ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าและคลื่นความถี่วิทยุในการจำแนกมวล ส่วนประกอบสุดท้ายได้แก่ส่วนตรวจวัด (detector) ทำหน้าที่เป็นฉากรับเมื่อมีไอออนมาตกกระทบเพื่อส่งข้อมูลไปยังส่วนประมวลผลได้แก่ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม เพื่อจะแสดงผลออกมาในกราฟที่มีชื่อเรียกเฉพาะว่า แมสสเปกตรัม (Mass Spectrum) ที่มีแกนตั้งเป็นค่า relative intensity และแกนนอนเป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z) เทคนิคนี้ใช้ในการหามวลโมเลกุล (molecular mass) องค์ประกอบของธาตุ โครงสร้างและเคมิคอลสปีชี่ (chemical species)

เทคนิคดังกล่าวถึงแม้ว่าจะมีความสามารถในการวิเคราะห์ที่สูง แต่เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงคิดที่จะหาวิธีการทดสอบหาสาร

ตกค้างในน้ำนมแบบง่ายๆ คือการหาปริมาณสารตกค้างด้วยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยการจดจำค่าสี RGB ของภาพถ่ายมาตรฐานที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับทองแดง(II) และเหล็ก(III) โดยเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว และเป็นเทคนิคที่ใช้การตรวจสอบความเข้มข้นของเตตราไซคลิน และออกซีเตตราไซคลินจากฐานข้อมูล ทำให้ไม่จำเป็นต้องเตรียมสารมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ และเพื่อตรวจสอบความถูกต้องจึงทำการเปรียบเทียบเทคนิคดังกล่าวนี้ควบคู่กับเทคนิคสเปคโทรโฟโทเมตรีซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและเพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีด้วย

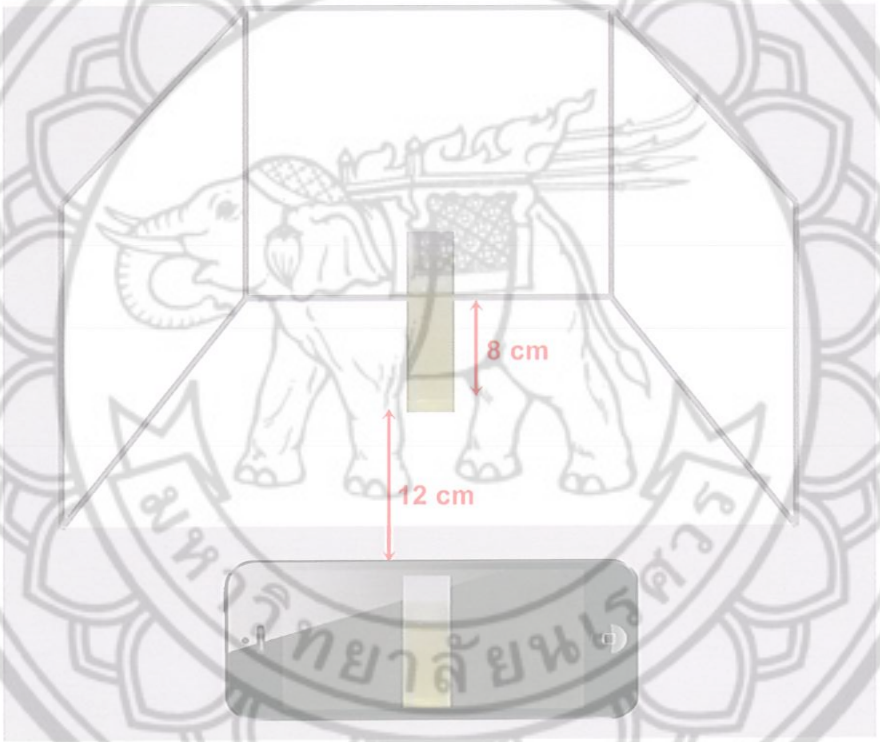
1.7 เทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี (Digital image-based colorimetry ; DIC)[34]

เครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์ดังรูป 1.2 ประกอบด้วยกล่องควบคุมแสงซึ่งภายในกล่องประกอบด้วย ส่วนของแหล่งกำเนิดแสงซึ่งใช้หลอดไดโอดเปล่งแสงสีขาว (LED) เซลล์ใส่สารตัวอย่าง ตัวยึดตำแหน่งเซลล์ใส่สารตัวอย่างซึ่งทำมาจากพลาสติกสีขาวและกล่องถ่ายภาพขนาดเล็กที่มีเซนเซอร์ชนิดซีมอส (CMOS webcam camera) ในการถ่ายภาพสารละลายสีโดยอาศัยการสะท้อนของแสง ภาพถ่ายที่ได้จะเข้าสู่การประมวลผลด้วยโปรแกรมโครงข่ายประสาทเทียม (Artificial neural network; ANN) การออกแบบโปรแกรมสำหรับประมวลผลค่าสีแดง เขียว น้ำเงิน (Red, Green, Blue; RGB) ของสารละลายตัวอย่าง จะใช้เทคนิคโครงข่ายประสาทเทียม แบบ Back Propagation Neural Network (BPNN) โดยจะนำเข้าภาพถ่ายสีดิจิตอลในนามสกุล “jpg” เข้าสู่โปรแกรมแล้วทำการตัดภาพเลือกเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด แล้วเข้าสู่กระบวนการประมวลผลค่าสี RGB ในการนำเข้าข้อมูลค่าสี RGB จะทำการสุ่มวัดค่าสี RGB จำนวน 3000 ครั้งต่อภาพเข้าสู่โปรแกรม และประมวลค่าสี RGB ของสารละลายตัวอย่างเทียบกับค่าสี RGB ของสารมาตรฐานแล้วแปลค่าที่ได้ออกมาเป็นความเข้มข้น



รูป 1.2 เครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์

แต่เพื่อให้สะดวกและง่ายต่อการทำการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงคิดหาวิธีที่ง่ายต่อการวิเคราะห์ และสามารถทำการวิเคราะห์ได้สะดวกในทุกที่เพียงแค่มีโปรแกรมโครงข่ายประสาทเทียม สำหรับประมวลผลจากภาพถ่าย โดยในงานวิจัยนี้จะทำการถ่ายภาพจากกล้องโทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะชนิด iPhone 4S แล้วนำภาพเข้าสู่การประมวลผลโครงข่ายประสาทเทียม โดยตั้งสภาวะที่แน่นอนโดยทำการตั้งสถานที่ถ่ายภาพที่เดียวกันทุกครั้ง วัดแสงให้ได้ 300 lux ระยะห่างของเซลล์บรรจุสารละลายจากฉากด้านหลังเท่ากับ 8.00 เซนติเมตร ระยะห่างของกล้องจากเซลล์บรรจุสารละลายเท่ากับ 12.00 เซนติเมตร ดังรูป 1.3 และภาพถ่ายที่ได้จะเข้าสู่การประมวลผลด้วยโปรแกรมโครงข่ายประสาทเทียมต่อไป



รูป 1.3 แสดงการถ่ายภาพด้วยกล้องโทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะชนิด iPhone 4S

1.8 หลักการของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer)[28]

เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่าความเข้ม (intensity) ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้น

ที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆ ตามกฎของเบียร์ แลมเบิร์ต (Beer-Lambert) ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันตรง กับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้

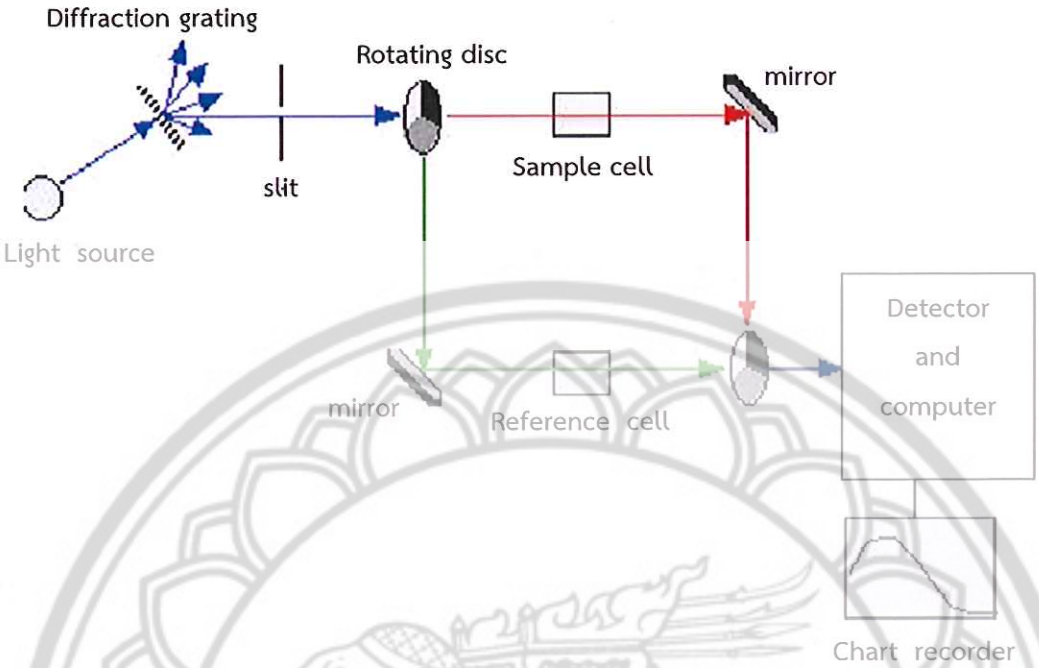
ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ดังรูป 1.4 ประกอบด้วย

1. แหล่งกำเนิดแสง (light source) แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วย หลอดกำเนิดแสง มีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง ตัวอย่างแหล่งกำเนิดแสงช่วงยูวี (ultraviolet ; UV) ใช้หลอดไฮโดรเจนและดิวเทอเรียม (H_2 and D_2 lamp) ให้ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง160-380 nm ชนิดของสเปกโทรสโกปี UV เป็นแบบ molecular absorption และช่วงวิสิเบิล (visible) ใช้หลอดทังสเตน/ฮาโลเจน (Tungsten/halogen) ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 nm ชนิดของสเปกโทรสโกปีเป็นแบบ UV/visible/near-IR molecular absorption

2. โมโนโครมาเตอร์ (Monochromator) ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์ (กระจกสี) ปริซึม (prism) หรือ เกรตติ้ง (grating)

3. เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่างบางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวทท์ (cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา จะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ตซ์ (quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

4. เครื่องตรวจวัด (Detector) ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้า เครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon diode detector)



รูป 1.4 ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

1.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำสัตว์ที่มีศักยภาพทางพันธุกรรมสูงเข้ามาเลี้ยงในฟาร์มมีระบบป้องกันรักษาสุขอนามัยที่ดี มีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ โดยการเติมลงในอาหารสัตว์เพื่อทำให้สัตว์สามารถให้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่ผลของการใช้ยาและสารเคมีนี้ทำให้เกิดปัญหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ดังนั้นจึงมีการหาแนวทางใหม่ๆ ที่ทำให้สัตว์สามารถเติบโตได้ดีและมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตสูงสุดเท่าเดิม และไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ปัจจุบันประเทศต่างๆโดยเฉพาะกลุ่มยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา ญี่ปุ่น และออสเตรเลีย มีข้อกำหนดห้ามนำเข้าผลิตภัณฑ์สัตว์ที่มียาปฏิชีวนะตกค้าง เนื่องจากกลัวว่ายาปฏิชีวนะตกค้างจะเป็นสารก่อมะเร็ง และทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะในผู้บริโภค ดังนั้นการส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังประเทศต่างๆ เหล่านี้ต้องทำการตรวจหาปริมาณยาปฏิชีวนะตกค้างในหน่วยที่ละเอียดมาก เช่น หน่วย ppm , ppb[35]

จากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลิน นั้นได้มีผู้ทำการวิจัยไว้หลายท่านและมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น

ในปี 1987 Sultan และคณะ [36] ได้ทำการตรวจสอบหาสารกลุ่มเตตราไซคลินในยาโดยเทคนิคคอมเพล็กโซเมทริกสเปกโทรโฟโทเมตรี (Complexometric – Spectrophotometry) ซึ่งทำโดยการเติมสารละลายเฟอร์ริกแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มี

สารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้น 0.001 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลายเพื่อให้เหล็ก(III) ทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มเตตราไซคลิน โดยพบว่าเมื่อทำวิธีของจ็อบ (Job) [37]แล้ว อัตราส่วนโดยโมลของเหล็ก(III) ต่อเตตราไซคลินที่เหมาะสมคือ 1 : 2 และปฏิกิริยาระหว่างเหล็ก(III) กับ เตตราไซคลินนั้นจะเกิดได้ดีหลังจากเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ลงในสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินแล้วเป็นเวลา 20 นาที โดยเทคนิคนี้ให้ผลทางสถิติที่น่าพอใจเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานอื่นๆ และยังพบว่ามีความแม่นยำ รวดเร็ว และง่ายอีกด้วย

ในปี 1999 Furusawa และคณะ[38] ได้ทำการทดสอบหาสารตกค้างออกซีเตตราไซคลินในน้ำนมโดยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งการเตรียมสารตัวอย่างสามารถทำได้โดยไม่ต้องสกัดด้วยวิธีที่ซับซ้อน ตัวตรวจวัดที่ใช้คือ diode array โดยผลการทดสอบมีค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 89.8% มีค่าสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 0.6-4.1% และขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.05 µg/mL

และในปีเดียวกันนั้น Boatto และคณะ[39] ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารตกค้างออกซีเตตราไซคลินในน้ำนมแกะที่มีปริมาณต่ำๆ ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1 mg/mL – 10 ng/mL มีค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรงสูงกว่า 0.996 ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 85.8% – 98.9% LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 5.2 และ 17.5 ng/mL ตามลำดับ

ในปี 2003 Cinquina และคณะ[40] ได้ทำการทดสอบหาสารตกค้างกลุ่มเตตราไซคลินในน้ำนมของวัวและเนื้อวัวโดยใช้เทคนิค HPLC ซึ่งใช้เครื่องตรวจวัดเป็น diode-array (HPLC-DAD) ทำการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี solid-phase extraction พบว่าปริมาณสารตกค้างสูงสุดในนมมีค่าสูงกว่า 81.1% และในกล้ามเนื้อพบถึง 83.2%

ในปีเดียวกันนั้นได้มีงานวิจัยของ Jevinova และคณะ[41] ได้ทำการหาออกซีเตตราไซคลินตกค้างในตัวอย่างนมด้วยเทคนิค HPLC โดยทำการศึกษาน้ำนมที่ได้รับจากวัวที่เป็นโรค intramammary ที่เต้านมและได้รับการรักษาด้วย oxymykoin เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดสอบพบว่ามีออกซีเตตราไซคลินเฉลี่ยสูงสุด 195.68 mg/kg

ในปี 2007 Fritz และ Zuo[42] ได้ทำการวิเคราะห์หาเตตราไซคลิน ออกซีเตตราไซคลิน และ 4 – เอพิเตตราไซคลิน ในนมโดยเทคนิค HPLC ซึ่งใช้เครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (Photodiode – array detector, HPLC – PAD) และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิกต่อสารละลายอะซิโตรไนไตรท์ต่อสารละลายเมทานอล (15 : 20 : 20 โดยปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร โดยในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนั้น จะใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid – phase extraction, SPE) เข้ามาช่วยทำความสะอาด เพื่อทำให้ตัวอย่างนั้นมีสิ่งเจือปนน้อยที่สุดก่อนนำเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งเทคนิคการสกัดนี้จะเริ่มจากเติมเมทานอลจำนวน 2 มิลลิลิตร ลงในแท่ง C18 SPE ที่อัตราการไหลน้อยกว่า 5 มิลลิลิตรต่อนาที ตามด้วยเติมสารละลาย McIlvane / EDTA ที่ pH เท่ากับ 2.9 จำนวน 2 มิลลิลิตร เพื่อทำให้แท่ง C18 SPE พร้อมสำหรับใส่ตัวอย่าง จากนั้นแล้วนำตัวอย่างทั้งหมดเติมลงไปที่อัตราการไหล 2 มิลลิลิตร

ต่อนาที และเติม 2% เมทานอลในน้ำจำนวน 2 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดน้ำตาลในนมออกให้หมด จากนั้นทำการชะตัวอย่างออกมาจากแท่ง C18 SPE โดยการเติมเมทานอล (HPLC grade) จำนวน 3 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปไล่เมทานอลออก โดยใช้แก๊สไนโตรเจนจนตัวอย่างเหลือ 1 มิลลิลิตร โดยขั้นตอนการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งนั้น จะใช้เวลาในการสกัดทั้งหมดประมาณ 15 นาที ซึ่งงานวิจัยนี้มีขีดกำจัดในการตรวจวัด (Detection of limits) อยู่ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร %Recovery ของเตตราไซคลิน ออกซีเตตราไซคลิน และ 4 – เอพิเตตราไซคลิน อยู่ที่ 91.5, 71.5 และ 83.1 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของสารทั้ง 3 ชนิดนี้ สำหรับการทำการทดลองในวันเดียวกันจะอยู่ที่ 4% ส่วนสำหรับการทำการทดลองระหว่างวันจะอยู่ที่ 7% ซึ่งเทคนิคนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์นมตามห้างสรรพสินค้าเพื่อหาปริมาณของเตร้าไซคลิน ออกซีเตตราไซคลิน และ 4 – เอพิเตตราไซคลิน โดยพบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง 44, 13 ถึง 106 และ 18 ถึง 65 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี 2007 Masawat และ Slater [43] ได้ทำการวิเคราะห์หาเตตราไซคลินในอาหารซึ่งใช้แผ่นอิเล็กโทรดที่เคลือบด้วยทองคำ (Screen – printed gold electrode, SPGF) โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic voltammetry) และเทคนิคโฟลอินเจคชัน (Flow injection) ซึ่งเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีนั้น จะเป็นการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นของเตตราไซคลิน พบว่าสัญญาณสูงสุดของพีคที่ขึ้นชัดเจนนั้น อยู่ที่ 1.2 โวลต์ เมื่อต่อกับขั้วซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) ในสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ pH เท่ากับ 2 และสำหรับเทคนิคโฟลอินเจคชันนั้นจะใช้ดีซีแอมเพอโรเมตรี (DC amperometry) ภายใต้สภาวะที่ให้ศักย์ไฟฟ้า เท่ากับ 1.2 โวลต์ และอัตราเร็วในการไหล เท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อกุ้งและไก่ปริมาณ 2.5 กรัม นั้นจะใช้บัฟเฟอร์ Na_2EDTA – Mallvaine ที่ pH เท่ากับ 4 จำนวน 12.5 มิลลิลิตร เติมลงไปในแท่ง C18 SPE ในขั้นตอนเริ่มแรกของการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง โดยจากผลการทดลองนั้นเมื่อสร้างกราฟมาตรฐานจะพบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงของเตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และออกซีเตตราไซคลิน คือ 1 ถึง 500, 5 ถึง 50 และ 1 ถึง 500 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับและขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 0.96, 0.58 และ 0.35 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี 2008 Fletouris และคณะ[44] ได้ทำการพัฒนาวิธีทดสอบหาออกซีเตตราไซคลินในนมแกะด้วยเทคนิคที่รวดเร็วและเฉพาะเจาะจงคือ ion-pair liquid chromatography ในระดับที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 20 µg/kg พบว่าร้อยละการกลับคืนมีค่าเท่ากับ 86% และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 4.6%

เพชรรัตน์ ศักดินันท์ และคณะ[45] ได้ทำการตรวจหายาคลอเตตราไซคลินและยาออกซีเตตราไซคลินในอาหารสัตว์ปีก 675 ตัวอย่าง อาหารสุกร 494 ตัวอย่างและอาหารโคนม 123 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดตรวจสอบชนิดยา ScreenEZ Tetra Test สำหรับการทดสอบเบื้องต้นและใช้เทคนิค HPLC

ในการตรวจหาปริมาณยา ตัวอย่างอาหารสัตว์ทั้งหมดเก็บจากฟาร์มในจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรีและเพชรบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม 2547- มกราคม 2549 ผลการตรวจพบยาคลอเตตราไซคลินในอาหารสัตว์ปีก 19 ตัวอย่าง (2.81%) โดยมีค่าเฉลี่ย 77.17 ppm ปริมาณยาอยู่ในช่วง 1.33 ถึง 172.20 ppm จังหวัดที่พบมากได้แก่ ราชบุรี นครปฐม และ เพชรบุรี 15.38%, 13.33% และ 3.50% ตามลำดับ ในอาหารสุกรตรวจพบ 200 ตัวอย่าง (40.49%) ปริมาณยาที่พบสูงมากถึง 908.78, 583.88, 371.54 และ 347.92 ppm ที่จังหวัดนครปฐม เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี ตามลำดับ ปริมาณยาเฉลี่ย 186.39 ppm อยู่ในช่วง 0.60 ถึง 908.78 ppm แต่ไม่พบในอาหารโคนม ในขณะที่ยาออกซีเตตราไซคลินพบเฉพาะในอาหารสุกร 13 ตัวอย่าง (2.63%) พบสูงถึง 337.29 และ 329.12 ppm ที่ราชบุรีและนครปฐมตามลำดับ ปริมาณยาเฉลี่ย 105.67 ppm อยู่ในช่วง 0.44 ถึง 337.29 ppm แต่ไม่พบในอาหารสัตว์ปีกและอาหารโคนม ผลการตรวจวิเคราะห์ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผู้เลี้ยงยังคงใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ปีกและสุกรในปริมาณสูงโดยเฉพาะยาคลอเตตราไซคลินในอาหารสุกร ซึ่งปริมาณที่พบมากพอที่จะทำให้เกิดยาตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ หน่วยงานของภาครัฐควรมีมาตรการควบคุมและกำกับดูแลการใช้ยาเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคต่อไป

อนงค์ บิณฑวิหค และคณะ[46] ได้ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อสุกร และน้ำนมโคชนิดละ 200 ตัวอย่างโดยสุ่มเก็บตัวอย่างจาก 10 แห่งในจังหวัดอยุธยา ชลบุรี นครปฐม กรุงเทพมหานครและปริมณฑลของประเทศไทยในช่วงเดือนกรกฎาคม-ธันวาคม พ.ศ.2543 นำมาทำการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างโดยใช้วิธี ELISA และ HPLC พบว่าในเนื้อไก่มียาเตตราไซคลินตกค้างร้อยละ 65 ในปริมาณ 20.05 – 25.95 ppb ซึ่งพบมากที่สุดในจังหวัดชลบุรี มียาคลอเตตราไซคลินตกค้างร้อยละ 12.5 ในปริมาณ 10.11 – 20.32 ppb ซึ่งพบมากที่สุดในจังหวัดนครปฐมแต่ไม่พบยาออกซีเตตราไซคลินตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่ที่ตรวจทั้งหมด ส่วนในเนื้อสุกรมียาเตตราไซคลินตกค้างอยู่ร้อยละ 40 ในปริมาณ 28.09 – 108.69 ppb มียาคลอเตตราไซคลินตกค้างร้อยละ 20 ในปริมาณ 61.02 – 107.0 ppb พบยาออกซีเตตราไซคลินตกค้างร้อยละ 12.5 ในปริมาณ 50.47 – 81.31 ppb สำหรับในน้ำนมโคพบว่ามียาเตตราไซคลินตกค้างร้อยละ 55 ในปริมาณ 3.30 – 8.47 ppb ซึ่งพบมากในจังหวัดชลบุรี แต่ไม่พบยาออกซีเตตราไซคลินในน้ำนมโคที่ตรวจทั้งหมด

ในปี 2013 Bang – iam และคณะ[10] ได้ทำการพัฒนาเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์สำหรับการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพารา ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์โดยใช้กล้องถ่ายภาพขนาดเล็กที่มีเซนเซอร์แบบซีมอส (Complementary metal oxide semiconductor, CMOS) ในการเป็นเครื่องตรวจวัดโดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างสีของสารละลายโปรตีนที่เกิดปฏิกิริยากับสารละลายโมดิฟายด์ลาวรี และในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคโครงข่ายประสาทเทียม (Artificial neural network, ANN) ควบคู่กับเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์ในการตรวจสอบค่าสีแดง เขียว น้ำเงิน (Red, Green, Blue, RGB) ของการถ่ายภาพสารละลายตัวอย่างแล้วแปลผลออกมาเป็นความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของเครื่องมือตรวจวัดที่ได้

พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกับวิธีมาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่น (Statistical difference) 95% และค่าความคลาดเคลื่อนของการตรวจสอบความเข้มข้นแสดงในค่าผิดพลาดกำลังสองเฉลี่ย (Mean squared error, MSE) เท่ากับ 0.037 ซึ่งเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัด และไม่ต้องเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ผล

ในปี 2013 Sumriddetchkajorn และคณะ[47] ได้ทำการพัฒนาคัลเลอริมิเตอร์อย่างง่ายที่ใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่ที่มีกล้องถ่ายภาพในตัวเครื่องและมีตัวอ้างอิงในตัวเองสำหรับการหาปริมาณคลอรีนในน้ำ โดยอาศัยการทำให้เกิดสีน้ำเงินจากปฏิกิริยาไอโอโดเมตรี (Iodometry) ซึ่งใช้สารละลายน้ำแป้งที่มีโปแตสเซียมไอโอไดด์ทำปฏิกิริยากับคลอรีนที่ละลายในน้ำ โดยเลือกใช้สารมาตรฐานเป็นแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ซึ่งจะมีการเตรียมให้เกิดปฏิกิริยาในขวดแก้วใสและในการถ่ายภาพนั้น จะใช้กระดาษเอสี่เป็นฉากหลัง เรียกว่า ฉากเปรียบเทียบ (Reference scene) โดยใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่ยี่ห้อซัมซุง (Samsung) รุ่น Galaxy S GT – 19000 ระบบ Android 2.2 โดยกล้องมีความละเอียด 2592 x 1944 พิกเซล ถ่ายภาพ และจัดให้โทรศัพท์เคลื่อนที่อยู่ห่างจากฉากเปรียบเทียบ เท่ากับ 12 เซนติเมตร แล้วทำการวัดความสว่างของสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในการถ่ายภาพให้ได้เท่ากับ 300 ลักซ์ โดยกำหนดตำแหน่งที่สนใจ (Regions of interest; ROIs) ไว้ทั้งหมด 3 จุด ซึ่ง 2 จุดจะเป็นบริเวณสำหรับใช้เป็นตัวอ้างอิง มีขนาด 60 x 60 พิกเซล อยู่ในตำแหน่งด้านข้างของช่องสี่เหลี่ยมผืนผ้าสีฟ้า (คือ บริเวณที่กำหนดไว้ตรงสารที่สนใจ) และจุดอ้างอิงทั้งสองนี้จะถูกใช้เพื่อเก็บข้อมูลค่าสีแดง สีเขียว สีน้ำเงิน เมื่อเทียบฉากพื้นหลังสีขาว ส่วน ROI อีกจุดซึ่งมีขนาด 60 x 60 พิกเซล เช่นกัน กำหนดให้อยู่กึ่งกลางระหว่าง ROIs จุดแรกนั้นและอยู่ภายในช่องสี่เหลี่ยมผืนผ้าสีฟ้า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้สำหรับเก็บข้อมูลค่าสีแดง สีเขียว สีน้ำเงินของสารละลายที่สนใจนั่นเอง ซึ่งอาศัยการประมวลผลค่าสีที่ได้จากการถ่ายภาพดิจิตอลของสารละลายสีฟ้าในขวดแก้วใสเทียบกับฉากเปรียบเทียบพื้นหลังในอัตราส่วนค่าสี (Color ratio, CR) ดังสมการ

$$\mathrm{CR} = \frac{\frac{R_s}{R_r} + \frac{G_s}{G_r} + \frac{B_s}{B_r}}{3}$$

และจากงานวิจัยนี้การตรวจวัดด้วยแอพพลิเคชั่นที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่าสามารถตรวจหาปริมาณคลอรีนที่อยู่ในน้ำได้ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่ที่ 7% ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ประหยัด สะดวก เครื่องมือสามารถพกพาได้ง่าย วิธีการทดลองง่ายและอาจจะประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสารอื่นๆ ในวงกว้างได้

1.10 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม

2. วิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลินที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำนม

3. เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีกับเทคนิคมาตรฐานคือเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโทเมตรี

1.11 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

พัฒนาวิธีเพื่อการหาปริมาณเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลินที่ตกค้างในตัวอย่างน้ำนม

1.12 ประโยชน์ที่จะได้รับ

1. เครื่องมือวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการแบบใหม่สำหรับการตรวจวัดสารที่สามารถเกิดสีในช่วง Visible

2. ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนมโดยเทคนิคใหม่

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

2.1.1 เครื่องมือ

1. UV-VIS Spectrophotometer ชนิดลำแสงคู่ : V-650 Series spectrophotometer, Japan

2. เครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์ (Digital image based colorimeter)

3. เครื่องชั่งแบบละเอียด (4 ตำแหน่ง) รุ่น BS 224S, บริษัท Sartorius, U.S.A.

4. เครื่องเขย่าสาร (Vortex – GENIE 2) รุ่น G650E บริษัท Scientific Industries, Taiwan

5. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น D – 7200 Tuttlingen บริษัท Hettich ZENTRIFUGEN, Germany

6. เครื่องวัดแสง (Digital light lux meter) รุ่น LX – 1330B บริษัท OEM, China

7. เครื่องทำน้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI) บริษัท ELGA, England

8. เครื่องวัดความเป็นกรด–ด่าง (pH meter) บริษัท Metrohm, Thailand

9. เซลล์ใส่สารตัวอย่าง (Sample cell) ความกว้าง 10 มิลลิเมตร (mm)

   9.1 พลาสติก (Plastic) บริษัท Bibby Sterilin, European Union (EU)

   9.2 ควอร์ตซ์ (Quartz) บริษัท Hellma, Germany

10. แท่งที่บรรจุตัวดูดซับของแข็งเป็น C18 เพื่อใช้ในเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (C18 SPE tube) บริษัท VERTICAL Chromatography, Thailand

11. หลอดพลาสติกที่ใช้สำหรับหมุนเหวี่ยง (Plastic Centrifuge tube) บริษัท Hycon Plastics Inc, Thailand

12. กระดาษกรอง

   12.1 เบอร์ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร (110 mm Ø) บริษัท Whatman, UK

   12.2 เบอร์ 42 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร (110 mm Ø) บริษัท Whatman, UK

13. โทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะ iPhone รุ่น 4S บริษัท Apple, China

2.1.2 อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เตตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ [Tetracycline hydrochloride, TC : $C_{22}H_{24}N_2O_8.HCl$ (MW = 480.9)] AR grade บริษัท Merck, Germany

1 1674096
12 มิ.ย. 2558

สำนักหอสมุด

2. ออกซีเตตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ [Oxytetracycline hydrochloride, OTC : $C_{22}H_{24}N_2O_9.HCl$ (M.W.=496.89)] AR grade, 95% บริษัท Sigma, China

3. กรดไฮโดรคลอริก [Hydrochloric acid : HCl (MW = 36.46)] 37% AR grade บริษัท RCL Labscan, Thailand

4. เหล็ก(III) ไนเตรต หรือ เฟอร์ริกไนเตรต [Iron(III) nitrate or Ferric nitrate : $Fe(NO_3)_3$ (MW = 241.85)] 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร AR grade บริษัท Merck, Germany

5. คอปเปอร์(II) ไนเตรต [Copper(II) nitrate : $Cu(NO_3)_2$ (MW = 241.60)] 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร AR grade บริษัท Merck, Germany

6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต [Disodium hydrogen phosphate dehydrate : $Na_2HPO_4 . 2H_20$ (MW = 177.9)] AR grade บริษัท Fisher Chemical, UK

7. กรดซิตริก [Citric acid : $C_6H_8O_7.H_2O$ (MW = 210.14)] AR grade บริษัท Ajex Finechem, Australia

8. กรดเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก [Ethylendiaminetetraacetic acid, EDTA : $C_{10}H_{16}N_2O_8 . 2H_20$ (MW = 292.25) AR grade บริษัท Fisher scientific, UK

9. กรดไตรคลอโรอะซิติก [Trichloroacetic acid, TCA : $C_2HCl_3O_2$ (MW = 163.39)] AR grade บริษัท Fisher Chemical, UK

10. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI)

11. นมวัวยูเอชที รสจืด บริษัท ไทย – เดนมาร์ค (ประเทศไทย) จำกัด ที่อยู่ 198 หมู่ 3 ตำบลคลองมะพับ อำเภอศรีนคร จังหวัดสุโขทัย

12. นมวัวพาสเจอไรซ์ รสจืด บริษัท ซีพี – เมจิ (ประเทศไทย) จำกัด ที่อยู่ ถนนพหลโยธิน อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี

13. นมวัวสดต้ม บริเวณสี่แยกบ้านแขก อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

2.2 วิธีการเตรียมสาร

2.2.1 สารละลายไฮโดรคลอริก

เตรียมกรดไฮโดรคลอริกให้มีความเข้มข้น 1, 5, 6, 7.5 และ 10 โมลต่อลิตร โดยการตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจำนวน 1.66, 8.30, 9.97, 12.45 และ 16.60 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำมาเติมลงในน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

2.2.2 สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน

เตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานเตตราไซคลินจำนวน 0.01xx กรัม นำมาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 1, 5, 7.5 และ 10 โมลต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร

2.2.3 สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลิน

เตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินจำนวน 0.01xx กรัม นำมาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

2.2.4 สารละลายมาตรฐานเหล็ก(III)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ให้มีความเข้มข้น 0.0005 โมลต่อลิตร โดยปิเปตจากขวดสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกไนเตรต (ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.02 โมลต่อลิตร) มาจำนวน 0.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) มาจำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

เตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ให้มีความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร โดยปิเปตมาจากขวดสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกไนเตรตที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

2.2.5 สารละลายมาตรฐานคอปเปอร์(II)

เตรียมสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์(II) ให้มีความเข้มข้น 0.000015 โมลต่อลิตร โดยปิเปตจากขวดสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ไนเตรต (ที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) มา 0.13 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 50.00 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออนจะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.0001 โมลต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้มา 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10.00 มิลลิลิตรด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 โมลต่อลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.000015 โมลต่อลิตร

2.2.6 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก

เตรียมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 20% โดยชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติกจำนวน 32.6 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

2.2.7 สารละลาย McIlvaine – ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)

เตรียมสารละลาย McIlvaine – EDTA ที่มีค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.0 โดยการชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรตจำนวน 15 กรัม กรดเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกจำนวน 3.72 กรัม และกรดซิตริกจำนวน 13 กรัม นำทั้งหมดมาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ไม่ต้องทำการปรับพีเอช (pH) เนื่องจากว่าสารละลาย McIlvaine buffer – EDTA นั้น มีพีเอช (pH) เท่ากับ 4.0 อยู่แล้ว

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม

2.3.1.1 การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินมีสีเข้มที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำๆ

นำสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินในแต่ละความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกไปถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์เพื่อเปรียบเทียบสี

2.3.1.2 การทำชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินด้วยตาเปล่าและถ่ายภาพได้ชัดเจน โดยที่ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ต้องไม่เกิน 1

เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตาราง 2.1 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร

ตาราง 2.1 ปริมาตรในการปิเปตสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรที่ใช้ปิเปต (มิลลิลิตร)
1	0.1
3	0.3
5	0.5
7	0.7
9	0.9

จากนั้นก็นำสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ มาเปรียบเทียบสีด้วยตาเปล่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์เพื่อเปรียบเทียบสี

2.3.1.3 การศึกษาหาสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้น

หาข้อมูลโดยทำการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมจากงานวิจัยอื่นๆ[36] แล้วทำการทดลองเทียบสีระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งปิเปตจากสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.1.4 การศึกษาหาอัตราส่วนโดยโมล (Mole ratio) ที่เหมาะสมระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินกับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III)

กำหนดให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) คงที่ คือให้มีความเข้มข้น 0.0005 โมลต่อลิตร แล้วเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินขึ้นเรื่อยๆ ให้มีอัตราส่วนโดยโมลของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9 ต่อ สารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) 1 โดยทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานแต่ละตัว จากสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 0.0002 โมลต่อลิตร ดังตาราง 2.2 แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร ตามลำดับ

ตาราง 2.2 ปริมาตรในการปิเปตสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (TC) และสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เพื่อให้ได้ปริมาตรตรงตามอัตราส่วนโดยโมลที่กำหนดไว้

อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง TC : Fe(III)	ปริมาตรของ TC ที่ใช้ปิเปต (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของ Fe(III) ที่ใช้ปิเปต (มิลลิลิตร)
0.5 : 1	0.25	1
1 : 1	0.5	1
1.5 : 1	0.75	1
2 : 1	1	1
2.5 : 1	1.25	1
3 : 1	1.5	1
3.5 : 1	1.75	1
4 : 1	2	1
4.5 : 1	2.25	1
5 : 1	2.75	1
6 : 1	3	1
6.5 : 1	3.25	1
7 : 1	3.5	1
7.5 : 1	3.75	1
8 : 1	4	1
8.5 : 1	4.25	1
9 : 1	4.5	1

เมื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานตามอัตราส่วนที่กำหนดไว้เรียบร้อยแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ทุกความยาวคลื่นสูงสุดที่ปรากฏ

2.3.1.5 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมหลังจากเตรียมสาระลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ลงไปตามอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์และถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์

เตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้มีความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์ที่ 0 นาที (หลังจากเตรียมเสร็จทันที) แล้วจะทำการถ่ายภาพทุกๆ 10 นาที นั่นคือ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที ตามลำดับ โดยตั้งสารละลายมาตรฐานทิ้งไว้ในที่มืด หรือเทสารลงขวดสีชา

2.3.1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวแล้วตรวจวัดด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี และเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี

ทำการเตรียมตัวอย่างนมด้วยกัน 3 แบบ คือ แบบไม่เติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน แบบเติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน และแบบเติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินและเติมสารละลาย McIlvaine – EDTA ที่มีค่า pH = 4.0 เข้าไปด้วย

(1) เตรียมตัวอย่างนมวัว แบบไม่เติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป โดยเริ่มจากใส่นมลงในหลอดพลาสติกสำหรับหมุนเหวี่ยงจำนวน 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 20% กรดไตรคลอโรอะซิติกจำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสาระละลายตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที เลือกเฉพาะส่วนใส แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 นำส่วนสารละลายที่กรองได้ไปเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เข้มข้น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร จำนวน 0.13 มิลลิลิตร (สำหรับอัตราส่วนสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 4 : 1) หรือเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เข้มข้น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร จำนวน 0.26 มิลลิลิตร (สำหรับอัตราส่วนสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 1 : 2) แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร

(2) เตรียมตัวอย่างนมวัว แบบเติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเริ่มจากใส่นมลงในหลอดพลาสติกสำหรับหมุนเหวี่ยงจำนวน 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 20% แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสาระละลายตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที เลือกเฉพาะส่วนใส แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 นำส่วนสารละลายที่กรองได้ไปเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เข้มข้น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร จำนวน 0.13 มิลลิลิตร (สำหรับอัตราส่วน

สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 4 : 1) หรือเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เข้มข้น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร จำนวน 0.26 มิลลิลิตร (สำหรับอัตราส่วนสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 1 : 2) แล้วเติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร

(3) เตรียมตัวอย่างนมวัวทั้ง 2 แบบเหมือนข้อ (2) แต่เติมสารละลาย McIlvaine – EDTA ที่มีค่า pH = 4.0 จำนวน 6 มิลลิลิตรหลังจากเติมสารละลาย 20% กรดไตรคลอโรอะซิติกจำนวน 2 มิลลิลิตร ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยเติมเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เข้มข้น 4×10^{-3} โมลต่อลิตร จำนวน 0.26 มิลลิลิตร ก่อนการปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร

จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างไปวัดด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ และถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์ โดยกำหนดให้เซลล์ใส่สารตัวอย่างอยู่ห่างจากฉากหลัง 8 เซนติเมตร และอยู่ห่างจากโทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะ 12 เซนติเมตร ซึ่งให้แสงในการถ่ายภาพอยู่ที่ประมาณ 330 – 350 ลักซ์

2.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม

2.3.2.1 การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินมีสีเข้มที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำๆ

นำสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินในแต่ละตัวทำละลายได้แก่ น้ำปราศจากไอออน (น้ำ DI) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1, 2.5, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โมลต่อลิตร กรดอะซีติกเข้มข้น 1% และ 10% โดยปริมาตร (v/v) และเมทานอล จากงานวิจัยของนิโลบล หลักหาญ และคณะ [48] ได้ทำการหาปริมาณเตตราไซคลินในยา โดยใช้ตัวทำละลายคือกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร แต่เมื่อนำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร มาเป็นตัวทำละลายในงานวิจัยนี้ พบว่าสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินมีสีที่จางเกินไป ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดคือ เพิ่มความเข้มข้นของกรดที่ใช้เพื่อทำให้สีของสารละลายมาตรฐานเข้มขึ้นและได้ทำการหาตัวทำละลายอื่นๆ เพื่อที่จะทำให้สีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มที่สุด โดยทำการเปรียบเทียบสีของออกซีเตตราไซคลินในแต่ละตัวทำละลายโดยนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์เพื่อเปรียบเทียบสี

2.3.2.2 การศึกษาหาสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้น

งานวิจัยของ Sultan และคณะ [36] ได้ทำการฟอร์มสีออกซีเตตราไซคลินกับโลหะต่างๆ เพื่อทำให้สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินมีสีที่เข้มขึ้น ผู้วิจัยจึงนำมาประยุกต์ใช้กับงานวิจัยนี้

โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินและนำมาเติมสารละลายมาตรฐานโลหะเหล็ก(III), ทองแดง(II), นิกเกิล(II), สังกะสี(II) และแมงกานีส(II) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากันทั้งหมดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละชุด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ให้ปิเปตสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้นมา 0.05 มิลลิลิตร แต่ไม่ต้องทำการเติมสารละลายโลหะมาตรฐานเพื่อทำการเทียบสีระหว่างเติมและไม่เติมสารละลายโลหะมาตรฐาน จากนั้นทำการสังเกตสีที่เกิดขึ้นพร้อมทั้งถ่ายภาพ และนำไปหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดของแต่ละชุดด้วย

2.3.2.3 การศึกษาหาอัตราส่วนโดยโมล (Mole ratio) ที่เหมาะสมระหว่างสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินกับสารละลายมาตรฐานทองแดง(II)

จากวิธีการหาอัตราส่วนโดยโมลของ Joe และ Jones [37] พบว่าต้องเตรียมสารละลายทั้งไอออนของโลหะ (M) และลิแกนด์ (L) ให้ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันโดยให้ความเข้มข้นของไอออนมีค่าคงที่เปลี่ยนเฉพาะความเข้มข้นของลิแกนด์ จะได้อัตราส่วนโดยโมลของทั้งสองแตกต่างกัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่สารประกอบเชิงซ้อนดูดกลืนแสงดีที่สุด แล้วเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนของ [L]/[M] เพื่อหาจุดตัดของเส้นตรงสองเส้นจากกราฟ ผู้วิจัยจึงได้นำความรู้ดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัย โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1×10^{-4} โมลต่อลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานโลหะทองแดง(II) เข้มข้น 1×10^{-4} โมลต่อลิตร จากนั้นทำการปิเปตสารละลายทั้งหมดมาผสมกันในอัตราส่วนโมลต่างๆ ดังตาราง 2.3

ตาราง 2.3 อัตราส่วนโดยโมลของทองแดง(II) กับออกซีเตตราไซคลิน

อัตราส่วนโมล	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		ความเข้มข้น (โมลต่อลิตร)	
	สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลิน	ทองแดง(II)	สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลิน	ทองแดง(II)
1:1	1	1	$1x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
2:1	2	1	$2x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
3:1	3	1	$3x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
4:1	4	1	$4x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
5:1	5	1	$5x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
6:1	6	1	$6x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
7:1	7	1	$7x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
8:1	8	1	$8x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
9:1	9	1	$9x10^{-5}$	$1x10^{-5}$

2.3.2.4 การศึกษาหาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT, นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้มโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี

ปิเปตนม UHT มา 5.00 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติก จากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 20% จำนวน 2.00 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร เป็นเวลา 15 นาที ที่กำลัง 4,000 รอบ/นาที ต่อมาทำการกรองตัวอย่างนมด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 นำตัวอย่างนมที่กรองได้เทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายมาตรฐานโลหะทองแดง(II) เข้มข้น 1.5125×10^{-5} โมลต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร ทุกครั้งที่เตรียมตัวอย่างนมจะต้องทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมทั้งเติมสารละลายมาตรฐานโลหะทองแดง(II) เข้มข้น 1.5125×10^{-5} โมลต่อลิตร จำนวน 1.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร จากนั้นทำการถ่ายภาพด้วยกล้องโทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะชนิด iPhone 4S แล้วนำภาพเข้าสู่การประมวลผลโครงข่ายประสาทเทียมโดยตั้งสภาวะที่แน่นอนโดยทำการตั้งสถานที่ถ่ายภาพที่เดียวกันทุกครั้งคือ วัดแสงให้ได้ 300 lux ระยะห่างของเซลล์บรรจุสารจากฉากด้านหลัง 8.00 เซนติเมตร ระยะห่างของกล้องจากเซลล์บรรจุสาร 12.00 เซนติเมตร ดังรูป 1.3 โดยตัวอย่างนมอีก 2 ชนิดที่เหลือก็ทำการเตรียมเช่นเดียวกัน และทำการวิจัยทั้งหมด 7 ซ้ำในแต่ละตัวอย่างนม

2.3.2.5 การศึกษาหาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT, นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้มโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโทเมตรี

ปิเปตนม UHT มา 5.00 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติก จากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 20% จำนวน 2.00 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร เป็นเวลา 15 นาที ที่กำลัง 4,000 รอบ/นาที ต่อมาทำการกรองตัวอย่างนมด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 นำตัวอย่างนมที่กรองได้เทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงเข้มข้น 1.5125×10^{-5} โมลต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร ทุกครั้งที่เตรียมตัวอย่างนมจะต้องทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 2 , 3, 4, 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมทั้งเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงเข้มข้น 1.5125×10^{-5} โมลต่อลิตร จำนวน 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร นำสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปหาค่าความยาวคลื่นสูงสุด จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของทั้งสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินและของตัวอย่างนมเพื่อนำมาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลิน ส่วนตัวอย่างนม อีก 2 ชนิดที่เหลือก็ทำการเตรียมเช่นเดียวกัน โดยทำการวิจัยทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่างนม

2.3.2.6 การหาค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT, นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้ม

ปิเปตนม UHT มา 5.00 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกจำนวน 14 หลอด จากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 20% ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงสารเป็นเวลา 15 นาที ที่กำลัง 4,000 รอบ/นาที ต่อมาทำการกรองตัวอย่างนมด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 นำตัวอย่างนมที่กรองได้เทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงเข้มข้น 1.5125×10^{-5} โมลต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 เติมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร หรือมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดที่ 2 ไม่เติมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินแล้วทำการปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร

ทั้ง 2 ชุด ทุกครั้งที่เตรียมตัวอย่างนมจะต้องทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมทั้งเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงเข้มข้น 1.5125×10^{-5} โมลต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร นำสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปหาค่าความยาวคลื่นสูงสุด จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของทั้งสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินและของตัวอย่างนมทั้งหมด ต่อมาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างนมจากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟ ส่วนตัวอย่างนม อีก 2 ชนิดที่เหลือก็ทำการเตรียมเช่นเดียวกัน

2.3.2.7 การศึกษาหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of detection, LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ)

การหาค่า LOD และ LOQ หาจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Blank 25 ครั้ง พร้อมทั้งเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมทั้งเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงเข้มข้น 1.5125×10^{-5} โมลต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร นำสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปหาค่าความยาวคลื่นสูงสุด จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจะได้ค่า Slope ของกราฟออกมา แล้วคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงของ Blank ทั้ง 25 ครั้งเพื่อนำค่าดังกล่าวไปคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ต่อไป ส่วนค่า LOQ ของเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์นั้นสามารถหาได้จากการถ่ายภาพสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่จะสามารถมองเห็นสีได้

LOD =3sb/m และ LOQ = 10sb/m

sb =ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ blank ; m = slope

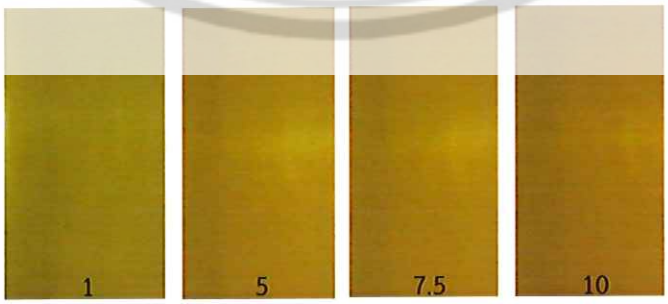
บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม

3.1.1 การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินมีสีเข้มที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำๆ

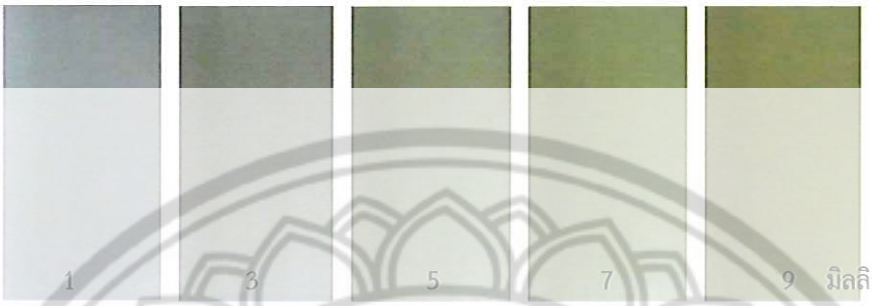
เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการเน้นการถ่ายภาพสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่ำ เพราะฉะนั้นสีของสาระละลายจึงมีความสำคัญ โดยได้ทำการทดลองเปรียบเทียบความสามารถของตัวทำละลายระหว่างสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1, 5, 7.5 และ 10 โมลต่อลิตร ดังรูป 3.1 ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วพบว่า สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลายนั้น ให้สีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ไม่ชัดเจน และเมื่อพิจารณาตัวทำละลายที่ใช้เป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 และ 7.5 โมลต่อลิตร ให้สีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ชัดเจนกว่าการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร จากนั้นจึงมาพิจารณาตัวทำละลายที่ใช้เป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 10 โมลต่อลิตร พบว่าให้สีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ชัดเจนที่สุด แต่การใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 10 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลายนั้นมีความเสี่ยงสูง เนื่องจากมีความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดไอกรดขณะทำการทดลองและเมื่อถูกผิวหนังจะทำให้เกิดอาการแสบร้อนที่ผิวหนัง ซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกายผู้ทำการทดลองเอง เพราะฉะนั้นผู้วิจัยจึงเลือกพิจารณาตัวทำละลายระหว่างสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 และ 7.5 โมลต่อลิตร เท่านั้น ซึ่งพบว่า การใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 และ 7.5 โมลต่อลิตร ให้สีสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลายสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน เพราะนอกจากช่วยประหยัดกรดไฮโดรคลอริกกว่าการใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 7.5 โมลต่อลิตร แล้วยังเป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดลองน้อยกว่าอีกด้วย



รูป 3.1 ภาพถ่ายของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในแต่ละความเข้มข้น

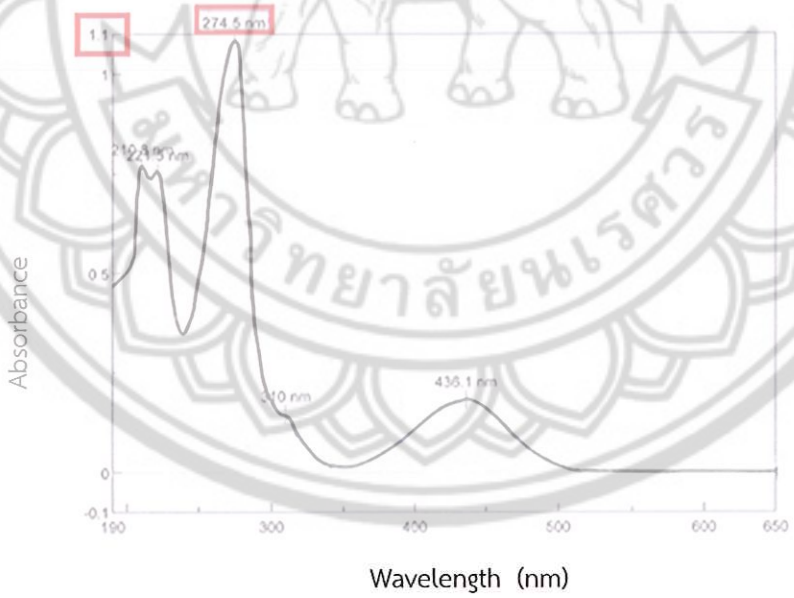
3.1.2 การทำชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินด้วยตาเปล่าและถ่ายภาพได้ชัดเจน โดยที่ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ต้องไม่เกิน 1

ผลการถ่ายภาพดังรูป 3.2



รูป 3.2 ภาพถ่ายชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลาย

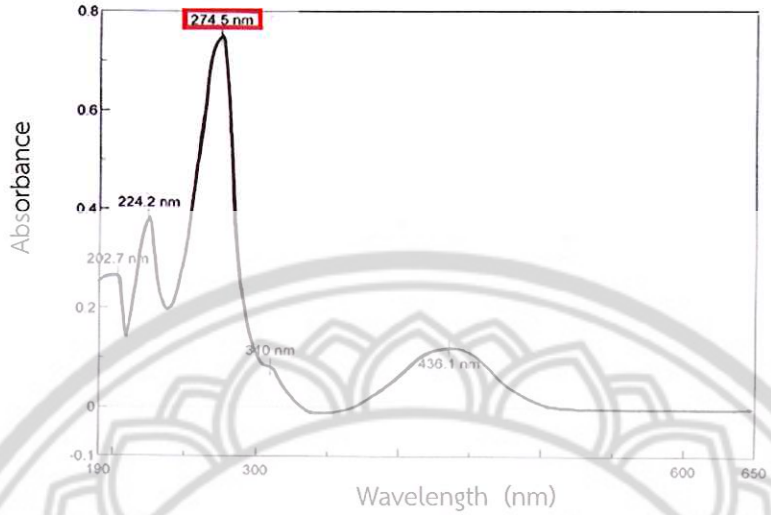
เนื่องจากชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินนี้ มีสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร เข้มข้นที่สุด จึงใช้ขวดนี้วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ได้ผลดังรูป 3.3



รูป 3.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากรูป 3.3 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเกิน 1 ซึ่งในทางทฤษฎีของเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปีค่าการดูดกลืนแสงของสารที่นำมาวัดไม่ควรเกิน 1 ดังนั้นจึงทำการวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่ำลงมา นั้นคือ ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ผลดังรูป 3.4



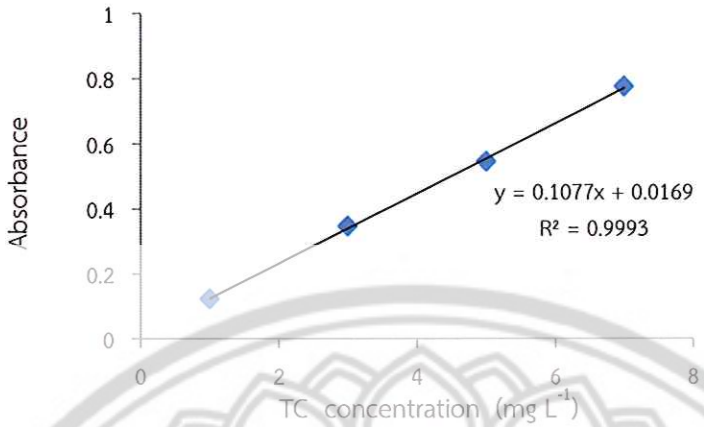
รูป 3.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากรูป 3.4 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าไม่เกิน 1 ถือว่าใช้ได้ในทางทฤษฎีของเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี ดังนั้นจึงใช้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดจากสเปกตรัมนี้ คือ 274.5 นาโนเมตรในการหาค่าการดูดกลืนแสงทั้งชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินนี้ (ยกเว้นที่ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากมีค่าการดูดกลืนแสงเกิน 1) เพื่อดูว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่ำสุดเป็นเท่าไรที่สามารถเห็นสีของสารละลายได้ชัดเจนโดยที่ค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นนั้นต้องมีค่าไม่เกิน 1 และนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ระหว่างความเข้มข้น (Concentration) และค่าการดูดกลืนแสงของชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินนี้ตามกฎของเบียร์ – แลมเบิร์ต แล้วดูสมการเส้นตรงและค่า R-squared ได้ผลดังตาราง 3.1 และรูป 3.5

ตาราง 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดที่ความยาวคลื่น 274.5 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.1238
3	0.3463
5	0.5450
7	0.7755

จากตาราง 3.1 นำค่ามาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสง

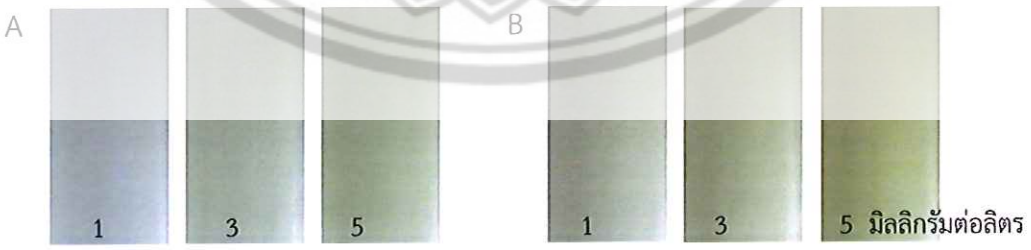


รูป 3.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน

จากตาราง 3.1, 3.2 และรูป 3.5 พบว่าสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นสีชัดเจนและมีค่าการดูดกลืนแสงไม่เกิน 1 ถือว่าใช้ได้ในทางทฤษฎีของเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

3.1.3 การศึกษาหาสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้น

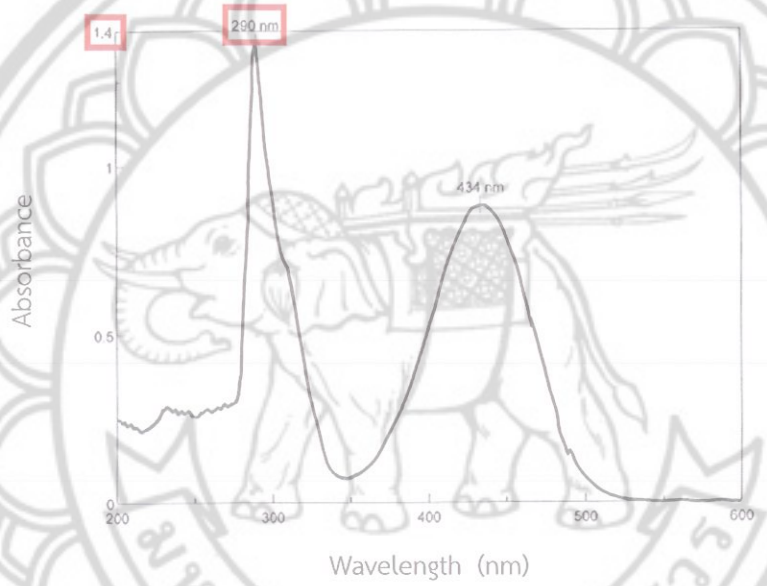
เนื่องจากสารละลายเตตราไซคลินที่ได้ทำการทดลองก่อนหน้านี้ยังให้สีของสารละลายไม่ชัดเจนเพียงพอต่อความต้องการถ่ายภาพ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการหาสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้น โดยเมื่อศึกษาแล้วพบว่าสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกไนเตรตนั้นสามารถช่วยทำให้สีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินชัดขึ้นได้ [36] ดังรูป 3.6 (B) โดยเกิดจากการทำปฏิกิริยาของเหล็ก(III) ในสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกไนเตรตกับสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวทำละลาย



รูป 3.6 สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ;
A : ไม่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III), B : เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III)

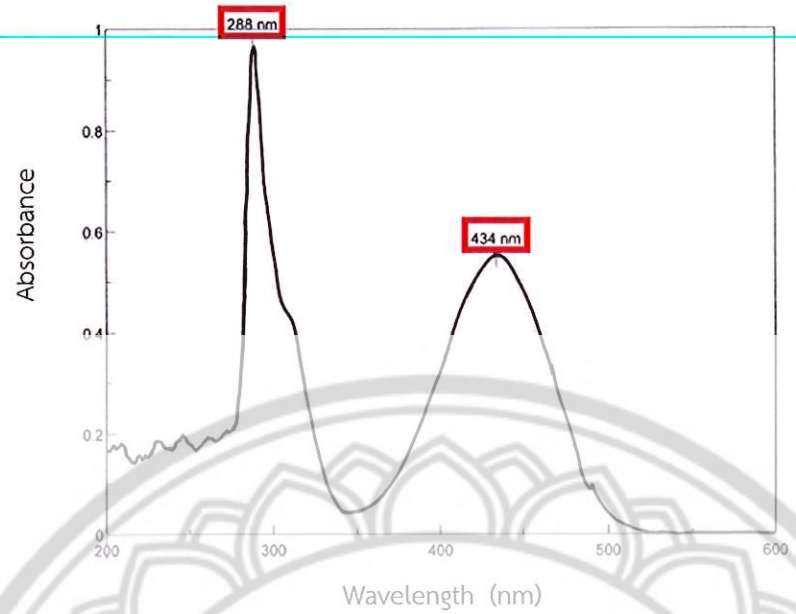
3.1.4 การศึกษาหาอัตราส่วนโดยโมล (Mole ratio) ที่เหมาะสมระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินกับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III)

เมื่อทราบว่าสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ช่วยเพิ่มสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้นแล้ว จากนั้นจึงทำการหาอัตราอัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินกับเหล็ก(III) จากวิธีของโจและโจนส์ (Joe and Jones) [37] โดยเริ่มจากการสแกนความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินโดยใช้ขวดที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินกับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) สูงที่สุดเพื่อนำมาใช้วัดหาค่าการดูดกลืนแสง ได้ผลดังรูป 3.7



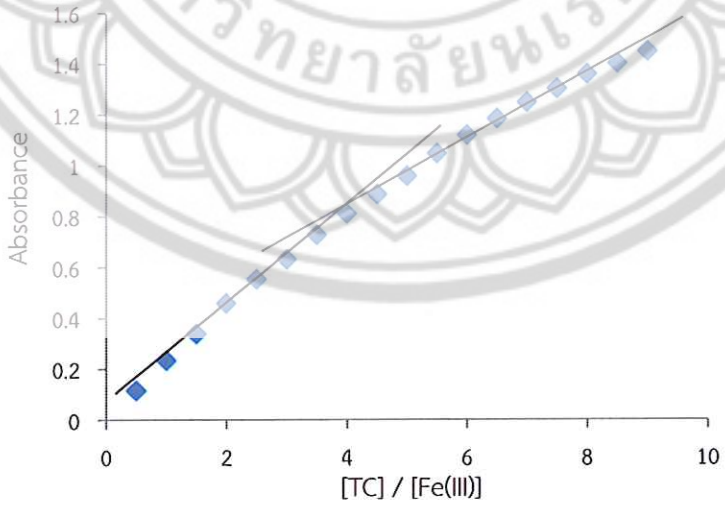
รูป 3.7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นโดยโมล เท่ากับ 9 : 1

จากรูป 3.7 พบว่าที่ความยาวคลื่นสูงสุด (290 นาโนเมตร) นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 1 ซึ่งในทางทฤษฎีของเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปีค่าการดูดกลืนแสงของสารที่นำมาวัดไม่ควรเกิน 1 ดังนั้นจึงทำการสแกนสเปกตรัมเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นโดยโมลต่ำลงมา นั้นคือ 5.5 : 1 ได้ผลดังรูป 3.8

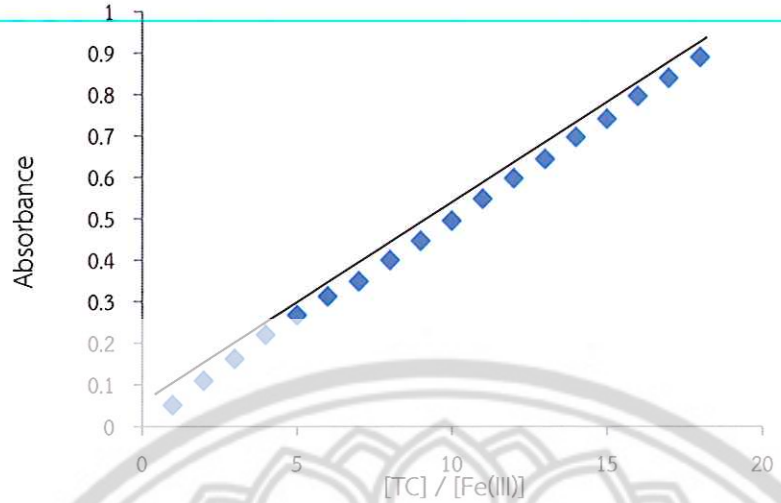


รูป 3.8 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นโดยโมล เท่ากับ 5.5 : 1

จากรูป 3.8 พบว่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ปรากฏนั้นมี 2 ค่า คือที่ 288 และ 434 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงของความยาวคลื่นทั้ง 2 ค่านั้นมีค่าไม่เกิน 1 ถือว่าใช้ได้ในทางทฤษฎีของเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี ดังนั้นจึงใช้ความยาวคลื่นสูงสุดทั้ง 2 ค่านี้ไปใช้หาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่มีความเข้มข้นอัตราส่วนโดยโมลต่างๆ เพื่อหาอัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมในการทำการทดลองครั้งนี้ ได้ผลดังรูป 3.9 และ 3.10



รูป 3.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง [TC] / [Fe(III)] กับค่าการดูดกลืนแสงโดยวัดที่ความยาวคลื่น 288 นาโนเมตร ; โดย [TC] คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (โมลต่อลิตร), [Fe] คือ ความเข้มข้นของเหล็ก (III) (โมลต่อลิตร)



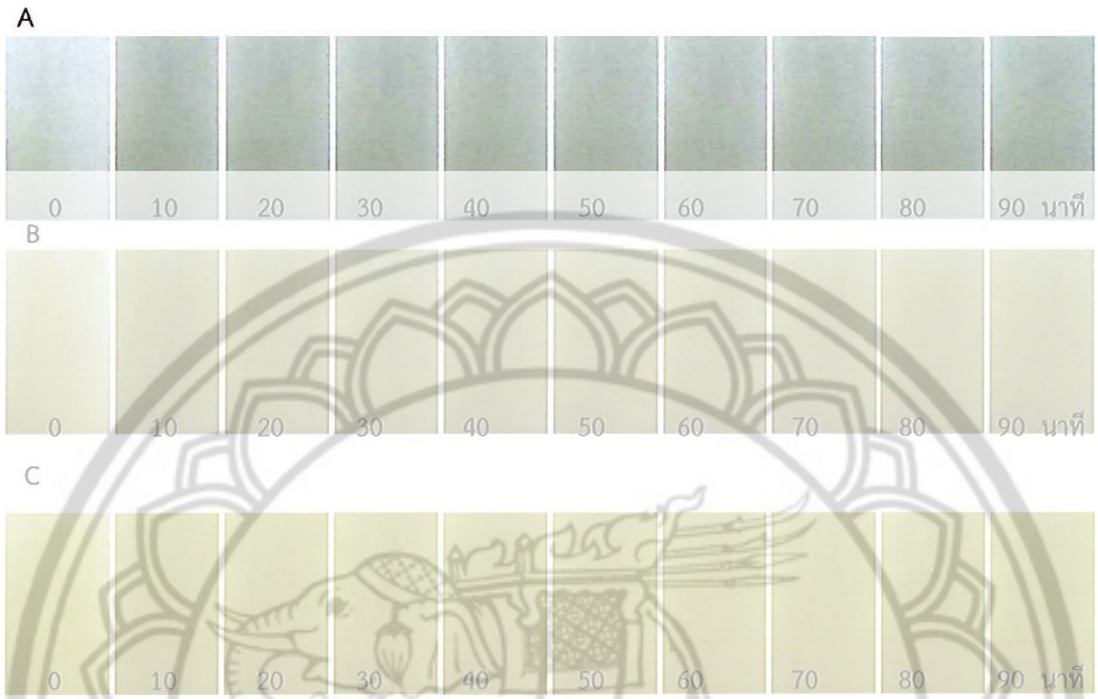
รูป 3.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง [TC] / [Fe(III)] กับค่าการดูดกลืนแสงโดยวัดที่ความยาวคลื่น 434 นาโนเมตร ; โดย [TC] คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (โมลต่อลิตร), [Fe] คือ ความเข้มข้นของเหล็ก(III) (โมลต่อลิตร)

จากรูป 3.9 และ 3.10 จะเห็นได้ว่ารูป 3.9 นั้นกราฟสามารถตัดกัน ส่วนรูป 3.10 กราฟเป็นเส้นตรงไม่มีที่สิ้นสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่ความยาวคลื่น 288 นาโนเมตร ซึ่งกราฟตัดกันได้ที่สัดส่วนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อความเข้มข้นของเหล็ก(III) ที่ 4 : 1 แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาตรของเหล็ก(III) ที่มากเกินพอในการทำปฏิกิริยาเพื่อเติมลงในสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้เท่ากันในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง แสดงการคำนวณในภาคผนวก ซึ่งการทดลองหลังจากนี้ จะมีการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกเพื่อให้เหล็ก(III) ไปทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินทุกครั้ง

3.1.5 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมหลังจากเตรียมสาระลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ลงไปตามอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์และถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์

ผลจากการถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์ที่ 0 นาที (หลังจากเตรียมเสร็จทันที) แล้วจะทำการถ่ายภาพทุกๆ 10 นาที นั่นคือ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที ตามลำดับ แสดงดังรูป 3.11 พบว่าเวลาที่เหมาะสมหลังจากเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่เติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกลงไปตามอัตราส่วนที่เหมาะสม คือควรทิ้งสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินหลังเตรียมเรียบร้อยแล้วไว้อย่างน้อย 10 นาที ก่อนนำไปวัดผลด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ หรือถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์ เนื่องจากมีสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ชัดเจนกว่าถ่ายหลังเตรียม

เสร็จเลย (ที่ 0 นาที) และตั้งแต่เวลา 10 นาทีขึ้นไป จนถึง 90 นาที พบว่าให้สีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่เท่าเดิม

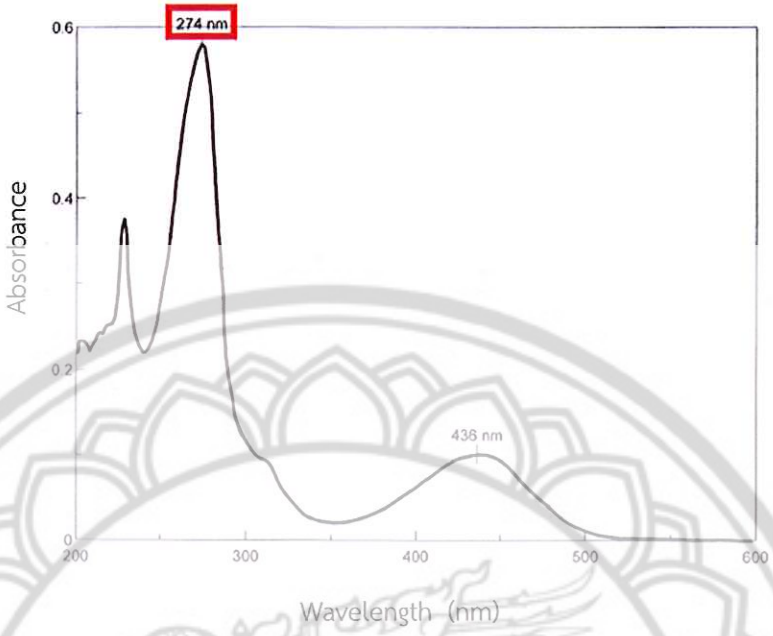


รูป 3.11 ภาพถ่ายสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 1 (A), 5 (B) และ 10 (C) มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที ตามลำดับ

3.1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวแล้วตรวจวัดด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปีและเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี

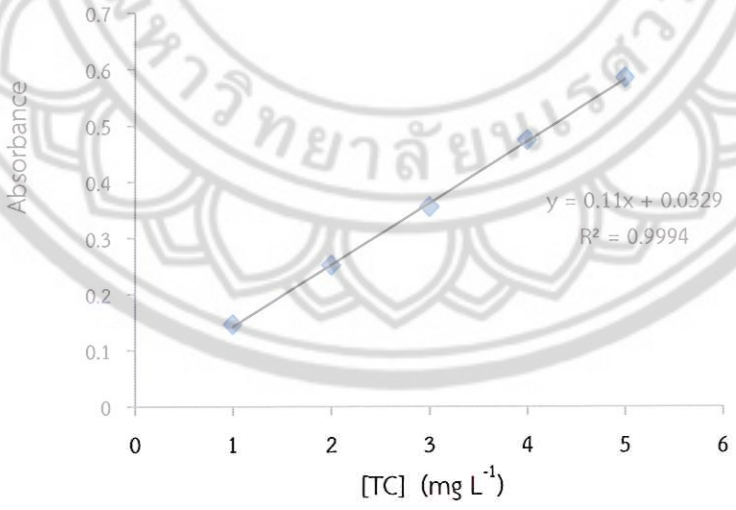
3.1.6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินที่ตกค้างในนมวัวด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี ซึ่งใช้อัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 4 : 1 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ทำการสแกนสเปกตรัมเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดเพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการสแกนสเปกตรัม ซึ่งพบว่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างนมวัว คือ 274 นาโนเมตร ดังรูป 3.12



รูป 3.12 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 4 : 1

และจากสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่ได้สามารถนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินได้ ดังรูป 3.13



รูป 3.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน โดยที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 4 : 1

นำสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้มไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ได้ผลดังตาราง 3.2

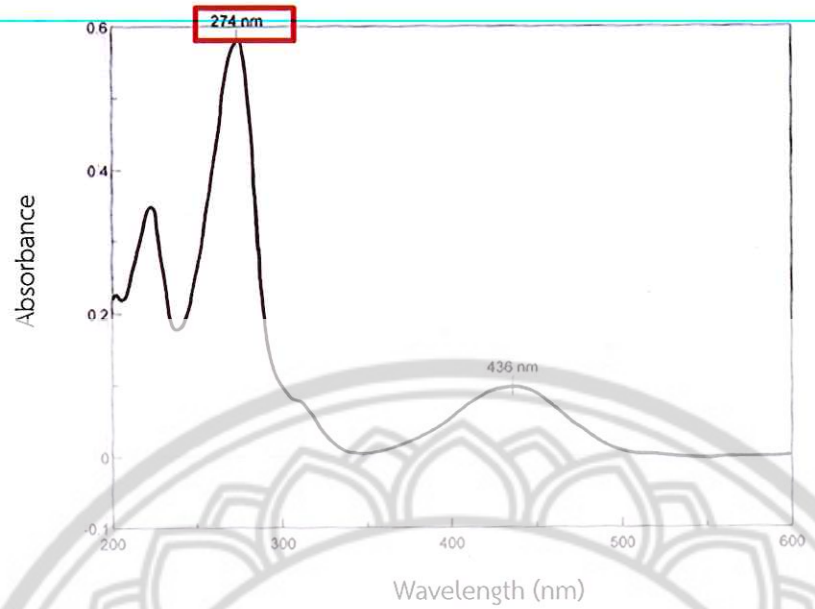
ตาราง 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้ม ที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง		
	นมวัวยูเอชที	นมวัวพาสเจอไรซ์	นมวัวสดต้ม
1	0.8649	0.6309	0.7611
2	0.8551	0.6447	0.7631
3	0.8695	0.6351	0.7601

จากตาราง 3.2 พบว่า นมทั้ง 3 ชนิดนั้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูง ถ้าเทียบกับกราฟมาตรฐานจากรูป 3.13 ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเทียบดูสีของสารละลายตัวอย่างนมวัวกับสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วพบว่า สารละลายตัวอย่างนมวัวมีสีที่อ่อนกว่าสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนสภาวะของสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้น นั่นคือ สารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกไนเตรต ในอัตราส่วนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อความเข้มข้นของเหล็ก (III) ที่ 4 : 1 เป็น 2 : 1 โมลต่อลิตร แทน

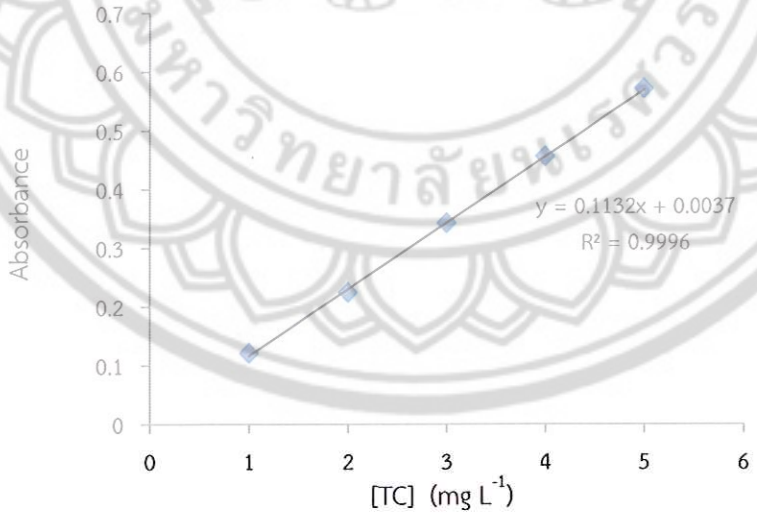
3.1.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี ซึ่งใช้อัตราส่วนระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 2 : 1 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ทำการสแกนสเปกตรัมเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดเพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการสแกนสเปกตรัม ซึ่งพบว่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างนมวัว คือ 274 นาโนเมตร ดังรูป 3.14



รูป 3.14 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1

และจากสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่ได้สามารถนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินได้ ดังรูป 3.15



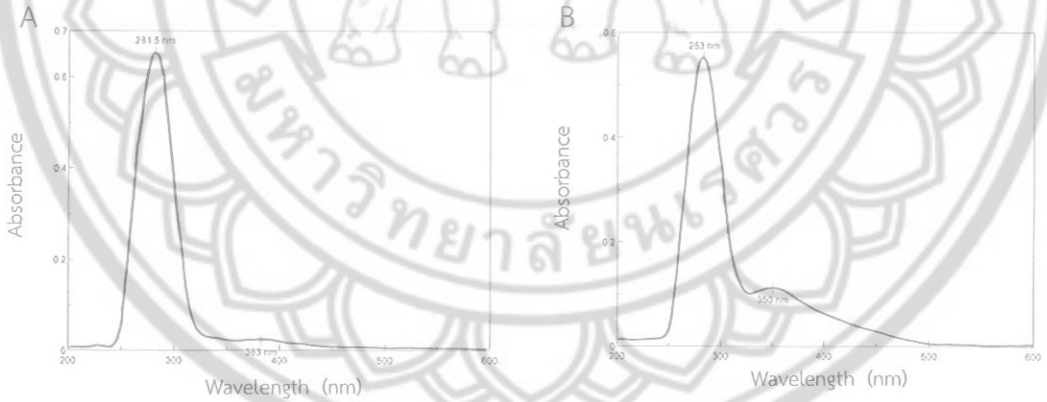
รูป 3.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน โดยที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1

นำสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้มไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ได้ผลดังตาราง 3.3

ตาราง 3.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้ม ที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง		
	นมวัวยูเอชที	นมวัวพาสเจอไรซ์	นมวัวสดต้ม
1	0.8390	0.6143	0.7377
2	0.8402	0.6167	0.7310
3	0.8168	0.6219	0.7373

จากตาราง 3.3 พบว่า นมทั้ง 3 ชนิดนั้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูง เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานจากรูป 3.15 ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเทียบดูสีของสารละลายตัวอย่างนมวัวกับสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วพบว่า สารละลายตัวอย่างนมวัวมีสีที่อ่อนกว่าสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจากผลการทดลอง 3.1.6.1 และ 3.1.6.2 จะเห็นว่าให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติม จึงพบว่าบางงานวิจัยได้มีการเติมสารละลาย McIlvaine – EDTA ที่มีค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.0 ลงไปในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัดโลหะต่างๆ ที่ปะปนมากับนมวัว 3 ให้ผลการทดลองดังรูป 3.16



รูป 3.16 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที (A) : ไม่เติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (B) : เติมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1

จากรูป 3.16 พบว่าสเปกตรัมของสารละลายตัวอย่างที่ปรากฏขึ้นนั้น ไม่ตรงตามสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน (จากรูป 3.14) โดยเฉพาะสเปกตรัมของสี ซึ่งในรูป 3.14 นั้นปรากฏที่ 274 นาโมเมตร แต่ในรูป 3.16 (B) ปรากฏที่ประมาณ 283 นาโนเมตร และเมื่อดูสเปกตรัมในรูป 3.16 (A) จะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงของความยาวคลื่นสูงสุด (281.5

นาโนเมตร) นั้น มีค่าอยู่ที่ประมาณ 0.65 ซึ่งถือว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานจากรูป 3.14 ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าวิธีทั้งข้อ 3.1.6.1 และ 3.1.6.2 นั้น ทั้งมีการเติมสารละลาย McIlvaine – EDTA ที่มีค่า pH = 4.0 หรือไม่มีก็ตาม เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัว เพราะฉะนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองหาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวอีกครั้งโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง

3.1.6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวด้วยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีซึ่งใช้อัตราส่วนระหว่างสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 2 : 1 โดยทำการทดลอง 7 ซ้ำ

เนื่องจากเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีนั้นเน้นการถ่ายภาพสีของสารละลายเป็นหลัก เพราะฉะนั้นสีของสารละลายจึงเป็นสิ่งสำคัญในเทคนิคนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการถ่ายภาพสีของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 4 : 1 และ 2 : 1 เพื่อเปรียบเทียบสีของสาระลาย ดังรูป 3.17

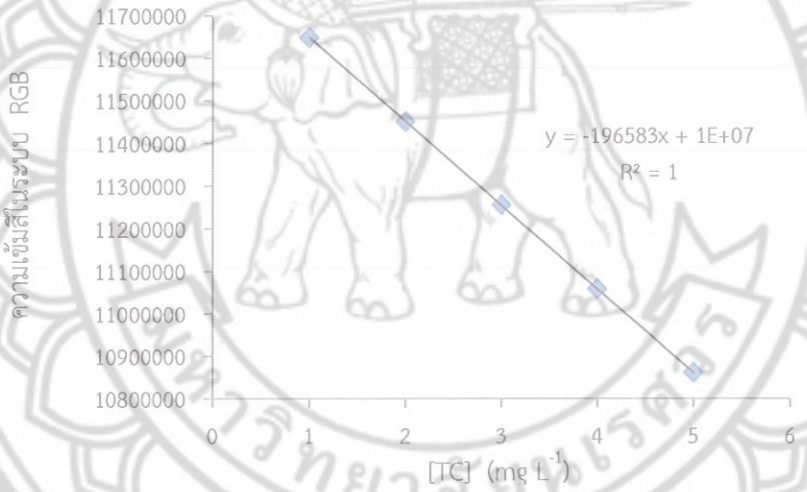
A B

รูป 3.17 สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 4 : 1 (A) และ 2 : 1 (B)

จากรูป 3.17 พบว่าสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1 นั้น ให้สีของสารละลายที่ชัดเจนกว่า ดังนั้นในการทดลองโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีจึงเลือกใช้อัตราส่วนสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 2 : 1 และเทคนิคนี้จะทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 7 ครั้ง เนื่องจากเทคนิคนี้ยังไม่เป็นเทคนิคมาตรฐานจึงต้องทำการทดลองยืนยันผลหลายครั้งกว่าเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปีซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐาน ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรีโดยหาค่าความเข้มสีในระบบ RGB ของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง 3.4

ตาราง 3.4 ค่าความเข้มสีในระบบ RGB ของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1

ความเข้มข้นของ TC (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าความเข้มสีในระบบ RGB			
	R	G	B	RGB
1	189	186	176	11647934
2	193	193	184	11451325
3	188	189	175	11255520
4	189	190	172	11058365
5	189	190	171	10861501



รูป 3.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีในระบบ RGB และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1

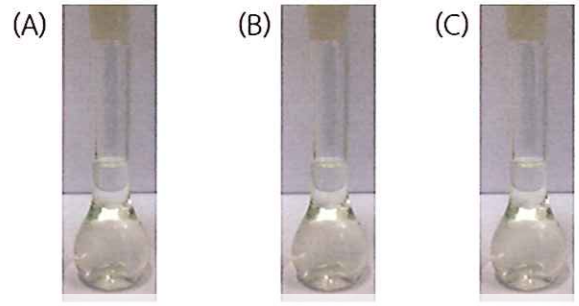
จากตาราง 3.4 และรูป 3.18 พบว่าค่าความเข้มสีในระบบ RGB จะลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน และเมื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานนั้นได้ค่าความเป็นเส้นตรง (R – square, R^2) = 1 จากนั้นนำค่าความเข้มสีในระบบ RGB ที่ได้มาจดจำค่าสีเพื่อตรวจสอบหาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัว จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวโดยนำสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้มไปทดสอบเทียบกับค่าความเข้มสีในระบบ RGB ของชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน ได้ผลดังตาราง 3.5

ตาราง 3.5 ผลการตรวจสอบค่าความเข้มสีในระบบ RGB ของชุดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1 กับสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้ม โดยทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง

ครั้งที่	ปริมาณเตตราไซคลินที่ทดสอบได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	นมวัวยูเอชที	นมวัวพาสเจอไรซ์	นมวัวสดต้ม
1	< 1 (± 2.30)	< 1 (± 1.15)	< 1 (± 0.25)
2	< 1 (± 0.25)	< 1 (± 0.56)	< 1 (± 0.25)
3	< 1 (± 1.15)	< 1 (± 0.25)	< 1 (± 1.15)
4	< 1 (± 1.15)	< 1 (± 0.56)	< 1 (± 0.56)
5	< 1 (± 0.56)	< 1 (± 2.30)	< 1 (± 0.56)
6	< 1 (± 0.56)	< 1 (± 1.15)	< 1 (± 2.30)
7	< 1 (± 2.30)	< 1 (± 0.56)	< 1 (± 1.15)

จากตาราง 3.5 พบว่าในนมวัวทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณเตตราไซคลินน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อดูจากสีของสารละลายแล้ว พบว่าสีของสารละลายตัวอย่างนมวัวทั้ง 3 ชนิดนั้น ให้สีที่อ่อนกว่าสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูป 3.19 และ 3.20 ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จากเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีนี้ให้ผลที่ถูกต้องมากกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปีซึ่งไม่สามารถทำการตรวจวัดได้

รูป 3.19 สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายฐานเหล็ก(III) ในอัตราส่วน 2 : 1



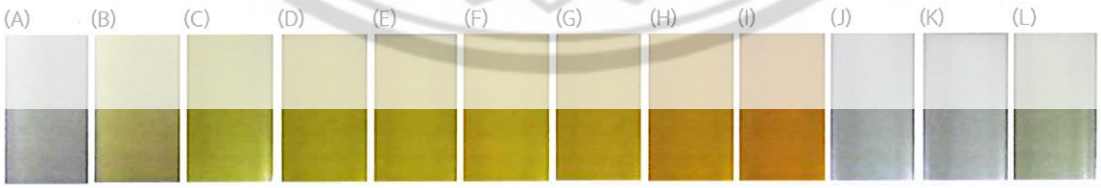
รูป 3.20 สารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชที (A) นมวัวพาสเจอไรซ์ (B) และนมวัวสดต้ม (C) ที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่เข้มข้น 2.6×10^{-5} มิลลิกรัมต่อลิตร

จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความผิดพลาดกำลังสองเฉลี่ย (Mean Sam of Square Error, MSE) พบว่าค่า MSE ของนมทั้ง 3 ชนิด มีค่าเท่ากับ 0 แสดงให้เห็นว่า ผลการทดลองที่ได้มีความถูกต้องสูง

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนม

3.2.1 การศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินมีสีเข้มที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำๆ

ผลการศึกษาที่ได้คือเลือกกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม เนื่องจากมีสีที่เข้มและไม่เป็นอันตราย เนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 7 – 10 โมลต่อลิตร มีไอกรดเกิดขึ้นระหว่างการเตรียมสารละลายมาตรฐาน เมื่อทำการเจือจางจนมีความเข้มข้นต่ำๆ พบว่ากรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6 – 10 โมลต่อลิตร สีของสารละลายมาตรฐานไม่แตกต่างกันมาก จึงเลือกกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลายในงานวิจัยนี้ ส่วนการใช้ตัวทำละลายอื่นๆ นั้นพบว่าสารละลายมาตรฐานมีสีที่จางเกินไป จึงไม่เหมาะสมกับการนำมาเป็นตัวทำละลาย ดังรูป 3.21



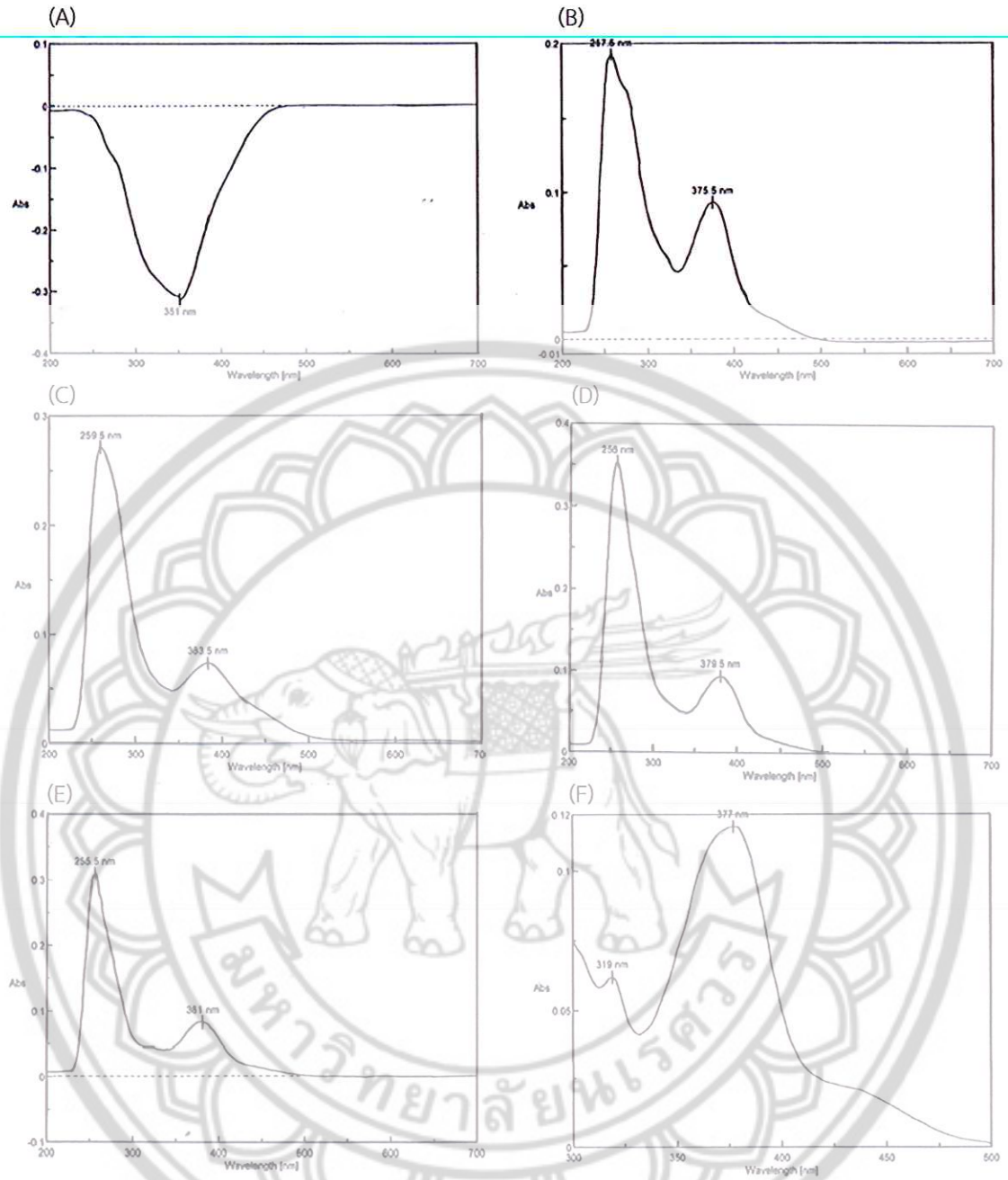
รูป 3.21 ภาพถ่ายสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1,000 ppm ที่ละลายด้วยตัวทำละลายต่างๆ ; (A) น้ำปราศจากไอออน, (B) – (I) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 – 10 โมลต่อลิตร, (J) – (K) กรดอะซิติกเข้มข้น 1% และ 10% โดยปริมาตร, (L) เมทานอล ตามลำดับ

3.2.2 การศึกษาหาสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินให้ชัดเจนขึ้น

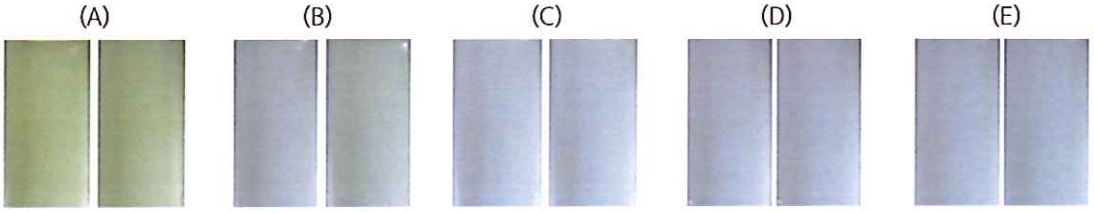
จากการสังเกตสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารละลายมาตรฐานโลหะชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อเติมเหล็ก(III) สีของสารละลายมาตรฐานที่เติมและไม่เติมไม่แตกต่างกัน เมื่อเติมทองแดง(II) พบว่าสีของสารละลายมาตรฐานที่เติมและไม่เติมแตกต่างกันมากที่สุด ส่วนเมื่อเติมนิกเกิล(II), แมงกานีส(II) และสังกะสี(II) พบว่าสีของสารละลายมาตรฐานที่เติมและไม่เติมแตกต่างกันเล็กน้อย และเมื่อนำไปหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดพบว่า เมื่อเติมเหล็ก(III) ค่าการดูดกลืนแสงติดลบทำให้ไม่สามารถหาค่าความยาวคลื่นสูงได้ ดังรูป 3.22 (A) ส่วนเมื่อเติมทองแดง(II), นิกเกิล(II), สังกะสี(II) และแมงกานีส(II) สามารถหาความยาวคลื่นสูงสุดได้ดังรูป 3.22 (B) – (F) ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายมาตรฐานโลหะเป็นทองแดง(II) เนื่องจากสีของสารละลายมาตรฐานที่เติมและไม่เติมทองแดง(II) แตกต่างกันมากที่สุด และสามารถหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดได้

3.2.3 การศึกษาหาอัตราส่วนโดยโมล (Mole ratio) ที่เหมาะสมระหว่างสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินกับสารละลายมาตรฐานทองแดง(II)

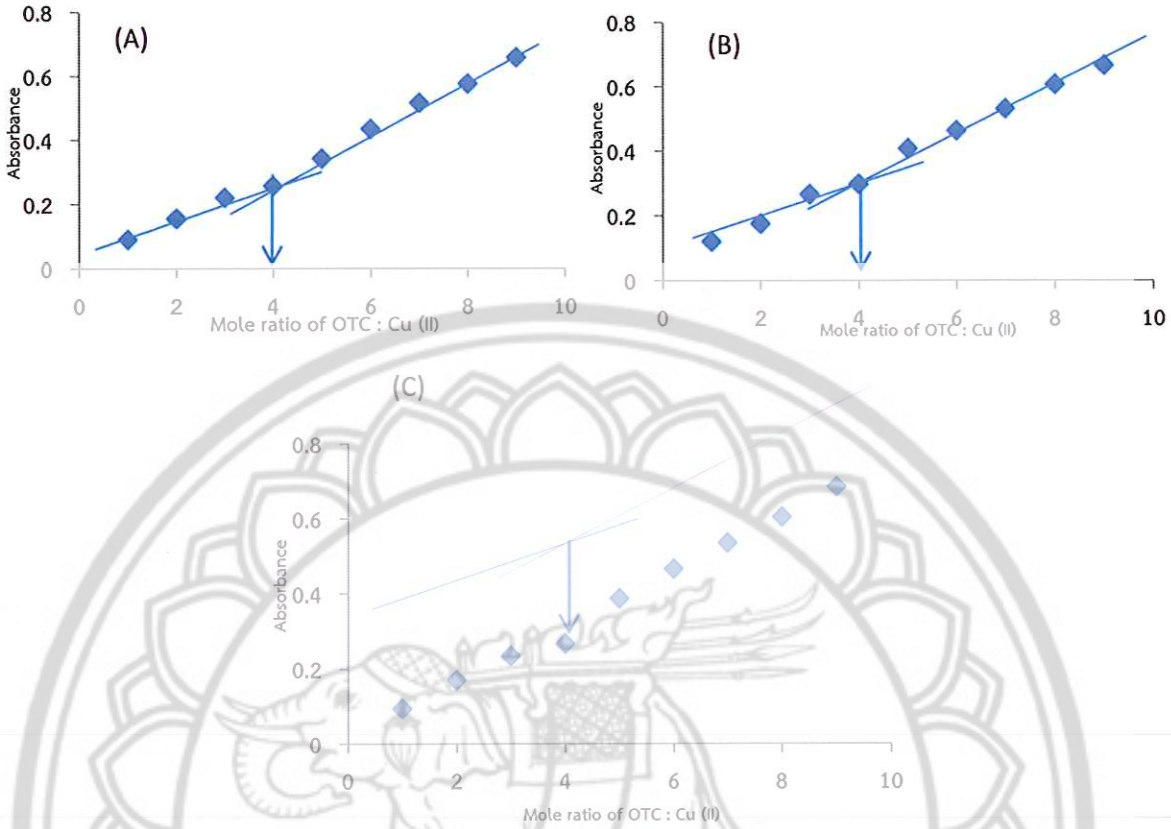
จากการศึกษาให้ความเข้มข้นของไอออนของโลหะทองแดง(II) มีค่าคงที่ เปลี่ยนเฉพาะความเข้มข้นของลิแกนด์คือออกซีเตตราไซคลิน (L) จะได้อัตราส่วนโดยโมลของทั้งสองแตกต่างกันดังตาราง 2.3 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด คือ ที่ความยาวคลื่น 380 นาโนเมตร ซึ่งได้จากการนำอัตราส่วนโมล 9 : 1 ไปหาความยาวคลื่นสูงสุด จากนั้นสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนของ [L]/[M] เพื่อหาจุดตัดของเส้นตรงสองเส้นจากกราฟ ดังรูป 3.24 (A) - (C)



รูป 3.22 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างออกซีเตตราไซคลินกับโลหะต่างๆ ; (A) ออกซีเตตราไซคลินกับเหล็ก(III), (B) ออกซีเตตราไซคลินกับทองแดง(II), (C) ออกซีเตตราไซคลินกับนิกเกิล(II), (D) ออกซีเตตราไซคลินกับสังกะสี(II), (E) ออกซีเตตราไซคลินกับแมงกานีส(II) และ (F) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของออกซีเตตราไซคลิน



รูป 3.23 ภาพถ่ายสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1,000 ppm เมื่อไม่เติม (ซ้าย) และเติม (ขวา) เหล็ก(III) (A), ทองแดง(II) (B), นิกเกิล(II) (C), สังกะสี(II) (D) และแมงกานีส(II) (E)

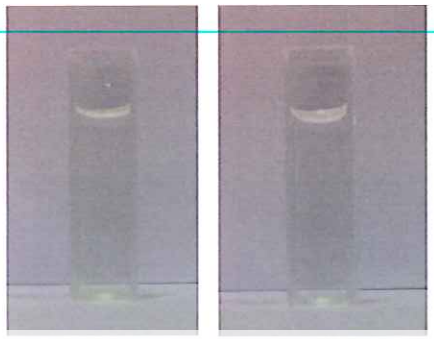


รูป 3.24 แสดงจุดตัดของเส้นตรงสองเส้นจากกราฟที่ได้ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนของ [L]/[M] ครั้งที่ 1 (A), ครั้งที่ 2 (B) และครั้งที่ 3 (C) ตามลำดับ

อัตราส่วนโดยโมลของออกซีเตตราไซคลินกับทองแดง(II) ที่เหมาะสมพบว่าอยู่ที่ 4 : 1 โดยดูได้จากจุดตัดของเส้นตรงสองเส้นจากกราฟที่ได้ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนของ [L]/[M] จากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ดังนั้นเราจึงเลือกอัตราส่วนโมลนี้ ในการทำให้เกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดง(II) กับออกซีเตตราไซคลิน

3.2.4 การศึกษาหาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT, นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้มโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี

จากการศึกษาในหัวข้อ 2.3.2.4 พบว่าเมื่อนำภาพถ่ายของทั้งสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินและตัวอย่างนมเข้าสู่การประมวลผลด้วยโครงข่ายประสาทเทียม ผลลัพธ์ที่ได้คือตัวอย่างนมจะมีความเข้มข้นของสารออกซีเตตราไซคลินประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลิน ส่วนค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างนมแต่ละชนิดจะแสดงดังตาราง 3.6 และเมื่อทำการสังเกตด้วยตาพบว่าสีของตัวอย่างนมมีค่าใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างเช่น ตัวอย่างนม UHT กับสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูป 3.25



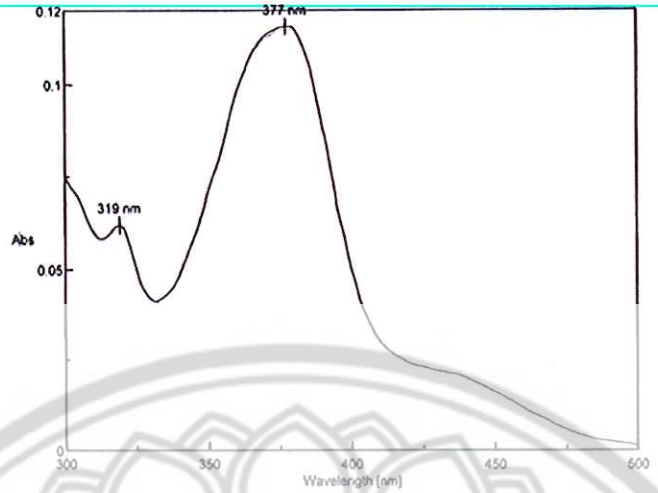
รูป 3.25 ภาพถ่ายสีของตัวอย่างนม UHT (ซ้าย) เทียบกับสีของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตาราง 3.6 ปริมาณออกซีเตตราไซคลินที่ตรวจพบในนมทั้ง 3 ชนิดโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริเมตรี

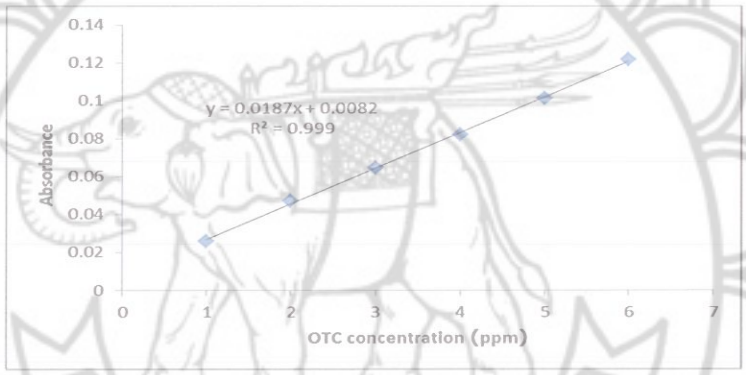
ชนิดของนม	ปริมาณออกซีเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7
นม UHT	1	1	1	1	1	1	1
นมพาสเจอร์ไรซ์	1	1	<1	1	1	1	1
นมสดต้ม	1	1	1	<1	<1	2	1

3.2.5 การศึกษาหาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT, นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้มโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโทเมตรี

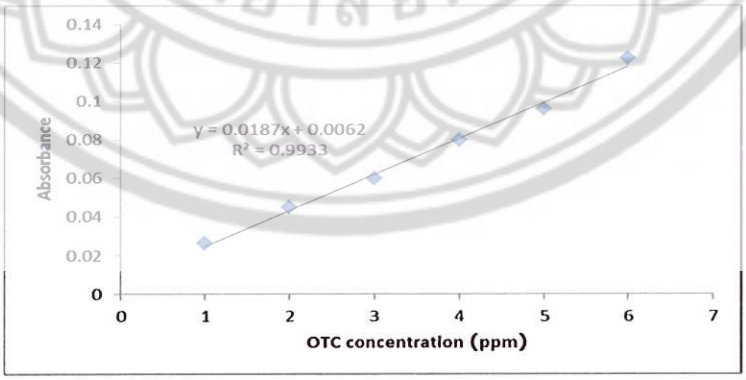
จากการศึกษาหัวข้อ 2.3.2.5 พบว่าเมื่อนำสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดได้สเปกตรัมดังรูป 3.26 และเมื่อทำการสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินได้กราฟดังรูป 3.27 – 3.29 จากกราฟจะได้สมการเส้นตรงเพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างนมแต่ละชนิด ดังตาราง 3.7



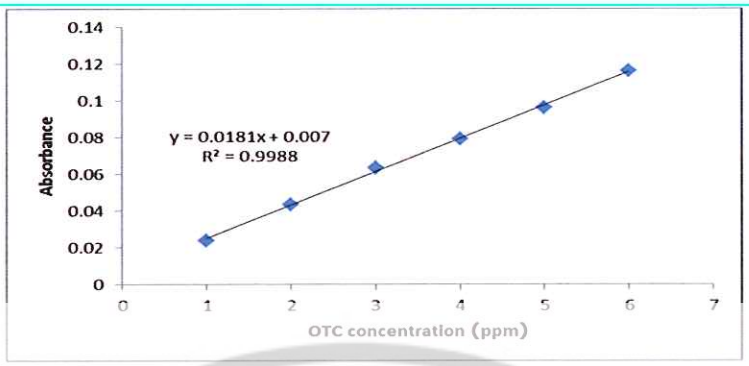
รูป 3.26 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของออกซีเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูป 3.27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินสำหรับตัวอย่างนม UHT



รูป 3.28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินสำหรับตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์



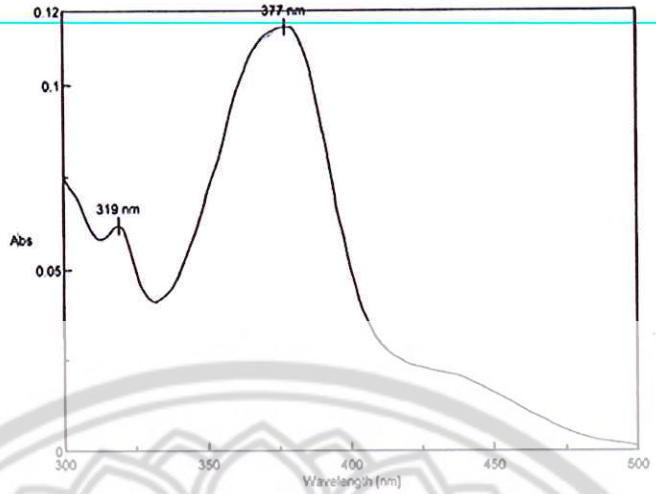
รูป 3.29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินสำหรับตัวอย่างนมสดต้ม

ตาราง 3.7 ปริมาณออกซีเตตราไซคลินที่ตรวจพบในนมทั้ง 3 ชนิดโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี

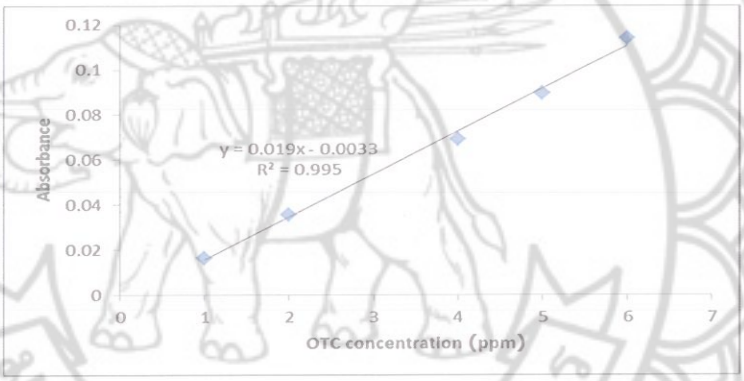
ชนิดของนม	ปริมาณออกซีเตตราไซคลิน (ppm)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
นม UHT	0.90	0.82	0.70	0.81
นมพาสเจอร์ไรซ์	0.81	1.02	1.48	1.10
นมสดต้ม	0.70	0.97	1.15	0.94

3.2.6 การหาค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นม UHT, นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้ม

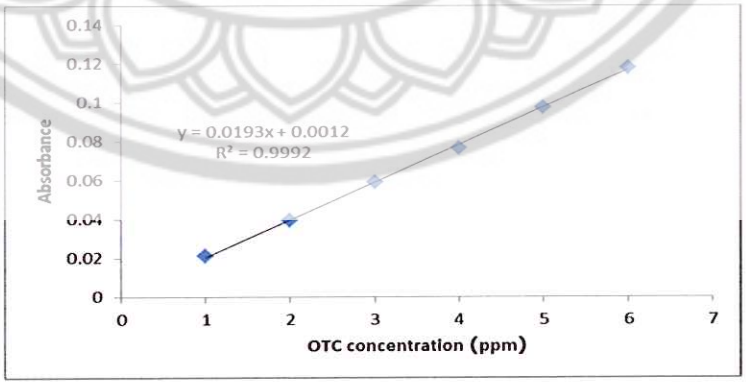
จากการศึกษาตามหัวข้อ 2.3.2.6 พบว่าเมื่อนำสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินที่เข้มข้น6 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปวัดความยาวคลื่นสูงสุดได้สเปกตรัมดังรูป 3.30 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินกับตัวอย่างนมทั้ง 3 ชุด และได้กราฟมาตรฐานที่แสดงในรูป 3.31 – 3.33 จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของนมทั้ง 3 ชนิด ได้ดังตาราง 3.8



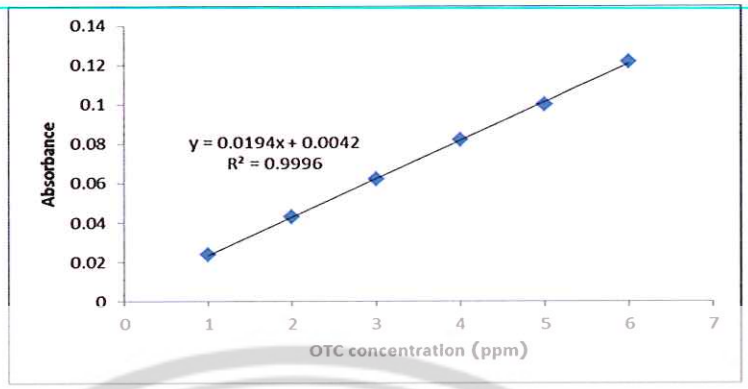
รูป 3.30 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับการหาค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery)



รูป 3.31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินสำหรับใช้หาค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของนม UHT



รูป 3.32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินสำหรับใช้หาค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของนมพาสเจอร์ไรซ์



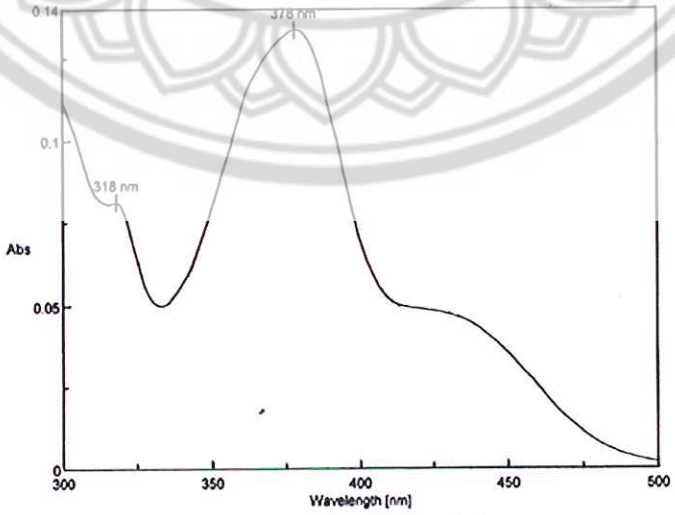
รูป 3.33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลิน สำหรับใช้หาค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของนมสดต้ม

ตาราง 3.8 ค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของตัวอย่างนมชนิดต่างๆ

ตัวอย่างนม	ปริมาณออกซีเตตราไซคลินที่ตรวจพบ (ppm)		ค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery)
	เติม 2 ppm OTC	ไม่เติม OTC	
นม UHT	2.70	0.43	113
นมพาสเจอร์ไรซ์	3.03	0.81	111
นมสดต้ม	2.90	0.60	115

3.2.7 การศึกษาหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of detection, LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการหาค่าความยาวคลื่นสูงสูดโดยใช้สารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้สเปกตรัมดังแสดงในรูป 3.34



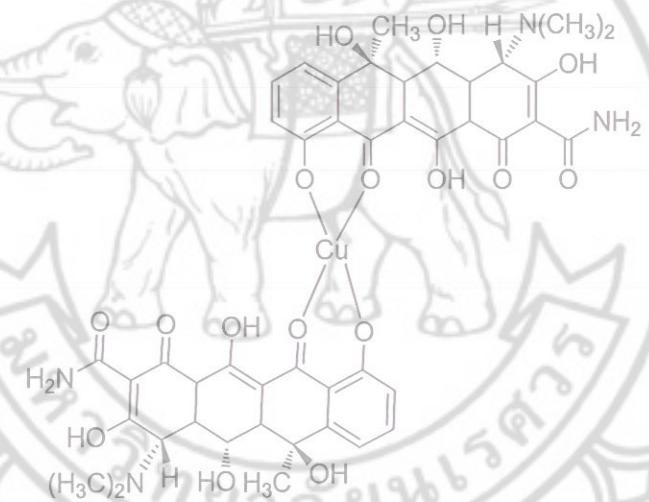
รูป 3.34 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของออกซีเตตราไซคลินเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

และสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำนมพบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ทำให้สีของออกซีเตตราไซคลินมีลักษณะที่เข้มที่สุดคือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลต่อลิตร เนื่องจากไม่เกิดควันในระหว่างการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลิน และเมื่อต้องการเตรียมสารละลายออกซีเตตราไซคลินให้มีความเข้มข้นต่ำๆ ผู้วิจัยได้ใช้สารละลายมาตรฐานโลหะทองแดง(II) เพราะเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับออกซีเตตราไซคลินแล้วจะทำให้สีของสารละลายเข้มขึ้น สามารถมองเห็นสีที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้ โดยอัตราส่วนโดยโมลของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินกับโลหะทองแดง(II) ที่เหมาะสมคือ 4:1

ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนมวัวนั้น ควรเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 20% จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อกำจัดโปรตีนในนมวัว เมื่อเตรียมตัวอย่างนมวัวแล้วควรตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที จะให้สีที่ชัดเจนกว่าถ่ายทันทีหลังจากเตรียมเสร็จ และสภาวะในการถ่ายภาพด้วยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีนั้น คือ วัดแสงที่เครื่องทุกครั้งเมื่อต้องการถ่ายภาพให้อยู่ที่ประมาณ 330 ถึง 350 ลักซ์ ด้วยเครื่องวัดแสง วางเซลล์ใส่สารตัวอย่างให้อยู่ห่างจากฉากหลัง 8 เซนติเมตร และห่างจากโทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะ 12 เซนติเมตร จากนั้นนำภาพที่ถ่ายได้ส่งไปยังคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมประมวลผลค่าสี RGB (Red, Green and Blue) ด้วยเทคนิคโครงข่ายประสาทเทียมแบบย้อนกลับ (Back Propagation Neural Network, BPNN) จากการทดลองพบว่า ค่าความเข้มสีในระบบ RGB ของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีที่ได้สร้างขึ้นนี้ ให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้โดยดูจากค่าความเป็นเส้นตรง (R^2) ของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีในระบบ RGB กับความเข้มข้นของเตตราไซคลินที่เท่ากับ 1 ซึ่งตรวจสอบหาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวยูเอชที นมวัวพาสเจอไรซ์ และนมวัวสดต้มพบว่า ในนมวัวทั้ง 3 ชนิดนั้นมีปริมาณของเตราไซคลินน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทุกครั้งที่ทำการทดลอง ซึ่งเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีนี้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความผิดพลาดกำลังสองเฉลี่ย (Mean Sam of Square Error, MSE) เท่ากับ 0 จึงกล่าวได้ว่า เทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการหาปริมาณเตตราไซคลินในนมวัวมากที่สุดเมื่อเทียบกับเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี และสำหรับออกซีเตตราไซคลินเมื่อทำการหาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างนมโดยเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีโดยทำการทดลอง 7 ซ้ำ พบว่าตัวอย่างนมจะมีความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินมีค่าประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อทำการหาปริมาณออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่างนมโดยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่าตัวอย่างนม UHT นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้ม มีความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินเฉลี่ยเท่ากับ 0.81, 1.10 และ 0.94 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสำหรับค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของตัวอย่างนม UHT, นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดต้ม มีค่าเท่ากับ 113%, 111% และ 115% ตามลำดับ ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of detection,

LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.0203 และ 0.0679 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และส่วนค่า LOQ ของเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีมีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เนื่องจากงานวิจัยนี้ในการวิเคราะห์หาออกซีเตตราไซคลินได้มีวิธีการเพิ่มความเข้มของสีของสารละลายโดยใช้สารละลายมาตรฐานโลหะทองแดง(II) เพื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับออกซีเตตราไซคลิน และพบว่าอัตราส่วนโดยโมลของสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินกับโลหะทองแดง(II) ที่เหมาะสมคือ 4:1 แต่จากงานวิจัยของ Sultan และคณะ[36] พบว่าโลหะทองแดง(II) จะจับกับลิแกนด์อื่นได้ 6 แขน นั่นคือจะสามารถจับกับออกซีเตตราไซคลินได้มากที่สุด 3 ตัว แต่เนื่องจากออกซีเตตราไซคลินมีสูตรโครงสร้างขนาดใหญ่ ถ้าออกซีเตตราไซคลิน 3 ตัว จับกับโลหะทองแดง(II) 1 ตัว จะเกิดความเกะกะ (steric effect) ของลิแกนด์ขึ้นได้ ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นน่าจะเป็น 2:1 ของออกซีเตตราไซคลินกับโลหะทองแดง(II) ดังรูป 5.2



รูป 4.2 ปฏิกิริยาที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างออกซีเตตราไซคลินกับโลหะทองแดง(II) โดยอัตราส่วนโดยโมล 2 : 1

ข้อเสนอแนะ

จากปริมาณของเตตราไซคลินและออกซีเตตราไซคลินที่สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งจากเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทเมตรี และเทคนิคดิจิตอลอิมเมจคัลเลอริเมตรีพบว่ามีปริมาณที่เกินกว่าค่าต่ำสุดที่กำหนดไว้คือ 0.1 หรือ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามมาตรฐานสากล ดังนั้นควรมีการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีอื่นๆ ร่วมด้วยเพื่อกำจัดสิ่งตกค้างหรือสิ่งรบกวนต่อการวิเคราะห์ และควรมีการต่อยอดงานวิจัยนี้ต่อไป โดยการหาตัวทำละลายที่ทำให้สีของสารละลายใน

บรรณานุกรม

[1] พีรพันธ์ คอทอง. "วิเคราะห์เจาะลึกอุตสาหกรรมนมประเทศไทย". เอกสารทางวิชาการ. [ออนไลน์]. ตุลาคม 2552 - มีนาคม 2553. เข้าถึงได้จาก : http : //www.dld.go.th/transfer/th/. (วันที่ค้นข้อมูล : 20 ธันวาคม 2556).

[2] ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล. "สารเสริมอาหารสัตว์ (Animal Feed Additives)." เอกสารคำสอน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://vet.ku.ac.th/vetthai/images/e-learning/Natthasit%20Tansakul/A1.pdf (วันที่ค้นข้อมูล : 20 ธันวาคม 2556).

[3] Babyhub. (2551). blog น้ำนม. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http ://www.naamnom.blogspot.com/2008/10/blog-post_74.html. (วันที่ค้นข้อมูล: 25 พฤศจิกายน 2556).

[4] กรมปศุสัตว์. (2556). ระบบเฝ้าระวังสารตกค้างในสินค้าปศุสัตว์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://dld.go.th/certity/th/images/stories/report/academic/Residue.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล : 17 พฤศจิกายน 2556).

[5] M.M. Abbasi, H. Babaei, M. Ansarin, A.-O.-S. Nourdadgar and M. Nemati. (2011). Simultaneous Determination of Tetracyclines Residues in Bovine Milk Samples by Solid Phase Extraction and HPLC-FL Method., *Advanced PharmaceuticalBulletin.* 1, 34-39.

[6] F. Conzuelo, M. gamella, S. Campuzano, A.J. Reviejo, and J.M. Pingarrón. (2012). Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk., *Analytica Chimica Acta.* 737,29- 36.

[7] S. Wang, P. Yang, and Y. Cheng. (2007). Analysis of tetracycline residues in Bovine milk by CE-MS with field-amplified sample stacking., *Electrophoresis.* 28, 4173-4179.

[8] J.A. Rodriguez, J. Espinosa, K.A. Arteaga, I.S. Ibarra, and J.M. Miranda. (2010). Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis., *Microchim Acta.* 171, 407-413.

[9] O. Hisao, I. Yuko, I. Yoshitomo, K. Tadaaki, and H. Ken-ichi. (1998). Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods., *Journal of Chromatography A.* 812, 309-319.

[10] Bang-iam, N.; Udnan, Y.; Masawat, P. (2013). Design and fabrication of artificial neural network-digtal image-based colorimeter for protein assay in natural rubber latex and medical latex gloves., *Microchemical Journal.* 106, 270 – 275.

[11] ดานิส ทวีติยานนท์ และทัศนีย์ ล้อชัยเวช. (2539). การศึกษาปริมาณสารตกค้างกลุ่ม Tetracyclines ในเนื้อไก่และตับไก่. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.elid.fad.moph.go.th/library/ref/Animal Medic.html. (วันที่ค้นข้อมูล : 15พฤศจิกายน 2556).

[12] Z. Bijan and D.W. Gerard. (2008). **Chemical biology of tetracycline antibiotics.,** *Biochem Cell Biol.* 86, 124-136.

[13] N. Neeser. (2003). **Antibiotic Use in Production Agriculture.,** *Proceedings of the Minnesota Dairy Health Conference : College of Veterinary Medicine, University of Minnesota.*

[14] สิทธิกร อุทรังษ์. (2550). จดหมายข่าวสุขภาพสัตว์. [ออนไลน์] ฉบับที่ 4 ประจำเดือนตุลาคม – ธันวาคม. เข้าถึงได้จาก : http://www.dld.go.th/urd/Se/th/attachments/article/64/dec_50.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล : 15 พฤศจิกายน 2556).

[15] น.สพ.ตระการศักดิ์ แพไธสง. โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.dld.go.th/vrd_wp/images/stories/File%20PDF/animal%20deseases%20060955/6.Mastitis.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล : 20 พฤศจิกายน 2556).

[16] R. Daghrir and P. Drogui. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment : a review., *Environ Chem Lett.*

[17] H. Scott (2011). Antibiotics Sold in Livestock., Hurd Health: Animal Health and Food Safety. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://hurdhealth.com/. (วันที่ค้นข้อมูล : 3 ธันวาคม 2556).

[18] พยงค์ เทพอักษร. (2544). เภสัชวิทยา 2. กรุงเทพฯ : สถาบันพระบรมราชนก.

[19] M. Rysz and P.J.J. Alvarez. (2004). Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments., *Water Research.* 38, 3705-3712.

[20] อโนชา อุทัยพัฒน์. (2536). เภสัชวิทยาเล่ม 2. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

[21] S. Yang, J. Chaand, K. Carlson. (2005). Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry., *J. Chromatography A,* 1097, 40-53.

[22] พนม ฟูตระกูล. (2538). ชีวเคมีของยาและพิษ. เชียงใหม่ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

[23] (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง). (2550). เรื่องน่ารู้ของนมนมนม. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.dek-d.com/board/view/927973/. (วันที่ค้นข้อมูล : 25 พฤศจิกายน 2556).

[24] กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (ไม่ปรากฏปีที่เผยแพร่). กระบวนการผลิตนม. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.dpo.go.th/main php?filename=process. (วันที่ค้นข้อมูล : 25 พฤศจิกายน 2556).

[25] วรนันท์ ศุภพิพัฒน์. (ไม่ปรากฏปีที่เผยแพร่). ประเภทนมที่ขายในตลาด. วารสารโภชนาบำบัด. เข้าถึงได้จาก : http://www.md.chula.ac.th/public/medinfofood/milk/ml.html. (วันที่ค้นข้อมูล : 25 พฤศจิกายน 2556).

[26] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (1995). Committee for Veterinary Medicinal Products Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline. Summary Report (3). เข้าถึงได้จาก : http://www.emea.eu.int/pdfs/ vet/mrls/Tetracyclines(3)02395.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล : 25 พฤศจิกายน 2556).

[27] ศูนย์วิทยาศาสตร์เพื่อการศึกษา. อิมมูโนแอสเซย์ (Immunoassays). ระบบฐานข้อมูลองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี ดาราศาสตร์และสิ่งแวดล้อม. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : http://203.172.130.100/nfe_webkm/display_directory_view.php?direct=direct&&search=%CD%D4%C1%C1%D9%E2%B9%E1%CD%CA%E0%AB%C2%EC+(Immunoassays)&&enc_id=1584 . (วันที่ค้นข้อมูล : 29 ธันวาคม 2556)

[28] รศ. แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์ 50 จำกัด, 2553.

[29] (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง). หลักการของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : http://glasswarechemical.com/scientific-instrument/%E0%B8%AB%E0%B8%A5%E0%B8%B1%E0%B8%81%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3-uv-vis-spectrophotometer/. (วันที่ค้นข้อมูล : 29 ธันวาคม 2556).

[30] ดร.สุจิตรา บุญเกิด. Capillary Electrophoresis กับการวิเคราะห์. งานวิจัยเภสัชเคมีภัณฑ์. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : http://www.gpo.or.th/rdi/html/g40-g41.html. (วันที่ค้นข้อมูล : 29 ธันวาคม 2556).

[31] นางอุทัยวรรณ แสงเสถียร. (2545). การประยุกต์เทคนิคโฟลอินเจ็กชั่นในการวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงและนิกเกิล โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับ bis(acetylacetone)propylenediimine. วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย

ศิลปากร. เข้าถึงได้จาก : http://www.thapra.lib.su.ac.th/objects/thesis/fulltext/snamcn/Utaiwan_Sangsatein/Fulltext.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล 29 พฤศจิกายน 2556).

[32] Joseph R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition . (2009). University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA

[33] วิชัย ริ้วตระกูล และคณะ. การประยุกต์สเปคโตรสโคปีในเคมีอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : นำอักษรการพิมพ์, 2526.

[34] นนทวัฒน์ บางเอี่ยม และ ปริญญา มาสวัสดิ์. (2555). การพัฒนาเครื่องดิจิตอลอิมเมจเบสคัลเลอริมิเตอร์สำหรับการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพารา. พิษณุโลก: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

[35] ชญานนท์, วันรัต และ วิภาส. เทคโนโลยีชีวภาพในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. เข้าถึงได้จาก : http://cynthusneyapan.blogspot.com/20010101archive.html. (วันที่ค้นข้อมูล 12 พฤศจิกายน พ.ศ. 2556).

[36] Sultan, S.M.; Alzamil, I.Z. & Alarfaj, N.A. (1988). Complexometric-Spectro photometric Assay of Tetracycline in Drug Formulations., *Talanta.* 35, 375 – 378.

[37] แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. Principles and Techniques of Instrumental Analysis. 67 – 68.

[38] N. Furusawa. (1999). Rapid liquid chromatographic determination of oxytetracycline in milk., *J. Chromatography A,* 839, 247-251.

[39] G. Boatto, A. Pau, M. Palomba, L. Arenare, R. Cerri. (1999). Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 20, 321-326.

[40] A.L. Cinquina, F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti, R. Cozzani. (2003). Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle., *J. Chromatography A,* 987, 227-233.

[41] P. Jevinova, E. Dudrikova, J. Sokol, J. Nagy, D. Mate, M. Pipova, R. Cabadaj. (2003). Determination of oxytetracycline residues in milk with the use of HPLC method and two microbial inhibition assays., *Bull. Vet. Inst,* 47, 211-216.

[42] Fritz, J.W. & Zuo, Y. (2007). **Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography.,** *Food Chemistry.* 105, 1297 – 1301.

[43] Masawat, P. & Slater, J.M. (2007). **The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE).,** *Sensors and Actuators B.* 124, 127 – 132.

[44] D.J. Fletouris, E.P. Papapanagiotou, D.S. Nakos. (2008). Liquid chromatographic determination and depletion profile of oxytetracycline in milk after repeated intramuscular administration in sheep., *J. Chromatography B,* 876, 148-152.

[45] เพชรรัตน์ ศักดิ์นันท์, ตระการศักดิ์ แพไธสง และ สิริลักษณ์ สายหงษ์. (2549). คลอเตตราไซคลิน และออกซีเตตราไซคลินในอาหารสัตว์จาก 4 จังหวัดภาคตะวันตก. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการ สัตวแพทย์ภาคตะวันตก.

[46] อนงค์ บัณฑวิหค และ ดานิศ ทวีติยานนท์. (2545). ยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่ เนื้อสุกร และน้ำนมโคในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[47] Sumriddetchkajorn, S.; Chaitavon, K. & Intaravanne, Y. (2013). Mobile device-based self-referencing colorimeter for monitoring chlorine concentration in water., *Sensors and Actuators B.* 182, 592 – 597.

[48] นันทวัน ชาชัย, นิโลบล หลักหาญ และ พรนรินทร์ สิงห์เถื่อน. (2556). การสร้างชุดทดสอบเพื่อหาปริมาณเตตราซัยคลินในยาเตรียม. พิษณุโลก: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ภาคผนวก ก

การคำนวณ

ก.1 การคำนวณหาปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1, 5, 7.5 และ 10 โมลต่อลิตร

คิดการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตรก่อน

จากกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) 37% มีมวลโมเลกุล = 36.46

สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1,000 มิลลิลิตร มีกรดไฮโดรคลอริก 1 โมล

หรือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1,000 มิลลิลิตร มีกรดไฮโดรคลอริก 36.46 กรัม

ถ้าสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร มีกรดไฮโดรคลอริก $\frac{36.46 \times 100}{1,000}$

$= 3.65$ กรัม

จากความหนาแน่น 1.19 กรัมต่อมิลลิลิตร

กรดไฮโดรคลอริก 1.19 กรัม เท่ากับ 1 มิลลิลิตร

ถ้ากรดไฮโดรคลอริก 3.65 กรัม เท่ากับ $\frac{1 \times 3.65}{1.19} = 3.07$ มิลลิลิตร

คิดกรดไฮโดรคลอริกในความเข้มข้น 37%

กรดไฮโดรคลอริก 37 มิลลิลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร

ถ้ากรดไฮโดรคลอริก 3.07 มิลลิลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก $\frac{100 \times 3.07}{37}$

$= 8.29$ มิลลิลิตร

ดังนั้น การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร จะตวงกรดไฮโดรคลอริก 8.29 มิลลิลิตร

ถ้าเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จะตวงกรดไฮโดรคลอริก $\frac{20 \times 8.29}{100} = 1.66$ มิลลิลิตร

ถ้าเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จะตวงกรดไฮโดรคลอริก $1.66 \times 5 = 8.3$ มิลลิลิตร

ถ้าเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลต่อลิตร ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร จะตวงกรดไฮโดรคลอริก $\frac{1,000 \times 8.3}{20} = 415$ มิลลิลิตร

ถ้าเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 7.5 โมลต่อลิตร ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จะตวงกรดไฮโดรคลอริก 1.66 x 7.5 = 12.45 มิลลิลิตร

ถ้าเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 โมลต่อลิตร ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จะตวงกรดไฮโดรคลอริก 1.66 x 10 = 16.6 มิลลิลิตร

ก.2 การคำนวณปริมาตรเตตราไซคลินที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตตราไซคลินมีมวลโมเลกุล = 480.9

การเตรียมให้สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินมีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

โดย 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร = 1 กรัมต่อลิตร

หาจำนวนโมลของเตตราไซคลิน จากสูตร จำนวนโมล = กรัม/มวลโมเลกุล

แทนค่า = 1/480.9

= 2.08×10^{-3}

= 0.00208 โมล

หาจำนวนกรัมของเตตราไซคลินที่ใช้ จากสูตร จำนวนกรัม /มวลโมเลกุล = จำนวนโมล x ปริมาตร /1,000

แทนค่า "จำนวนกรัม/480.9 = (0.00208) x (10)/1,000

จำนวนกรัม = 0.01 กรัม

ดังนั้น สารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องชั่งเตตราไซคลินมา 0.01 กรัม

ถ้าจะเตรียมสารละลายเตตราไซคลินให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ก่อน โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากสูตร ความเข้มข้นเริ่มต้น x ปริมาตรเริ่มต้น = ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม x ปริมาตรที่ต้องการเตรียม

แทนค่า (1,000) x (ปริมาตรเริ่มต้น) = (100) x (10)

ปริมาตรเริ่มต้น = 1 มิลลิลิตร

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องปิเปตจากสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาจำนวน 1 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรเหมือนข้างต้น

แทนค่า $(100) \times (\text{ปริมาตรเริ่มต้น}) = (1) \times (10)$

$\text{ปริมาตรเริ่มต้น} = 0.1$ มิลลิลิตร

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องปิเปตจากสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มาจำนวน 0.1 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้มีความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีวิธีการคำนวณเหมือนการเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องปิเปตจากสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มาจำนวน 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ก.3 การคำนวณหาปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่เติมลงในสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างนมวัวมากเกิน 5 เท่า จากอัตราส่วนของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 4 : 1

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินในการทดลองนี้จะเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้นที่สุด คือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดย 5 มิลลิกรัมต่อลิตร $= 5 \times 10^{-3}$ กรัมต่อลิตร $= 1.04 \times 10^{-5}$ โมลต่อลิตร

จาก [TC] 4×10^{-4} โมลต่อลิตร ต่อ [Fe] 1×10^{-4} โมลต่อลิตร

ถ้า [TC] 1.04×10^{-5} โมลต่อลิตร ต่อ [Fe] $\dfrac{(1.04 \times 10^{-5}) \times (1 \times 10^{-4})}{4 \times 10^{-4}}$

$= 2.6 \times 10^{-6}$ โมลต่อลิตร

ถ้าเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เกิน 5 เท่า $= (2.6 \times 10^{-6}) \times 5$

$= 1.3 \times 10^{-5}$ โมลต่อลิตร

ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่เติมลงไปในสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างนมวัว คือ 1.3×10^{-5} โมลต่อลิตร

เมื่อทราบความเข้มข้นแล้วจากนั้นก็ทำการคำนวณหาปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเหล็ก (III) ที่ใช้

จากขวดสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกไนเตรตมีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดย 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร = 2×10^{-2} โมลต่อลิตร เจือจางให้เป็น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร

จากสูตร ความเข้มข้นเริ่มต้น x ปริมาตรเริ่มต้น = ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม x ปริมาตรที่ต้องการเตรียม

แทนค่า $(2 \times 10^{-2}) \times$ (ปริมาตรเริ่มต้น) = $(1 \times 10^{-3}) \times (10)$

ปริมาตรเริ่มต้น = 0.5 มิลลิลิตร

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ให้มีความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องปิเปตจากสารละลายเฟอร์ริกไนเตรต 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาจำนวน 0.5 มิลลิลิตร

จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) อีกครั้งให้มีความเข้มข้นเป็น 1.3×10^{-5} โมลต่อลิตร โดยใช้สูตรเหมือนข้างต้น

แทนค่า $(1 \times 10^{-3}) \times$ (ปริมาตรเริ่มต้น) = $(1.3 \times 10^{-5}) \times (10)$

ปริมาตรเริ่มต้น = 0.13 มิลลิลิตร

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ให้มีความเข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องปิเปตจากสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร มาจำนวน 0.13 มิลลิลิตร

ก.4 การคำนวณหาปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่เติมลงในสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างนมวัวมากเกิน 5 เท่า จากอัตราส่วนของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินต่อสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เท่ากับ 2 : 1

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินในการทดลองนี้จะเตรียมสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้นที่สุด คือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดย 5 มิลลิกรัมต่อลิตร = 5×10^{-3} กรัมต่อลิตร = 1.04×10^{-5} โมลต่อลิตร

จาก [TC] 2×10^{-4} โมลต่อลิตร ต่อ [Fe] 1×10^{-4} โมลต่อลิตร

ถ้า [TC] 1.04×10^{-5} โมลต่อลิตร ต่อ [Fe] $\dfrac{(1.04 \times 10^{-5}) \times (1 \times 10^{-4})}{2 \times 10^{-4}}$

$= 5.2 \times 10^{-6}$ โมลต่อลิตร

ถ้าเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) เกิน 5 เท่า = $(5.2 \times 10^{-6}) \times 5$

= 2.6×10^{-5} โมลต่อลิตร

ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่เติมลงไปในสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างนมวัว คือ 2.6×10^{-5} โมลต่อลิตร

เมื่อทราบความเข้มข้นแล้วจากนั้นก็ทำการคำนวณหาปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเหล็ก (III) ที่ใช้

จากขวดสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริกไนเตรตมีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร = 2×10^{-2} โมลต่อลิตร เจือจางให้เป็น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร

จากสูตร ความเข้มข้นเริ่มต้น x ปริมาตรเริ่มต้น = ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม x ปริมาตรที่ต้องการเตรียม

แทนค่า $(2 \times 10^{-2}) \times$ (ปริมาตรเริ่มต้น) = $(1 \times 10^{-3}) \times (10)$

ปริมาตรเริ่มต้น = 0.5 มิลลิลิตร

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ให้มีความเข้มข้น 1 x 10-3 โมลต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องปิเปตจากสารละลายเฟอร์ริกไนเตรต 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาจำนวน 0.5 มิลลิลิตร

จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) อีกครั้งให้มีความเข้มข้นเป็น 2.6×10^{-5} โมลต่อลิตร โดยใช้สูตรเหมือนข้างต้น

แทนค่า $(1 \times 10^{-3}) \times$ (ปริมาตรเริ่มต้น) = $(2.6 \times 10^{-5}) \times (10)$

ปริมาตรเริ่มต้น = 0.26 มิลลิลิตร

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ให้มีความเข้มข้น 2.6×10^{-5} โมลต่อลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องปิเปตจากสารละลายมาตรฐานเหล็ก(III) ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลต่อลิตร มาจำนวน 0.26 มิลลิลิตร

ก.5 การคำนวณค่าความผิดพลาดกำลังสองเฉลี่ย (Mean Sam of Square Error, MSE)

ค่า MSE คือ ค่าความผิดพลาดกำลังสองเฉลี่ย โดยปกติแล้วนิยมจะใช้วิธี MSE มาก เพราะให้ความแม่นยำในการตรวจสอบสูงกว่าแล้วสามารถใช้เปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบต่างๆ โดยดูจากค่าดัชนี มีสูตรการคำนวณ คือ

$$MSE = \sum_{i=1}^{n} \frac{(X_i - F_i)^2}{n}$$

โดย Xi คือ ค่าสังเกตที่ i

Fi คือ ค่าตรวจสอบที่ i

n คือ จำนวนข้อมูล

ตัวอย่างการคำนวณ

ครั้งที่	ค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างนมวัวยูเอชทีจริง ($mg\ L^{-1}$)	ค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างนมยูเอชทีที่ประมวลผลด้วยโปรแกรมค่าสี RGB
1	< 1	< 1
2	< 1	< 1
3	< 1	< 1
4	< 1	< 1
5	< 1	< 1
6	< 1	< 1
7	< 1	< 1

แทนค่าสูตร

$$MSE = \frac{(<1-<1)^2 + (<1-<1)^2 + (<1-<1)^2 + (<1-<1)^2 + (<1-<1)^2 + (<1-<1)^2 + (<1-<1)^2}{7}$$

$$= 0$$

ดังนั้น ค่า MSE ของนมวัวยูเอชที มีค่า เท่ากับ 0

ซึ่งการคำนวณค่า MSE ของนมวัวพาสเจอไรซ์และนมวัวสดต้มก็คำนวณเหมือนกับดังตัวอย่างข้างต้น

Output ที่ได้จากโครงการ

ได้นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 39 เมื่อ 21-23 ตุลาคม 2556 ในหัวข้อเรื่อง "RAPID QUANTITATIVE TEST FOR TETRACYCLINE IN MILK USING DIGITAL IMAGE-BASED COLORIMETRY" และมีการตีพิมพ์บน Proceedings

ภาคผนวก 1

Proceedings of The 39th Congress on Science and Technology of Thailand

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Proceedings Book

The 39th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 39)

"Innovative Science for a Better Life"

21st-23rd October 2013

at

Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC)
Bangkok, Thailand

organized by

The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King

in association with

Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT)

C1_C0005: RAPID QUANTITATIVE TEST FOR TETRACYCLINE IN MILK USING DIGITAL IMAGE-BASED COLORIMETRY

Rungrat Urapen, Prinya Masawat*
Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand
Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand and
Research Center for Academic Excellence in Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
*e-mail: prinyam@nu.ac.th

Abstract: Digital image-based colorimetry (DIC) was applied to the rapid quantitative test for tetracycline (TC) in milk. The data obtained from RGB (Red, Green and Blue) values of each concentration were processed by artificial neural networks (ANN). A linear range and calibration equation of the proposed method for the determination of TC were 1.0–9.0 ppm and $y = 0.0093x–4.6997$ with $r^2 = 0.9917$, respectively. The limit of quantitation was 0.3 ppm. 1.0 M hydrochloric acid and 10-fold dilution of milk sample were used for this work. The developed method was found to be simple, convenient and fast. It was successfully used for TC in cow milk and the results show good agreement with UV-VIS spectrophotometry.

Introduction: Tetracycline antibiotics (TCAs) are an important group of broad-spectrum of active against gram-positive and gram-negative bacteria. Tetracyclines including Tetracycline (TC), Oxytetracycline (OTC) and Chlortetracycline (CTC) have been successfully used as feed additives to increase the growth rate of animals and to prevent or treat mastitis and metritis in cows.[1,2] In Japan, TCAs used more than 60% of all antibiotics.[3] As a result, the residues of tetracyclines in milk owing to the rate of metabolism of TCs in dairy cows has been estimated as 25-75% and a significant percentage of the administrative TCs are excreted in bovine milk. To ensure human food safety, FAO/World Health Organization (WHO), US Food and Drug Administration (FDA), European Union (EU) and Japan (Japanese Food Sanitation Laws) have been established their maximum residue limit (MRL) in milk at 0.1 µg/mL.[4] TCAs residues can cause problems or toxic from food to humans, which caused from transfer of drug-resistant bacteria.[5] The tetracycline antibiotics residues in milk could lead to toxic effects in animals as well as humans. Whereas, the pregnant women who used tetracycline in excessive amounts could result the disabilities to children or permanent yellow teeth.[6]

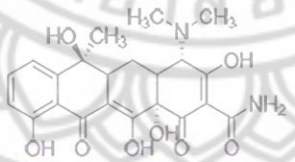


Figure 1. The chemical structure of tetracycline antibiotics

Several analytical methods have been reported for the determination of tetracyclines in milk including spectrophotometry,[7] chromatography,[4] capillary electrophoresis[8] and etc.

In this work, digital image-based colorimetry (DIC) was used for creating the rapid determination of tetracycline in milk. This method was based on the red, green and blue (RGB) values of different color of standard solutions. The RGB value was observed to be decreased with increasing standard concentration whereas the color of the solution increased.[9] Therefore, the application of DIC to detect the TC in milk using its intrinsic color was demonstrated.

Methodology: The optimal solution and the dilution of milk for determination of TC was studied. The main objective of this work is to reduce the use of chemicals for reducing a toxic chemical wastes. So, de-ionized water and hydrochloric acid were used for preparation of standard. Milk sample has to be diluted with hydrochloric acid about 10, 25 and 50-folds

before analysis. Besides, proteins in milk must be removed before the determination of TC. Thus the trichloroacetic acid (TCA) was used for this analysis. Consequently, 5.0 mL of diluted milk sample was added with 1% (v/v) TCA followed by sonicating for 20 min in order to removed proteins in the milk sample. The mixture was centrifuged at 14000 rpm for 20 min then the supernatant was filtered through a 0.45 µm membrane to remove lipids. The standard solution was added into the sample at different concentration (1.0 - 9.0 ppm). The sample solution was then analyzed with UV-VIS spectrophotometer and photographed with digital image-based colorimeter.[9] Finally, the digital image captured was processed with ANN program and the data obtained was used for creating the color calibration sheet of TC.

Results, Discussion and Conclusion: In order to obtain the optimal conditions for the determination of tetracycline in milk, the conditions were studied and the results are summarized below.

The study of solvent for preparation the standard solution: In this work, the de-ionized water and hydrochloric acid were studied for preparation. The tetracycline hydrochloride which has pH below 2.0 was used in this work. It was stable after standing for 40 minutes and its color was not change. The observed characteristics of the solution are shown in Table 1 and the color of solutions are shown in figure 2.

Table 1. The characteristics of the solvent

Characteristics	1.0 M of HCl	de-ionized water
Soluble	slow	Fast
Color of solution	Dark-yellow	light-yellow

Figure 2. The digital images of TC standard solutions at different concentrations (25.0 ppm, 100 ppm and 1000 ppm, respectively), prepared in 1.0 M hydrochloric acid (a) and de-ionized water (b)

Figure 2 shows that 1.0 M hydrochloric acid used for preparation of TC standard provides yellow color darker than that prepared in de-ionized water. Thus hydrochloric acid was used for preparation of the TC standards and milk sample.

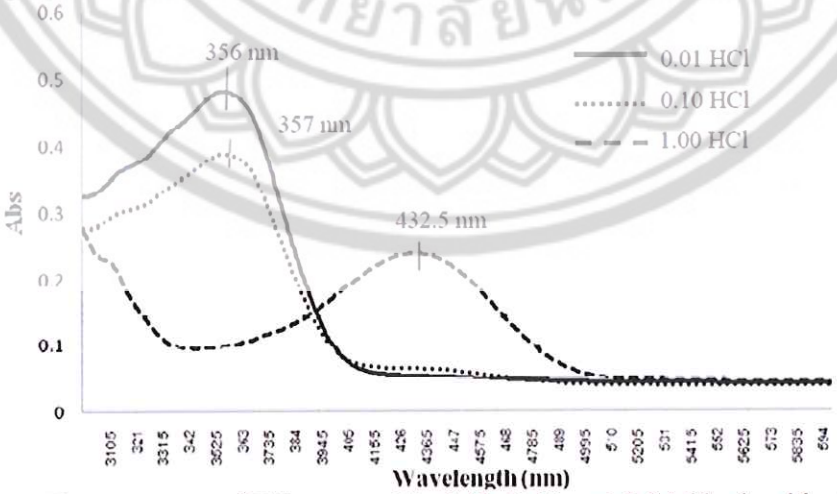


Figure 3. The spectrum of TC prepared in 0.01, 0.10 and 1.0 M hydrochloric acid

Figure 3 shows that 1.0 M HCl gives the maximum absorbance at 432.5 nm which is indigo (420-440 nm) color component. Indigo is a complementary color of yellow and thus a high absorbance of this color was expected given the TC standard solution color was yellow.

Milk sample was then prepared by dilution with 1.0 M HCl to 50-fold, 25-fold and 10-fold. The digital image-based colorimetry (DIC) coupled with artificial neural network (ANN) was used for pictured and processed the digital images and then comparing the results obtained with the UV-VIS spectrophotometry.

The linear calibration curve of TC standard as shown in figure 4 was obtained in the range of 1.0–9.0 ppm by UV-VIS spectrophotometer at the wavelength of 272.5 nm. The standard addition curves as shown in Figure 5 were compared to DIC-ANN.

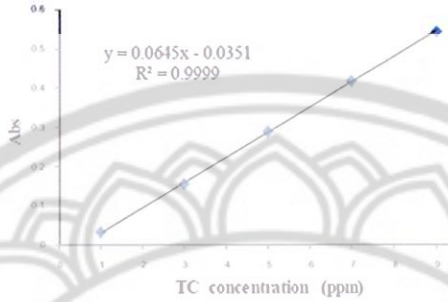


Figure 4. The external calibration curve of tetracycline

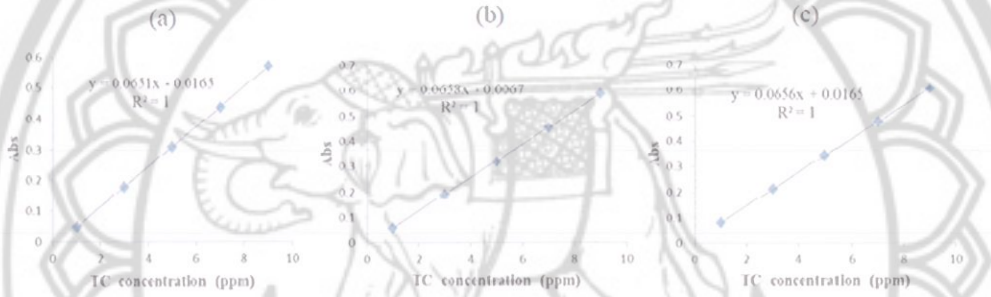


Figure 5. The standard addition curve of TC. Milk sample was diluted to 50-fold (a), 25-fold (b) and 10-fold (c)

The data of RGB ranging from 0 to 255 for each channel (RGB) were obtained from a standard tetracycline and milk sample. The logarithm of total RGB values obtained from DIC-ANN were related to the concentrations of tetracycline standard as shown in Figure 6 (a).

The absorption of total RGB value was investigated by calculating the absorbance at each concentrations using equation 1 which was adapted from Choodum A, Nic Daeid N. (2011)

$$A_{total} = -\log\left(\frac{total\ RGB}{255}\right) \quad (1)$$

The relationship between log [absorbance of total RGB values] of the TC standard solution and the concentration is shown in Figure 6 (b).

Figure 6. Relationship between log [total RGB values] (a) and the absorbance of total RGB (b) of each TC concentrations

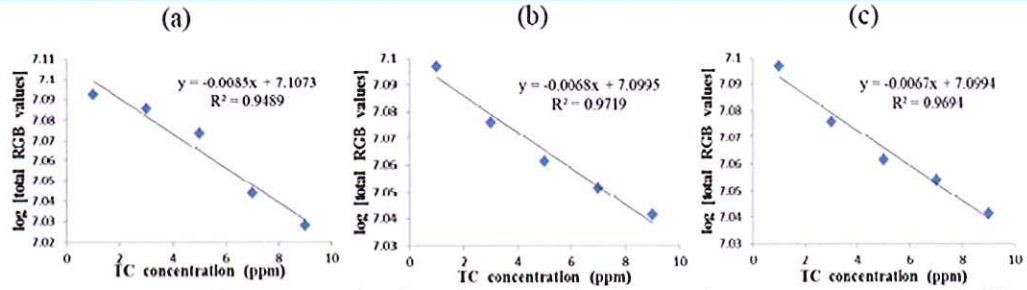


Figure 7. Relationship between log [total RGB values] at each TC concentrations. Milk was diluted at 50-fold (a) , 25-fold (b) and 10-fold (c) spiked with TC standard

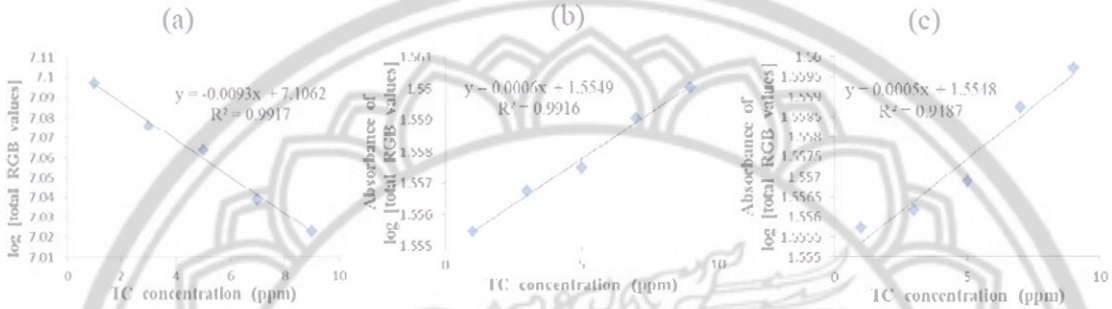


Figure 8. Relationship between the absorbance of log [total RGB values] at each TC concentrations. Milk was diluted at 50-fold (a), 25-fold (b) and 10-fold (c) spiked with TC standard.

The relationship between log [total RGB values] and also absorbance of log [total RGB] with TC concentrations of the external calibration method (Figure 6) show similar results with those obtained by standard addition method at different dilution (Figure 7 and 8).

From figure 7 and 8, milk sample was diluted to 50, 25 and 10-folds given the same color of solution and absorbance values were not different. Therefore, the dilution of milk at 10-fold was selected in this method to reduce acid waste used for sample dilution.

Therefore, the color calibration sheet was built in the range of 1.0-9.0 ppm as shown in Figure 9. It could be used for rapid quantitative test for TC in milk. Consequently, the rapid quantitative test for TC in milk could be created using simple solvent (0.1 M HCl and TCA).

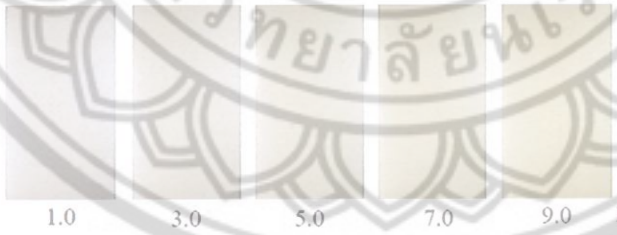


Figure 9. Digital image of TC standard at different concentrations

References:

1. Roberts MC. Antimicrobial resistance 2003;36:462-467.
2. Mesgari AM, Babaei H, Ansarin M, Nourdadgar A, Nemati M. Advanced Pharmaceutical Bulletin 2011;1:34-39.
3. Kishida K. Food Chemistry 2011;126:687-690.
4. Zhao F, Zhang X, Gan Y. Journal of Chromatography A 2004;1055:109-114.
5. de Ruyck H, de Ridder H. Rapid Commun Mass Spectrom 2007;21:1511-1520.
6. Daghrir R, Drogui P. Environ Chem Lett 2011; published online.

7. Divakar TE, Taherunnisa M, Deepthi DK, Manuel CB, Ranjani CB. Rasayan J Chem 2011;4:53-543.
8. Vera-Candioti L, Olivieri AC, Goicoechea HC. Talanta 2010;82:213-221.
9. Bang-iam N, Udnan Y, Masawat P. Microchemical Journal 2013;106:270-275.
10. Choodum A, Daeid NN. Talanta 2011;86:284-292.

Keywords: tetracycline antibiotics (TCAs), milk, digital image-based colorimetry