บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธีคัลเลอริเมตริกซึ่งสามารถใช้ตรวจหาสารกลุ่มควิโนโลนได้ในระดับต่ำ ใช้งานได้ง่าย และมีความเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการศึกษา ดังต่อไปนี้

3.1 ขั้นตอนการศึกษา

3.1.1 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีที่สภาวะเหมาะสม ได้แก่ ตัวทำละลาย, ค่าpH, Complexing agent ที่เหมาะสม เป็นต้น

3.1.2 การตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานของสารกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด, ฟลูมิควิน และ นอร์ฟล็อกซาซิน

3.1.3 การสร้างแถบสีมาตรฐานของสารกลุ่มควิโนโลน

3.1.4 การศึกษาความสามารถในการตรวจวัดควิโนโลนด้วยเทคนิค HPLC

3.1.5 การตรวจสอบชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารสัตว์ ยาสัตว์ สำหรับสัตว์ชนิดต่างๆ ที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน และหาเปอร์เซ็นต์กลับคืน (% recovery) เทียบกับเทคนิค HPLC

3.1.6 ศึกษาสิ่งที่รบกวนที่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (False positive) ต่อชุดตรวจสอบ

3.1.7 การศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ

3.1.8 การศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบอื่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่

- Nalidixic acid (Sigma)
- Norfloxacin (Sigma)
- Flumequine (Sigma)
- Nitric acid 65% (Lab Scan , AR grade)
- Iron(III) nitrate nonahydrate , $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$ (Fluka , AR grade)
- Iron(II) ammonium sulfate 6-hydrate , $Fe(NH_4)_2SO_4$ (J.T. Baker, AR grade)
- Iron(III) chloride anhydrous (Fluka , AR grade)
- *N,N* - Dimethylformamide (Lab Scan , AR grade)
- Acetonitrile (Merck , HPLC grade)
- Ethanol (Merck , HPLC grade)
- Methanol (Merck , HPLC grade)
- n-Hexane (Merck , AR grade)
- Sodium acetate (Carlo Erba , AR grade)
- Acetic acid (Scharlau , AR grade)
- Sulfuric acid (Merck , AR grade)
- Hydrochloric acid (Merck , AR grade)
- Ethylenediamine (Merck , AR grade)
- Ethyl acetate (Lab Scan , HPLC grade)
- Dimethylsulfoxide (Lab Scan , AR grade)
- Milli Q

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.3.1 อุปกรณ์

- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25, 50, 100 มิลลิลิตร
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5, 10, 25, 100 มิลลิลิตร

- หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- กระดาษกรอง (Filter paper) Whatman เบอร์ 1
- กรวยกรอง (Funnel filter)
- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10 มิลลิลิตร
- ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต (Micro pipette) ขนาด 20-200 µl, 100-1000 µl พร้อมทิป
- โกร่งบดยา
- หลอดเหวี่ยง (centrifuge tube) ชนิด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร
- กระจกนาฬิกา (Watch glass dish)
- หลอดหยด (Droper)
- ขวดทดสอบ (Vial)

3.3.2 เครื่องมือวิจัย

- เครื่องชั่งชนิดละเอียด AB204-S ของ Mettler Toledo
- เครื่อง UV-Visible spectrophotometer ของ Varian รุ่น Cary 50 Probe
- เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น IEC : SER 42900961
- เครื่องเขย่า (Shacker) ของ GFL®3015
- เครื่อง HPLC ของ Waters Model M486
- คอลัมน์ Mightysil RP-18 (150 x 4.5 mm , 5 µm)

3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย มีขั้นตอนดังนี้

3.4.1 การเตรียมการทดลอง

3.4.1.1 การเตรียมสารละลาย

3.4.1.1.1 สารละลาย 1% Iron(III) chloride ในน้ำกลั่น

ชั่ง Iron(III) chloride 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.1.1.2 สารละลาย 1% Iron(III) chloride (w/v) ใน 1% กรดไฮโดรคลอริก

ชั่ง Iron(III) chloride 1 กรัม ละลายใน 1% กรดไฮโดรคลอริก 1 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.3 สารละลาย 1% Iron(III) chloride (w/v) ใน 1% กรดไนตริก

ชั่ง Iron(III) Chloride 1 กรัม ละลายใน1% กรดไนตริก 1 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.4 สารละลาย 1% Iron(II) ammonium sulfate 6-hydrate ในน้ำกลั่น

ชั่ง Iron(II) ammonium sulfate 6-hydrate ปริมาณ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.5 สารละลาย 1% Iron(III) nitrate nonahydrateในน้ำกลั่น

ชั่ง Iron(III) nitrate nonahydrate 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.6 สารละลาย 1%Iron(III) nitrate nonahydrate(w/v) ใน1%กรดไฮโดรคลอริก

ชั่ง Iron(III) nitrate nonahydrate 1 กรัม ละลายใน1% กรดไฮโดรคลอริก 1 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.7 สารละลาย 1% Iron(III) nitrate nonahydrate (w/v) ใน1%กรดไนตริก

ชั่ง Iron(III) nitrate nonahydrate ปริมาณ 1 กรัม ละลายใน 1% กรดไนตริก 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.8 สารละลาย 5 % Iron(III) Nitrate nonahydrate (w/v) ใน1%กรดไนตริก

ชั่งIron(III) nitrate nonahydrate 5 กรัม ละลายใน1%กรดไนตริก 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.1.1.9 สารละลาย 10 % Iron(III) nitrate nonahydrate (w/v) ใน1%กรดไนตริก

ชั่ง Iron(III) nitrate nonahydrate ปริมาณ 10 กรัม ละลายใน1%กรดไนตริก 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.10 สารละลาย 15% Iron(III) nitrate nonahydrate (w/v) ใน1%กรดไนตริก

ชั่ง Iron(III) nitrate nonahydrate 15 กรัม ละลายใน1%กรดไนตริก 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.11 Mobile phase สำหรับ HPLC

Phosphate Buffer สามารถเตรียมได้โดยการชั่ง $NaH_2PO_4 x 2H_2O$ 6.9 กรัม ใน Milli Q จากปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และทำการปรับ pH เป็น 2.5 ด้วยกรดฟอสฟอริก

นำMobile phase ที่จะใช้ ได้แก่ Acetonitrile และ Phosphate Buffer 50mM pH 2.5 สำหรับการวิเคราะห์ Milli Q และ Methanol สำหรับการล้างคอลัมน์กรองผ่านพอลิเมอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และไล่อากาศออกภายใต้ระบบสุญญากาศนาน 15 นาทีก่อนใช้

3.4.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานควิโนโลนสำหรับทดสอบการเกิดสีและใช้กับเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

3.4.1.2.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

ชั่งสารควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด (Nalidixic acid , NAL) , นอร์ฟล็อกซาซิน (Norfloxacin , NOR) และฟลูมิควิน(Flumequine, FLU) ชนิดละ 0.025 กรัม นำมาละลายด้วย conc. HNO_3 : น้ำ (1:1) แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วย conc. HNO_3 : น้ำ (1:1) จะได้ความเข้มข้นของควิโนโลนเป็น 1000 ppm เพื่อใช้เตรียม standard solution ต่อไป

3.4.1.2.2 Working standard solution ความเข้มข้น 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 1000 ppm ทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 5, 3, 1, 0.8, 0.5, 0.2 และ 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วย conc. HNO_3 : น้ำ (1:1) จะได้ความเข้มข้นของควิโนโลนเป็น 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm ตามลำดับ

3.4.1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานควิโนโลนสำหรับใช้กับเครื่อง HPLC

3.4.1.3.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

ชั่งสารควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน ชนิดละ 0.025 กรัม นำมาละลายด้วย conc. HNO_3 : น้ำ (1:1) 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Milli Q

3.4.1.3.2 Stock standard solution ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 1000 ppm ชนิดละ 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Milli Q จะได้ความเข้มข้นของควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด เป็น 100 ppm เพื่อใช้เตรียม working standard solution ต่อไป

3.4.1.3.3 Working standard solution ความเข้มข้น 10, 5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 100 ppm ทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิลิตรตามลำดับ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Milli Q จะได้ความเข้มข้นของควิโนโลนเป็น 10, 5 และ 1 ppm ตามลำดับ

3.4.1.3.4 Working standard solution ความเข้มข้น 0.5, 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 10 ppm ทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 0.5, 0.2 และ 0.1 มิลลิลิตรตามลำดับ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Milli Q จะได้ความเข้มข้นของควิโนโลนเป็น 0.5, 0.2 และ 0.1 ppm ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 ศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสีที่สภาวะเหมาะสม

เป็นการศึกษาโดยเลือกใช้ตัวทำละลาย และชนิดของ Complexing agents ที่เหมาะสมในสภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของตัวทำละลาย, ความเข้มข้นของ Complexing agents, ค่า pH , อุณหภูมิ, อัตราส่วนตัวทำละลาย ต่อ Complexing agents เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของนาลิดิซิกแอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควินได้ดีที่สุด ดังการทดลองต่อไปนี้

3.4.2.1 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม

3.4.2.1.1 ศึกษาความสามารถในการละลายของสารในกลุ่มควิโนโลน

ทำการศึกษาโดยการชั่งสารควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน ลงในหลอดทดลอง หลอดทดลองละ 0.1 มิลลิกรัม แล้วจึงทำการเติมตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ น้ำ, Methanol, Ethanol, Dimethylsulfoxide (DMSO), Dimethylformamide (DMF), กรดไนตริก , Ethylacetate, กรดซัลฟิวริก และ กรดอะซิติก ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดทดลองละ 1 ml จากนั้นจึงเขย่าให้เข้ากัน สังเกตการละลาย

3.4.2.1.2 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ Complexing agent ชนิดต่างๆ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเติม Complexing agent ชนิดต่างๆ ลงในสารกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด โดย Complexing agents ที่ใช้มี Iron(III) nitrate nonahydrate, Iron(III) chrolide และ Iron(II) ammonium sulfate 6-hydrate ในตัวทำละลายที่ต่างกัน คือ การละลายในน้ำและในกรด ดังตารางที่ 3.1

การทดสอบทำได้โดยการชั่งควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด 0.1 mg โดยไม่ใช้ตัวทำละลาย จากนั้นจึงทำการเติม Complexing agents ปริมาณ 1 ml แล้วจึงสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น เพื่อเป็นการหาComplexing agent ที่จะใช้ในการทดสอบสำหรับชุดทดสอบต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิด Complexing agent ที่ทำการทดลอง

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

3.4.2.1.3 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ตัวทำละลายที่ได้จาก3.4.2.1.1 ร่วมกับ Complexing agents ที่ได้จาก 3.4.2.1.2

นำสารควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน ลงในหลอดทดลอง หลอดทดลองละ 0.1 mg แล้วเติมตัวทำละลายที่สามารถละลายสารประกอบควิโนโลนที่ได้จากข้อ 3.4.2.1.1 ได้แก่ DMF, กรดไนตริก, กรดซัลฟิวริก และกรดอะซิติก 1 ml จากนั้นเติม Complexing agents ที่ได้จาก 3.4.2.1.2 ในที่นี้คือ Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริก ลงไป 500 ไมโครลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลง

จากนั้นทำการยืนยันผลด้วยการเตรียมสารละลายควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ตัวทำละลายที่ให้การเกิดสีเป็นตัวทำละลาย ในที่นี้คือกรดไนตริก, DMF และกรดซัลฟิวริก นำมาทดสอบปริมาณ 2 มิลลิลิตร เพื่อทำปฏิกิริยากับ Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริก 200 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophoto meter ที่ความยาวคลื่นช่วง 200-800 นาโนเมตร เพื่อเป็นการหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดสำหรับการทำปฏิกิริยาต่อไป

3.4.2.1.4 การศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสม

ทำการเตรียมสารทั้ง 3 ชนิด โดยชั่งนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน 0.025 กรัม แล้วใช้กรดไนตริกที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นตัวทำละลาย (ได้จากข้อ 3.4.2.1.3) คือ อัตราส่วนกรดไนตริก ต่อ น้ำ เท่ากับ 70 : 30, 50 : 50 และ 30:70 ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดเป็น 100 ppm เพื่อทำการศึกษาต่อไป

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยการนำสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 100 ppm ในกรดไนตริกอัตราส่วนต่างๆที่เตรียมได้มา 2 ml จากนั้นเติม complexing agent ในที่นี้ คือ 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริกลงไป 200 µl จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลง และทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

3.4.2.2 การศึกษา Complexing agent ที่เหมาะสม

3.4.2.2.1 ศึกษาการเกิดสีโดยใช้ตัวทำละลายที่ได้จาก3.4.2.1.4 ร่วมกับ Complexing agent ชนิดต่างๆ

การศึกษานี้เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบจากข้อ 3.4.2.1.2 ในเรื่องการเลือก Complexing agent ที่เหมาะสม จึงทำการเลือก Complexing agent ที่เห็นผลของความแตกต่างของสีที่เกิดขึ้น ประกอบด้วย 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไนตริก , 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในน้ำกลั่น , 1% Iron(III) nitrate nonahydrate ในกรดไฮโดรคลอริก , 1% Iron(III) chloride ในกรดไฮโดรคลอริก, 1% Iron(III) chloride ในกรดไนตริก และ1% Iron(III) chloride ในน้ำกลั่น

การทดสอบสามารถทำได้โดยการชั่งสารมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 500, 100, 10 และ 1 ไมโครกรัม แล้วใช้ตัวทำละลายที่ได้จากข้อ 3.4.2.1.4 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติม Complexing agent ลงไป 200 ไมโครลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลง และเลือก complexing agent ที่ให้ผลดีที่สุดเพื่อนำไปศึกษาหาความเข้มข้นของ Complexing agent ที่เหมาะสมต่อไป

3.4.2.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของ Complexing agent ที่เหมาะสม

ทำการเตรียมสารทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ตัวทำละลายที่ได้จากข้อ 3.4.2.1.4 เป็นตัวทำละลาย แล้วนำสารละลายมาตรฐานควิโนโลนที่เตรียมได้มา 2 ml ทำการเติม complexing agent ที่ได้จากข้อ 3.4.2.2.1 ลงไปในปริมาณ 200 µl โดย complexing agent ที่ใช้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 1, 5, 10, 15 และ 20% ตามลำดับ สังเกตการเปลี่ยนแปลง จากนั้นจึงทำการยืนยันผลด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของ complexing agent ที่เหมาะสมต่อไป

3.4.2.3 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวทำละลาย และ Complexing agent

ทำการเตรียมสารทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ตัวทำละลายที่ได้จากข้อ 3.4.2.1.4 เป็นตัวทำละลาย แล้วจึงนำสารละลายมาตรฐานควิโนโลน 100 ppm ที่เตรียมได้มา 2 ml ทำการเติม complexing agent ที่ได้จากข้อ 3.4.2.2.2 ลงไป 2 ml, 1 ml, 500 µl, 200 µl, 100 µl และ 50 µl จะได้อัตราส่วนของตัวทำละลาย ต่อ complexing agent ในอัตราส่วน 1 : 1 , 2 : 1 , 4 : 1 , 10 : 1 , 20 : 1 และ 40 : 1 ตามลำดับ จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลง แล้วนำไปยืนยันผลด้วยการวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200 ถึง 800 นาโนเมตร

3.4.2.4 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานควิโนโลนกับ complexing agent โดยทำการศึกษาผลของค่า pH ต่อชุดทดสอบ ที่ pH เริ่มต้น(ไม่ทำการปรับค่า pH) , pH เท่ากับ 5 , 7 และ 10

การศึกษาทำได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานควิโนโลนที่ความเข้มข้น 100 ppm 2 มิลลิลิตร ทำการปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 5, 7 และ 10 ด้วย 2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นทำการเติม complexing agent ในอัตราส่วนที่เหมาะสม สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น นำไปยืนยันผลการทดลองโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องUV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200 ถึง 800 นาโนเมตร เปรียบเทียบผลการทดสอบกับผลที่ได้ของสารละลายที่ไม่ได้ทำการปรับค่า pH

3.4.2.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการตรวจสอบโดยการใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ตัวทำละลาย และ complexing agent ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นทำการควบคุมอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิห้อง , 40 , 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงโดยทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทุก 15 นาที แล้วยืนยันผลการทดลองด้วยการนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร

3.4.2.6 ศึกษาความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น

เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันผลตามคุณสมบัติที่สำคัญของปฏิกิริยาที่ใช้ในปฏิกิริยาการเกิดสี (colorimetry) ซึ่งปฏิกิริยาควรเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และสีที่เกิดขึ้นจะต้องมีความคงตัวสูงตลอดช่วงที่ทำการวัด จึงทำการศึกษาด้วยการใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ตัวทำละลายและ complexing agent ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง คือ 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที โดยยืนยันผลการทดลองด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200 ถึง 800 นาโนเมตร

3.4.3 การศึกษาความสามารถในการตรวจวัดสารกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธีคัลเลอริเมตริก

ทำการตรวจวัดความเข้มสีของสารละลายมาตรฐานกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด คือ นาลิดิซิกแอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน ที่ความเข้มข้นในช่วงตั้งแต่ 500 ลงมาถึง 10 ppm คือ 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm ว่าจะสามารถมองเห็นได้ต่ำสุดที่ความเข้มข้นระดับใด หลังจากทำการทดสอบด้วยตัวทำละลาย, complexing agent ที่เหมาะสมในอัตราส่วนที่ศึกษามาแล้วในข้างต้น จากนั้นทำการสังเกตสีที่เกิดขึ้น และนำไปยืนยันผลการทดลองด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดที่วัดได้จากสารมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด

เมื่อทำการยืนยันผลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารกลุ่มควิโนโลนทั้ง 3 ชนิด กับ ค่าการดูดกลืนแสง แล้วคำนวณหาค่า Linear regression ของ Calibration curve ที่ได้

3.4.4 การสร้างแถบสีมาตรฐาน

นำผลความเข้มของสีที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานควิโนโลนกับ Complexing agent มาทำการสร้างแถบสีมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 500, 300, 100, 80, 50, 20 และ 10 ppm โดยทำการเทียบสีจากสีที่เกิดขึ้นจริงในรูปของภาพถ่ายจากกล้องดิจิตอล เพื่อใช้แถบสีมาตรฐานเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความเข้มข้นของควิโนโลนในภาคสนาม

3.4.5 ศึกษาการตรวจวัดควิโนโลนด้วยเทคนิค HPLC

เป็นการศึกษาการตรวจวัดสารในกลุ่มควิโนโลน คือ นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควินด้วยเทคนิค HPLC เพื่อใช้ยืนยันวิธีการสกัดอาหารสัตว์ที่จะได้ศึกษาต่อไป การตรวจวัดทำได้ด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐานควิโนโลนที่ความเข้มข้นช่วง 0.1 ถึง 10 ppm คือ 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 และ 10 ppm นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 320 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ Mightysil RP-18 (150 x 4.5 mm , 5 μm) ใช้โมบายล์เฟส Acetonitrile : 50 mM Phosphate Buffer pH 2.5 (35:65) อัตราการไหล 0.6 ml/min และปริมาตรที่ฉีดเข้า HPLC เท่ากับ 20 μl แล้วนำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง Peak area กับ ความเข้มข้นของควิโนโลนเพื่อหาค่า Linear regression จะได้ช่วงการวิเคราะห์สารในกลุ่มควิโนโลน

3.4.6 ตรวจสอบความใช้ได้ (Validate) กับตัวอย่างชนิดต่างๆ

เป็นการทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบ หรือ การใช้ตัวทำละลายและ Complexing agent ที่ได้ทำการศึกษามากับตัวอย่างอาหารสัตว์และยาสำหรับสัตว์ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

3.4.6.1 การศึกษาในอาหารสัตว์

ตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ใช้ในการทดสอบมี 4 ตัวอย่าง ได้แก่ อาหารไก่, อาหารสุกร อาหารกุ้งกุลาดำและอาหารปลา รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 อาหารสัตว์ที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่าง	คุณสมบัติ
อาหารไก่ (เบทาโกร 213)	อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดสำหรับไก่พื้นเมืองอายุ 6 สัปดาห์ขึ้นไป ของบริษัท เบทาโกร อโกร กรุ๊ป จำกัด (มหาชน)
อาหารสุกร (ท็อปฟีด 597)	อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดสำหรับสุกรแม่พันธุ์ ของบริษัท ท็อปฟีด บิลล์ จำกัด
อาหารกุ้งกุลาดำ (นานามิ 4)	เป็นอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้ง 12 – 20 กรัม ของบริษัท ไทยยูเนียน ฟีดมิลล์ จำกัด
อาหารปลา (เซฟฟีด 7912)	อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด สำหรับปลากินพืชขนาดใหญ่ ของบริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)

3.4.6.1.1 การศึกษาการกลับคืน (%Recovery) ของควิโนโลนที่ผสมในอาหารสัตว์

1. ชั่งอาหารสัตว์ชนิดต่างๆที่บดละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างละ 2.00 กรัมลงในบีกเกอร์ (ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ)

2. spike สารควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดลงไปในตัวอย่างชนิดต่างๆชนิดละ 1 มิลลิกรัม

3. เติม Hexane 10 ml ลงไปในบีกเกอร์ ทำการเขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเทสารละลายของ Hexane ทิ้งไป

4. สกัดตัวอย่างซ้ำด้วย Haxane อีก 2 ครั้ง ตามขั้นตอนในข้อ 3 และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนตัวอย่างแห้งสนิท

5. นำบีกเกอร์จากข้อ 4 มาเติมตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ กรดไนตริกอัตราส่วนต่อน้ำ เท่ากับ 50:50 ปริมาณ 10 ml (สารควิโนโลนที่ทำการspike ลงไปในตัวอย่างชนิดต่างๆจะมีความเข้มข้น 100 ppm) นำไปเข้าเครื่องเขย่า เป็นเวลา 5 นาที ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 กรองเฉพาะส่วนใสเก็บไว้

6. นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดมา 1 ml เติม complexing agent ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงเทียบกับแถบสีมาตรฐาน

7. ทำการทดสอบกับอาหารสัตว์ที่ไม่ได้ทำการ spike ควิโนโลนลงไปตามวิธีในข้อ 3 ถึง 6 เพื่อใช้เป็นตัวอย่างสำหรับเปรียบเทียบ (Blank)

3.4.6.1.2 การวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วยตาเปล่าเทียบกับแถบสีมาตรฐาน

เมื่อทำการสกัดอาหารสัตว์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อาหารไก่, อาหารสุกร, อาหารกุ้งกุลาดำและอาหารปลา ตามวิธีจากข้อ 3.4.6.1.1 แล้ว นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดมา 2 มิลลิลิตร ทำการเติม complexing agent ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับแถบสีมาตรฐานของสารมาตรฐานนาลิดิซิก แอซิด , นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน ที่สร้างไว้ในความเข้มข้นช่วง 10 ถึง 500 ppm ว่าสีที่เห็นนั้นสามารถทำการอ่านค่าได้ความเข้มข้นในช่วงใด

3.4.6.1.3 การวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วย UV-Visible Spectroscopy

เพื่อเป็นการศึกษาหาความแม่นยำของการสกัดสารกลุ่มควิโนโลนในตัวอย่างชนิดต่างๆโดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) สามารถทำได้โดยการนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.4.6.1.1 มา 2 มิลลิลิตร เติม complexing agent ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากัน (ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 5 ครั้ง และวิเคราะห์Blankเพื่อเปรียบเทียบ) แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นสูงสุดสำหรับควิโลนทั้ง 3 ชนิด (นาลิดิซิก แอซิด เท่ากับ 430 นาโนเมตร, นอร์ฟล็อกซาซิน เท่ากับ 440 นาโนเมตร และฟลูมิควิน เท่ากับ 470 นาโนเมตร) โดยนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารควิโนโลนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของควิโนโลนและนำค่าที่ได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาค่า % Recovery ตามสมการที่ (1)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(A - B) \times 100}{C} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

เมื่อ A = ความเข้มข้นของควิโนโลนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างหลังการ spike สารมาตรฐาน (µg/ml)

B = ความเข้มข้นของควิโนโลนที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างก่อนการ spike สารมาตรฐาน (µg/ml)

C = ความเข้มข้นของควิโนโลนที่เติมในตัวอย่าง(spike) (µg/ml)

3.4.6.1.4 การวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วย HPLC

เพื่อหาความแม่นยำของการสกัดควิโนโลนในตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค HPLC ทำการวิเคราะห์ได้โดยนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.4.6.1.1 มา 0.5 ml จากตัวอย่างทั้งหมด คือ อาหารไก่ใหญ่ , อาหารสุกร , อาหารกุ้งกุลาดำ และ อาหารปลากินพืช นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำ Milli Q (ความเข้มข้นคิดเป็น 5 ppm) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของควิโนโลนด้วยเทคนิค HPLC ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารควิโนโลนที่ได้จากข้อ 3.4.5 เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของควิโนโลนและนำค่าที่ได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาค่า % Recovery ตามสมการที่ (1) มาเปรียบเทียบกับค่า % Recovery ของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น

3.4.6.2 การศึกษาในยาสำหรับสัตว์

เป็นการนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นไปใช้กับยาสัตว์ชนิดต่างๆที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบันว่าชุดตรวจสอบสามารถตรวจสอบยาควิโนโลนที่ปนเปื้อนอยู่ในยาเหล่านั้นได้หรือไม่ และถ้ามีการปนเปื้อนของสารควิโนโลนในยาเหล่านั้นเป็นปริมาณเท่าใด ยาสัตว์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ดูโอซิน, แคลฟอร์ต, พาวเวอร์วิท-ซี, ซีแมกซ์, ไฮ-ซัลฟา, แอล.พี.เอส, เบต้ามิน และ ทอปเปอร์มิน

การทดสอบทำได้โดยชั่งยาสำหรับสัตว์ชนิดต่างๆ มาชนิดละ 0.1 mg และ เติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำการเติม complexing agent ลงไป 100 ไมโครลิตรสังเกตสีที่เกิดขึ้น

หากพบว่ามีนาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินหรือฟลูมิควินผสมอยู่ สามารถทำการหาปริมาณควิโนโลนที่ผสมอยู่ โดยเตรียมความเข้มข้นของยาชนิดนั้นให้เป็น 100 ppm ด้วยการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวที่เตรียมไว้มา 2 มิลลิลิตร เติม complexing agent ในอัตราส่วนที่ได้ทำการศึกษาไปแล้ว และทำการยืนยันผลด้วยค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิค HPLC ตามสภาวะที่ได้ทำการศึกษาไปแล้ว หากมีสารในกลุ่มควิโนโลน 3 ชนิดนี้เป็นส่วนประกอบจึงนำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณควิโนโลนที่ผสมอยู่ในยาต่อไป

3.4.7 ศึกษาการเกิดผลบวกลวงเมื่อใช้ชุดทดสอบ

เป็นการศึกษาเพื่อหาการรบกวนที่อาจทำให้เกิดความผิดพลาดจากการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น โดยทำการหาผลบวกลวง (False positive) กับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่างๆ , การหาผลบวกลวงกับสาร ปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ , การหาผลบวกลวงกับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

3.4.7.1 การหาผลบวกลวงกับสารตามหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

ชั่งสารตามหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ได้แก่ Alcohol, Phenol, Alkly halide, Aldehyde, Ketone, Carboxylic acid, Ester, R-nitrile และ Carbohydrate มาชนิดละ 0.1 มิลลิกรัม ลงในขวดทดลอง เติมตัวทำละลายที่เหมาะสมตามที่ได้ทำการศึกษามาลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงทำการเติม Complexing agent ลงไปในอัตราส่วนที่ได้ทำการศึกษาไปแล้ว สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นแสดงว่าน้ำยาทดสอบเกิดผลบวกลวงกับหมู่ฟังก์ชันนั้น

3.4.7.2 การหาผลบวกลวงกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

ชั่งสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอลและสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน คือ nitrofurantoin, furaltadone, furazolidone และ nitrofurazone มาชนิดละ 0.1 มิลลิกรัม ลงในขวดทดลอง เติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติม Complexing agent ลงไปในอัตราส่วนที่ได้ทำการศึกษาไปแล้ว สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นแสดงว่า น้ำยาทดสอบเกิด False positive กับสารปฏิชีวนะกลุ่มนั้น

3.4.7.3 การหาผลบวกลวงกับยาสำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลา

ทำการหยดยาที่ใช้สำหรับสัตว์น้ำที่ใช้ในตู้ปลาชนิดต่างๆ ได้แก่ Rot stop, Super Ich, Nalixin, Spot W, มาลาไคท์ กรีน เอฟ และยาฆ่าเชื้อโรคสำหรับสัตว์น้ำชนิดละ 2 หยด ลงในหลอดทดลอง และหยดตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม Complexing agent ลงไปในอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.8 การศึกษาเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบ

การทดสอบเสถียรภาพของน้ำยาทดสอบสามารถทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการหยดน้ำยาทดสอบของสารละลายมาตรฐานควิโนโลนทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ตัวทำละลายเป็นกรดไนตริก (อัตราส่วนต่อน้ำ เท่ากับ 50 : 50) ร่วมกับ 10% Iron(III) nitrate nonahydrate อัตราส่วน 10 : 1 แล้วทำการวัดทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน และวัดเดือนละครั้งเป็นเวลา 6 เดือน โดยทำการเก็บรักษาน้ำยาทดสอบในตู้เย็นเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.4.9 การเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบต่างๆ

เนื่องจากในขณะนี้ประเทศไทยยังไม่มีชุดตรวจสอบสำหรับสารในกลุ่มควิโนโลน ดังนั้นการทดสอบในลักษณะชุดตรวจสอบจึงมีเพียงการทดสอบแบบการทดสอบโดยหมู่ฟังก์ชัน และการทดสอบด้วยวิธีจากตำรับยา ซึ่งมีวิธีการทดสอบ ดังต่อไปนี้

3.4.9.1 การทำปฏิริยาโดยวิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน

เป็นการศึกษาการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้หลักของการทดสอบหมู่ฟังก์ชันที่อยู่ในโครงสร้างหลักของสารกลุ่มควิโนโลน ซึ่งก็คือ หมู่คาร์บอนิล , หมู่คาร์บอกซิลิกและหมู่แอมีน ใช้วิธีทดสอบหมู่ต่างๆ (เผด็จ, 2539) ดังต่อไปนี้

1. การทดสอบสารประกอบหมู่คาร์บอนิล

เป็นการทดสอบหมู่คาร์บอนิลโดยการใช้รีเอเจนต์ 2,4 Dinitrophenylhydra - zine (2,4 – DNP) ทดสอบด้วยการละลายสารตัวอย่างในเอธานอลปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 2,4 Dinitrophenylhydrazine 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที หากได้ตะกอนสีเหลืองแสดงว่าสารตัวอย่างนั้นมีหมู่คาร์บอนิล

2. การทดสอบสารประกอบหมู่คาร์บอกซิลิก

เป็นการทดสอบสารประกอบหมู่คาร์บอกซิลิก ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย $NaHCO_3$ ทำได้โดยใช้สารที่ต้องการทดสอบเท่ากับครึ่งเมล็ดถั่วเขียว แล้วจึงเติมสารละลาย 5% $NaHCO_3$ในปริมาณหลอดละ 1 มิลลิลิตร หากผลทดสอบเป็นบวกจะสังเกตเห็นฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และสารจะละลายไปจนหมด (หากสารตัวอย่างเป็นของแข็งและเบาให้สังเกตฟองแก๊สที่ผิวของแข็งที่ลอยอยู่)

3. การทดสอบสารประกอบแอมีน

การทดสอบสารประกอบแอมีนด้วย Simon / Ramini tests เป็นการช่วยยืนยันว่าสารเป็น 1°, 2° หรือ 3° amine โดยจะช่วยทำให้เลือกทดสอบได้ง่ายขึ้นหากพอจะทราบแล้วว่าสารที่ทดสอบเป็น aliphatic หรือ aromatic amine หากสารเป็น aliphatic amine ให้ใช้ Simon และ Ramini test แต่ถ้าหากเป็น aromatic amine ให้ทดสอบโดยใช้ Modified Simon และ Modified Ramini test

- Ramini test ทำการทดสอบโดยการใส่ sodium nitroprusside reagent A (0.13 M ใน 50% aqueous methanol) ลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ 1 มิลลิลิตร เติม acetone 5 หยด แล้วเติมสารที่ต้องการทดสอบเท่ากับหนึ่งเมล็ดถั่วเขียว (ของแข็ง) หรือ 4 หยด (ของเหลว) เขย่าสารให้เข้ากัน สังเกตผลภายใน 2 นาที

- Simon test ทำการทดสอบโดยการใส่ sodium nitroprusside reagent A (0.13M ใน 50% aqueous methanol) ลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ 1 มิลลิลิตร เติม 2.5 M acetaldehyde ในน้ำลงไป 5 หยด แล้วเติมสารที่ต้องการทดสอบเท่ากับหนึ่งเมล็ดถั่วเขียว (ของแข็ง) หรือ 4 หยด (ของเหลว) เขย่าสารให้เข้ากัน สังเกตผลภายใน 2 นาที

ถ้าเป็น 1° aliphatic amine จะให้สารละลายสีเหลืองอ่อนถึงน้ำตาลแดงกับ Simon test และให้สารละลายสีม่วงกับ Ramini test ถ้าเป็น 2° aliphatic amine จะให้สารละลายสีฟ้าเข้มกับ Simon test และให้สารละลายสีแดงเข้มกับ Ramini test

3.4.9.2 การทดสอบตามวิธีจากตำรับยาของประเทศจีน

การทดสอบในส่วนนี้จะเป็นการทดสอบนาลิดิซิก แอซิดตามตำรับยาของประเทศจีน (Pharmacopoeia of the people's republic of china) สามารถทำการทดสอบได้โดยการชั่งสาร 10 มิลลิกรัม ทำการเติมน้ำ 1 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม Vanillin 10 มิลลิกรัม ต้มเป็นเวลา 2 นาที สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง

จากขั้นตอนและวิธีการดำเนินการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมด สามารถทราบผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษาได้ในบทที่ 4