รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดและอุปกรณ์ปฏิบัติการบนชิพสำหรับตรวจวัดสารตกค้างประเภทยาปฏิชีวนะและโลหะปนเปื้อนในอาหาร

METHOD DEVELOPMENT AND CHIP-BASED DEVICES FOR THE DETERMINATION OF ANTIBIOTIC DRUG RESIDUES AND CONTAMINATED METALS IN FOOD

รศ.ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล
รศ.ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์
รศ.ดร. ธรรมนูญ หนูจักร
รศ.ดร. นงนุช เหมืองสิน
ดร. ลักษณา ลิ่มสวรรค์

ภาควิชา เคมี คณะ วิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552

คณะผู้วิจัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 015073
วัน, เดือน, ปี 11 ม.ย. 53

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาการแยกและวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารซัลโฟนาไมด์ โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบออนไลน์ร่วมกับระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน สำหรับกระบวนการสกัดด้วยเฟสของแข็งนั้น จะมีคอลัมน์ขนาดเล็กซึ่งทำขึ้นเอง ภายในบรรจุด้วยอนุภาคของตัวดูดซับ กระบวนการนี้จะเป็นอัตโนมัติทั้งในการกำจัดสิ่งเจือปนออกจากตัวอย่างและการสกัดซึ่งกระบวนการนี้จะต่อกับระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน โดยที่ระบบนี้จะประกอบไปด้วย ปั๊มสำหรับควบคุมการไหลและวาล์ว วิธีนี้สามารถที่จะทำได้อย่างต่อเนื่องตั้งแต่การสกัดสารซัลโฟนาไมด์จากตัวอย่างที่เป็นของเหลวไปจนถึงการแยกสารที่เราสนใจ โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบออนไลน์ ได้แก่ ศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารที่ใช้เป็นตัวชะ, อัตราการไหลของสารในขั้นตอนการผ่านสารตัวอย่างและการชะสารตัวอย่าง และโซนของสารที่ถูกชะออกมา จากการศึกษาพบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมของสารที่ใช้ชะคือ เมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหลของสารในขั้นตอนการผ่านสารตัวอย่างและการชะสารตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 10 ไมโครลิตรต่อวินาที และโซนของสารที่ถูกชะที่เหมาะสมคือ 20-24 วินาที ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีกกับความเข้มข้นของสารซัลโฟนาไมด์เป็นเส้นตรงในช่วง 0.01-8 พีพีเอ็ม จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความไวสูงสำหรับการแยกและวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารซัลโฟนาไมด์

Abstract

In this work, the use of on-line solid phase extraction (SPE) coupled with sequential injection analysis for the separation and determination of sulfonamides has been developed. A homemade microcolumn SPE system coupled with sequential injection analysis (SIA) was automated to perform sample clean-up and extraction. A SIA consisting of a syringe pump and multi-position valve was constructed. The method can continuously extract sulfonamides from aqueous samples, followed by separation using HPLC coupled with electrochemical detection. The conditions for on-line SPE, including eluent, flow rate of sample loading and elution and zone of eluate were investigated. An eluent composition of 100% methanol was selected. The optimal flow rate of sample loading and elution was found to be 10 μL/s and optimal elution time was 20-24 s. Under optimal conditions, a linear relationship between peak height and sulfonamide concentration was obtained in the range of 0.01 - 8 ppm. The results show that this method is simple, rapid and highly sensitive for the determination of sulfonamides.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์	ซ
บทนำ	
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้	4
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	
2.1 การสกัดด้วยเฟสของแข็ง	5
2.1.1 ข้อดีของการสกัดด้วยเฟสของแข็ง	6
2.1.2 ขั้นตอนการใช้การสกัดด้วยเฟสของแข็ง	6
2.1.3 วิธีเลือกวัสดุดูดซับ	6
2.2 ระบบซีเคว็นเชียลอินเจ็กชัน	6
2.3 เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี	7
2.3.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์	7
2.3.2 องค์ประกอบของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี	9
2.4 เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า	11
2.4.1 แอมเพอโรเมตรี	11

หน้า

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 13

3.2 สารเคมี 13

3.3 วิธีการทดลอง 14

3.3.1 บรรจุเฟสของแข็งชนิด Oasis HLB 14

3.3.2 การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ 15

3.3.3 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบไม่อัตโนมัติ ในการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน 16

3.3.4 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ ในการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันร่วมกับ เทคนิคแอมเพอโรเมตรี 16

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบไม่อัตโนมัติ ในการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน 18

4.1.1 ศึกษาอัตราเร็วในการชะเฟสของแข็งที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ 18

4.1.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่ 19

4.1.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ 20

4.2 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ ในการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันร่วมกับ เทคนิคแอมเพอโรเมตรี 21

4.2.1 ศึกษาอัตราเร็วในการชะเฟสของแข็งที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ 21

4.2.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่ 22

4.2.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ 23

4.3 ค่าความเป็นเส้นตรง และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ 24

สรุปผลการวิจัย 25

บรรณานุกรม 26

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

4.1 แสดงค่าความเป็นเส้นตรง, ขีดจำกัดต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ และขีดจำกัดต่ำสุดที่วัดปริมาณได้ 24

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของอนุภาคของแข็งที่บรรจุในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง	5
2.2	ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน	7
2.3	โวลเทจโมแกรมของแอมเพอโรเมตรี	12
3.1	อนุภาคของแข็งชนิด Oasis HLB จากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง	14
3.2	อนุภาคของแข็งชนิด Oasis HLB ที่บรรจุในท่อ	14
3.3	ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน	15
3.4	การสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ โดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันร่วมกับเทคนิคแอมเพอโรเมตรี	15
4.1	โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของการชะสารจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง	18
4.2	โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่และสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ถูกชะด้วยเมทานอล	19
4.3	โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเก็บสารจากการชะ	20
4.4	โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของการชะสารจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง	21
4.5	โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ เมทานอลต่อเฟสเคลื่อนที่ (a) 100:0, (b) 90:10, (c) 80:20, (d) 70:30, (e) 60:40, (f) 50:50	22
4.6	โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเก็บสารจากการชะ (a) 20-24 วินาที, (b) 25-29 วินาที, (c) 30-34 วินาที	23

คำอธิบายสัญลักษณ์

C	:	ความเข้มข้น (concentration)
K_x	:	ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient) ของสาร X
$[X_s]$	:	ความเข้มข้นของสาร X ในเฟสอยู่กับที่
$[X_m]$	:	ความเข้มข้นของสาร X ในเฟสเคลื่อนที่
k'	:	ค่าความสามารถในการสะสมสารที่จะวิเคราะห์ในคอลัมน์ (capacity factor)
V_s	:	ปริมาตรของเฟสคงที่ในคอลัมน์
V_m	:	ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ในคอลัมน์
t_r	:	เวลาของสาร (retention time)
t_o	:	เวลาของตัวทำละลายที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ (void time)

บทนำ

1.1 บทนำ

การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high-performance liquid chromatography) สารตัวอย่างที่สามารถนำมาฉีดเข้าสู่ระบบไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีต้องอยู่ในภาวะที่เหมาะสมคือ เป็นสารละลายใส ไม่มีสิ่งเจือปน และให้ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ ซึ่งการทำให้สารตัวอย่างอยู่ในภาวะเหมาะสมต้องเริ่มต้นจากการเตรียมสารตัวอย่างที่มีคุณภาพก่อนการฉีดเข้าสู่ระบบ ในปัจจุบันนี้มีวิธีมากมายในการเตรียมสารตัวอย่าง เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การกรอง การทำปฏิกิริยา การตกตะกอนและการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction: SPE) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะและความเหมาะสมกับตัวอย่างต่าง ๆ กัน วิธีที่พบบ่อยเป็นวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ปัญหาที่พบในวิธีนี้คือการเกิดอิมัลชันของตัวอย่าง ทำให้ผลที่ได้ไม่ถูกต้องเมื่อทำปริมาณวิเคราะห์

การสกัดด้วยเฟสของแข็งได้รับความนิยมในการเตรียมตัวอย่างสำหรับเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่ใช้หลักการกระจายตัว (Partition) เหมือนกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ต่างกันที่ใช้ของแข็งเป็นตัวจับสารที่เราสนใจ โดยของแข็งจะถูกบรรจุอยู่ในพอลิเมอร์ เรียกว่า การสกัดด้วยเฟสของแข็ง หรือ Sep-Pak ข้อดีของการใช้การสกัดด้วยเฟสของแข็งในการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีได้แก่ ประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากใช้สารละลายและอุปกรณ์น้อย ให้ค่าการกลับคืนสูง เพราะมีการถ่ายเทสารน้อยครั้ง ประหยัดเวลา เพราะมีขั้นตอนการเตรียมน้อย มีความปลอดภัยสูง ไม่เกิดปฏิกิริยารุนแรง ไม่ทำให้เกิดปัญหาอิมัลชันและสารที่สกัดได้ไม่เปลี่ยนภาวะสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ทันที

การใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน (sequential injection analysis; SIA) ร่วมกับการสกัดด้วยเฟสของแข็งมีข้อดีหลายประการคือ ระบบการทำงานแบบอัตโนมัติ ลดระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างและใช้ปริมาณตัวอย่างรวมถึงตัวทำละลายน้อย

ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันจะเป็นการไหลของกระแสในสองทิศทางที่ไม่ต่อเนื่องกัน (bi-direction discontinuous flow) การใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันช่วยให้การปฏิบัติงานง่ายขึ้น เพราะทำงานเป็นระบบอัตโนมัติควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ จึงเหมาะสำหรับการขนถ่ายตัวอย่างที่ต้องทำหลายขั้นตอนข้อดีของวิธีระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน คือ มีความแม่นยำ ทำงานได้สะดวกรวดเร็วและลดค่าใช้จ่าย ไม่ต้องใช้แรงงานในการเตรียมตัวอย่าง ประหยัดการใช้สารเคมีและเครื่องมือมีขนาดเล็ก ทำให้มีการใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันแพร่หลายมากขึ้น

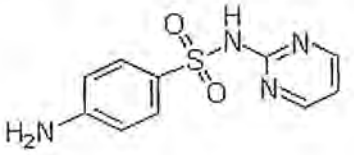
ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) เป็นสารต้านจุลชีพที่ตกค้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่มาจากสัตว์ สารชนิดนี้นิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะโดยเฉพาะจากเชื้ออีโคไล รักษาอาการท้องร่วงในหมู วัวและม้า รักษาอาการติดเชื้อในกุ้งและไก่ นอกจากนี้ซัลโฟนาไมด์ยังนำมาผลิตเป็นยารักษามนุษย์ โดยใช้รักษาอาการอักเสบ โรคริดสีดวงตา กามโรค รวมทั้งใช้ระงับเชื้อในทางเดินอาหาร [1] แต่อย่างไรก็ตาม ซัลโฟนาไมด์เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งและเป็นอันตรายต่อไตของมนุษย์ ดังนั้นสหภาพยุโรป (European Union, EU) ได้กำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (maximum residue limits) ของซัลโฟนาไมด์ไว้ที่ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ของอาหารที่ได้มาจากสัตว์ เช่น เนื้อ นม และไข่ [2] จากอันตรายที่พบจากการใช้สารซัลโฟนาไมด์ทำให้ทั้งภาครัฐและเอกชนให้ความสนใจในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลโฟนาไมด์ที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยมีมาตรการในการควบคุมคุณภาพสินค้าทั้งภายในประเทศ และต่างประเทศเพื่อคุ้มครองสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค มีวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารซัลโฟนามายด์หลายวิธี ได้แก่ เทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรสโกปี ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรีและเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์สารซัลโฟนาไมด์ส่วนใหญ่ คือ เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เสนอวิธีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติในการตรวจวัดสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด (sulfadiazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline, sulfaguanidine and sulfamonomethoxine) โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า โดยใช้ขั้วไฟฟ้าโบรอนโดปไดมอนด์

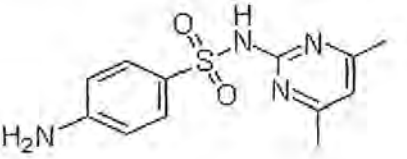
ซัลโฟนาไมด์ : สูตรโครงสร้างหลักประกอบด้วย ซัลโฟนิล ($R\text{-}SO_2\text{-}R$) และหมู่อะมิโน (NH_2) เชื่อมกับวงเบนซีน

สูตรโครงสร้างซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่นิยมใช้ในสัตว์มีดังนี้

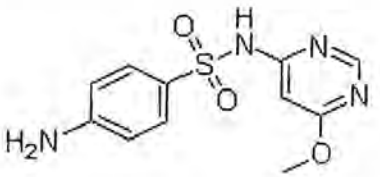
ซัลฟาไดอาซีน (sulfadiazine, SDZ)



ซัลฟาเมธาซีน (sulfamethazine, SMZ)

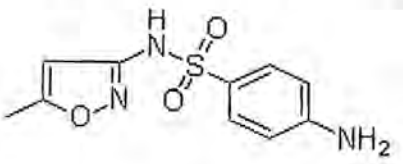


ซัลฟาเมโธซาโซล (sulfamethoxazole, SMX)

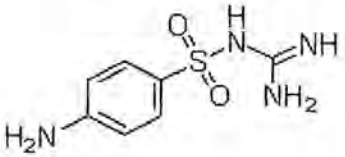


ซัลฟาโมโนเมททอกซีน

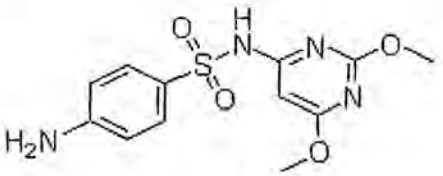
(sulfamonomethoxine, SMM)



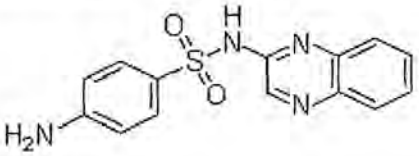
ซัลฟากัวนิดีน (sulfaguanidine, SG)



ซัลฟาไดเมธาโธซีน sulfadimethoxine (SDM)



ซัลฟาควิโนซาลีน (sulfaquinoxaline, SQ)



สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารซัลโฟนาไมด์โดยส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี [3,4] งานวิจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ Kishida และคณะ [5] ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของซัลโฟนาไมด์ในเนื้อไก่โดยใช้วิธีสกัดแบบแมทริกซ์โซลิดเฟสดิสเพอชัน (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD) ใช้คอลัมน์ C_{18} และตัวตรวจวัดเป็นโฟโตไดโอดอาเรย์ (photodiode array detector) ใช้เวลาในการตรวจวัด 1.5 ชั่วโมง Fuh และคณะ [6] ทำการหาปริมาณซัลโฟนาไมด์ 8 ชนิดในเนื้อสัตว์ โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งร่วมกับเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส พบว่าขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ในช่วง 5-10 ไมโครกรัมต่อกรัมและตัวตรวจวัดเป็นโฟโตไดโอดอาเรย์ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์นี้ให้ความไวในการตรวจวัดได้ดี แต่ใช้ระยะเวลาแยกสารถึง 17 นาที Cubarsi และคณะ [2] ทำการเปรียบเทียบคอลัมน์ C_{12} กับ C_{18} เพื่อศึกษาความเหมาะสมสำหรับการแยกซัลโฟนาไมด์ 3 ชนิด (SDZ, SMR, SMZ) ผลที่ได้พบว่าคอลัมน์ C_{12} เหมาะสมสำหรับการแยกซัลโฟนาไมด์ทั้ง 3 ชนิด ภายหลังมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยนำเทคนิคโครมาโทกราฟีมาใช้ร่วมกับเทคนิคอื่น ได้แก่ เทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี [7,8] ซึ่งมีผลทำให้ขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดได้มีค่าต่ำมาก เนื่องจากเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีมีความไวในการตรวจวัดสูง งานวิจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ Li และคณะ [9] วิเคราะห์หาสารตกค้างซัลโฟนาไมด์ในเนื้อกุ้ง พบว่าขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ที่ 20 นาโนกรัมต่อกรัม ต่อมามี

การนำเทคนิคทางเคมีไฟฟ้ามาใช้ตรวจวัดหาซัลโฟนาไมด์ เช่น Preechaworapun และคณะ [1] วิเคราะห์หาซัลโฟนาไมด์ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีใช้ขั้วไฟฟ้าโบรอนโดปไดมอนด์ โดยใช้คอลัมน์ C_4 วิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด (SDZ, SMM, SMZ, SDM) ซึ่งใช้เวลาในการตรวจวัดถึง 18 นาที และนอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นที่สามารถตรวจวัดซัลโฟนาไมด์ เช่น Wang และคณะ [10] ตรวจหาซัลโฟนาไมด์ในเนื้อไก่และไข่ ด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟีโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจวัดซัลโฟนาไมด์ได้ภายในเวลา 15 นาที จากข้อมูลงานวิจัยที่สืบค้นมาพบว่า วิธีการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์ด้วยเทคนิคที่กล่าวมาล้วนแล้วแต่ใช้ระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์นาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาระบบการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติโดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน พร้อมทั้งทำการตรวจวัดสารซัลโฟนาไมด์ โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอโรเมตรี เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องและสามารถวิเคราะห์หาสารในปริมาณต่ำได้

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. พัฒนาระบบการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติโดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน พร้อมทั้งทำการตรวจวัดสารซัลโฟนาไมด์ 7 ชนิด โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอโรเมตรี เพื่อได้วิธีการวิเคราะห์สารที่รวดเร็ว ถูกต้องและสามารถวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำ

2. ประยุกต์เทคนิคที่พัฒนาแล้วสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารซัลโฟนาไมด์ที่ตกค้างในอาหาร

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างจากการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติโดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันและวิเคราะห์สารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด ที่ตกค้างในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรีซึ่งใช้ขั้วไฟฟ้าโบรอนโดปไดมอนด์เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน

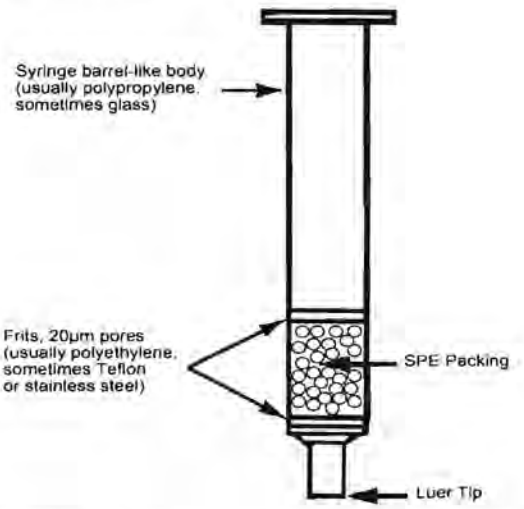
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้

ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยง แม่นยำ และรวดเร็วในการเตรียมตัวอย่างพร้อมทั้งตรวจวัดสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด ที่ตกค้างในอาหารประเภทเนื้อสัตว์

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 การสกัดด้วยเฟสของแข็ง

การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากสิ่งสกปรกในตัวอย่างสามารถทำให้คอลัมน์และระบบอุดตันได้ ถ้าคอลัมน์ของระบบแก๊สโครมาโทกราฟีอุดตัน เราสามารถล้างด้วยตัวทำละลายแล้วทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์นั้นกลับดีขึ้นได้ ส่วนคอลัมน์ของระบบไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีนั้นทำได้ยากกว่า จึงต้องมีการป้องกันไม่ให้สิ่งสกปรกเข้าไปสะสมในระบบหรือคอลัมน์ได้ ซึ่งทำโดยการเตรียมตัวอย่างที่ดีและถูกต้อง การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลามากประมาณได้เป็น 60-80 เปอร์เซ็นต์ของเวลาทั้งหมดที่นักเคมีใช้ไปกับการวิเคราะห์ นอกเหนือจากเวลาที่ต้องเสียไปแล้วเรายังสูญเสียตัวทำละลายไปอีกด้วย จากการประเมินทั่วไปพบว่าเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างที่ใช้กันมากที่สุด คือ การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-Liquid Extraction) แต่มีข้อเสียตรงที่อาจเกิดอิมัลชันกรณีใช้กับตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อและต้องใช้เครื่องแก้วมากมาย ทำให้เป็นการเพิ่มสิ่งสกปรกต่าง ๆ ที่จะมารบกวนการวิเคราะห์ให้มากขึ้น ทำให้ผลการวิเคราะห์อาจไม่ถูกต้อง ส่วนตัวทำละลายที่ใช้กับเทคนิคนี้มีราคาแพงและใช้ในปริมาณมาก ดังนั้นเราควรลดปริมาณการใช้ลง และควรคำนึงถึงการทิ้งตัวทำละลายเหล่านั้นหลังจากการใช้งานว่าจะมีผลต่อสิ่งแวดล้อมอย่างไรด้วย การสกัดด้วยเฟสของแข็งเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้แทนการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวได้โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก วิธีของการสกัดด้วยเฟสของแข็งมีหลักการคล้ายกับการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวคือ ใช้หลักการกระจายตัวเหมือนกัน แต่การกระจายตัวไม่ได้เกิดระหว่างของเหลวกับของเหลวเหมือนกับของการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวแต่จะเกิดระหว่างของแข็งกับของเหลวหรือตัวทำละลาย



รูปที่ 2.1 ลักษณะของอนุภาคของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์ SPE

2.1.1 **ข้อดีของการสกัดด้วยเฟสของแข็ง**

1. ลดปริมาณตัวทำละลายที่จำเป็นต้องใช้ลง
2. ประหยัดเวลา
3. ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้น้อยลงหรือเหลือขั้นตอนเดียว
4. สามารถใช้กับระบบการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้
5. เลือกใช้ได้กับตัวทำละลายหลายชนิด

ดังนั้น จะเห็นว่าการสกัดด้วยเฟสของแข็งเป็นเทคนิคที่ปัจจุบันนิยมใช้กันมากที่สุดในการเตรียมตัวอย่าง การสกัดด้วยเฟสของแข็งไม่เพียงแต่ทำความสะอาดตัวอย่างขจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ออกเท่านั้น แต่ยังเป็นการช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ด้วย

2.1.2 **ขั้นตอนการใช้การสกัดด้วยเฟสของแข็ง** มี 4 ขั้นตอนตามลำดับดังนี้

1. การปรับภาวะ (Condition) เป็นการเตรียมวัสดุดูดซับ (sorbent) ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ SPE ให้พร้อมรองรับตัวอย่าง
2. การใส่สาร (Load) เป็นการใส่สารตัวอย่างลงไปเพื่อให้จับกับวัสดุดูดซับ
3. การชะล้าง (Rinse) เป็นการขจัดเอาสารรบกวนที่ไม่ต้องการที่จับกับวัสดุดูดซับออก
4. การดึงออก (Elution) เป็นการดึงเอาสารที่เราสนใจที่เกาะกับวัสดุดูดซับออก เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

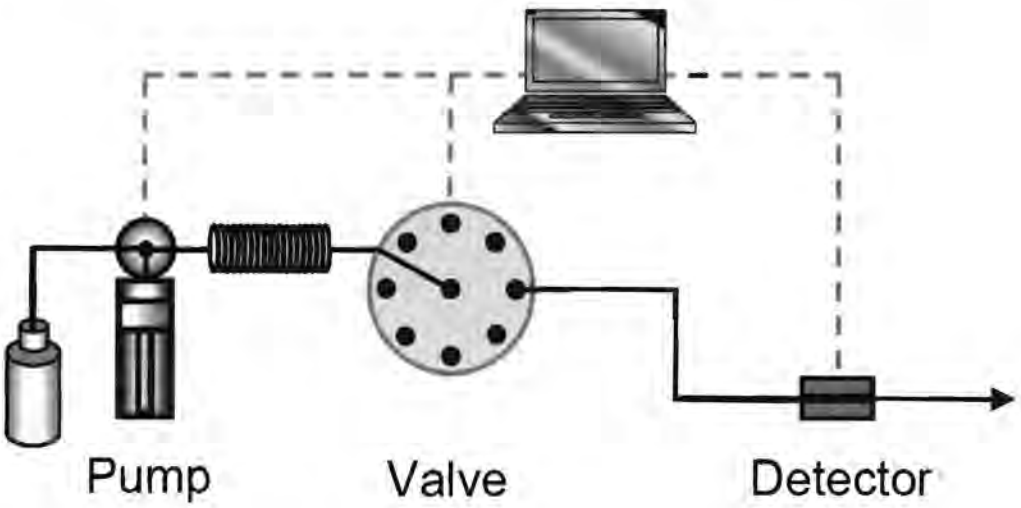
2.1.3 **วิธีเลือกวัสดุดูดซับ**

หลักการเลือกวัสดุดูดซับต้องพิจารณาจากสารที่วิเคราะห์ว่าเป็นสารที่ละลายน้ำหรือไม่ละลายน้ำ โดยเลือกวัสดุดูดซับที่มีความมีขั้วตรงกับสารที่วิเคราะห์ ตัวอย่างเช่น ถ้ามีสารที่ละลายได้ดีในน้ำเป็นพวกที่มีประจุคือสามารถแตกตัวที่ค่าความเป็นกรดเบส (pH) ค่าใดค่าหนึ่ง ตัวอย่างนี้จะใช้วัสดุดูดซับเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger) โดยใช้ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบสำหรับสารที่มีประจุลบและตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกสำหรับสารที่มีประจุบวก

2.2 ระบบซีเควันเชียลอินเจ็กชัน

ระบบซีเควันเชียลอินเจ็กชันเป็นวิธีการใหม่ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือสำหรับขนถ่ายตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างขั้นต้นก่อนการวิเคราะห์แบบออนไลน์ (Economou 2005) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับกระแสไหล โดยระบบซีเควันเชียลอินเจ็กชันจะมีลักษณะเด่นที่พัฒนาเพิ่มเติมมาจากระบบโฟลอินเจ็กชัน เพื่อปรับปรุงระบบให้ดีขึ้นและสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น กล่าวคือ ระบบซีเควันเชียลอินเจ็กชันจะเป็นการไหลของกระแสในสองทิศทางที่ไม่ต่อเนื่องกัน การใช้ระบบซีเควันเชียลอินเจ็กชันช่วยให้การปฏิบัติงานง่ายขึ้น เพราะทำงานเป็นระบบอัตโนมัติ

ควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ จึงเหมาะสำหรับการขนถ่ายตัวอย่างที่ต้องทำหลายขั้นตอน (Katarina, Lenghor และ Motomizu 2007) ข้อดีของระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันคือ มีความแม่นยำ เครื่องมือมีขนาดเล็ก ทำงานได้สะดวกรวดเร็วและลดค่าใช้จ่าย ประหยัดการใช้สารเคมี ไม่ต้องใช้แรงงานในการเตรียมตัวอย่างเหมาะสมกับการใช้แยกสาร และการทำให้สารละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้น อีกทั้งยังสามารถกำหนดการทำงานของตัวอย่างได้มากขึ้น



รูปที่ 2.2 ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน

2.3 ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบในเฟสอยู่กับที่ของคอลัมน์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัดจะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่องสามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยากหรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง

2.3.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีสามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดเช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ คู่อิแนนทิโอเมอร์ สารประกอบที่เสียสภาพได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลวต้องละลายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ผ่านการกรอง) การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมีเฟสคงที่เป็นตัวพาไป

สารสามารถแยกออกจากกันได้เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient) ที่ต่างกัน เช่น สารประกอบ X มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่เมื่อผ่านไปตามคอลัมน์ ดังสมการ

$$X_m \rightleftharpoons X_s$$

X_m ในเฟสเคลื่อนที่ X_s ในเฟสอยู่กับที่

$$K_x = [X_s]/[X_m]$$

K_x = ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของสาร X

$[X_s]$ = ความเข้มข้นของสาร X ในเฟสอยู่กับที่

$[X_m]$ = ความเข้มข้นของสาร X ในเฟสเคลื่อนที่

จากนิยามของค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย(K_x) คือ การวัดลำดับของสาร X ที่จะยึดหรือทำให้เคลื่อนที่ได้ช้าลง ในทางปฏิบัติแล้วค่าความสามารถในการสะสมสารที่จะวิเคราะห์ในคอลัมน์ (capacity factor: k') จะเป็นค่าที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้มากกว่าและสามารถที่จะหาได้โดยตรงจากโครมาโทแกรม ซึ่งสมการของค่าความสามารถในการสะสมสารที่จะวิเคราะห์ในคอลัมน์ เป็นดังนี้

$$k' = \frac{\text{จำนวนโมลทั้งหมดของสาร X ในเฟสอยู่กับที่}}{\text{จำนวนโมลทั้งหมดของสาร X ในเฟสเคลื่อนที่}}$$

$$k' = \frac{V_s[X]_s}{V_m[X]_m} = \frac{V_s K_x}{V_m}$$

เมื่อ V_s = ปริมาตรของเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์

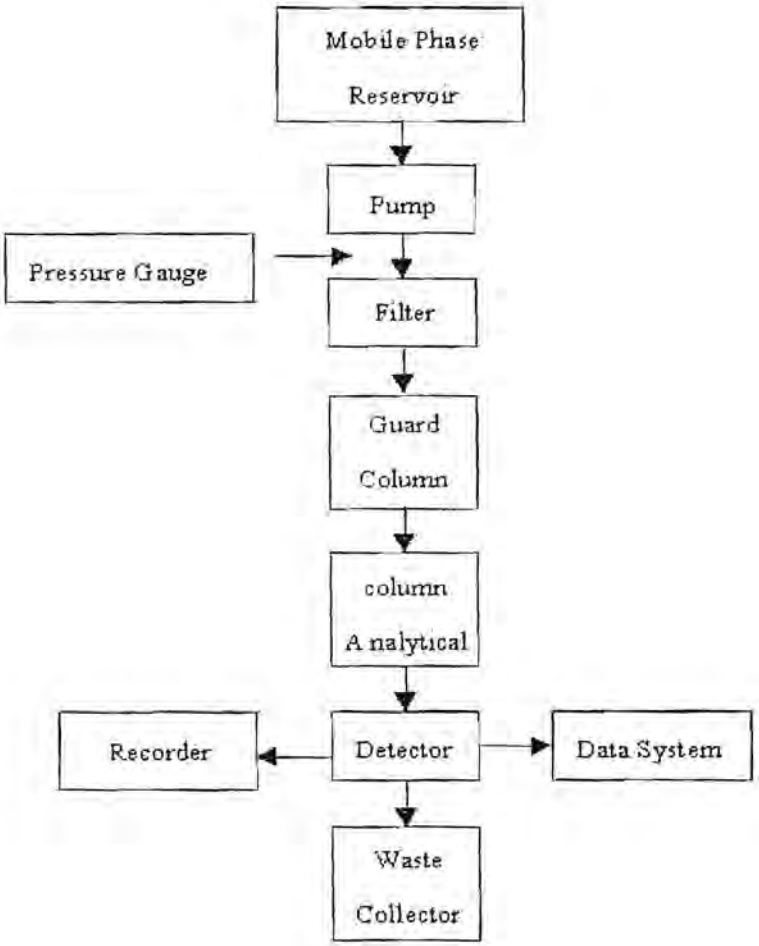
V_m = ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ในคอลัมน์

และ $$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

t_r = เวลาของสาร (retention time)

t_o = เวลาของตัวทำละลายที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ (void time)

2.3.2 องค์ประกอบของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี



<u>ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่</u> (Mobile Phase reservoir)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีความจุประมาณ 1 ลิตร มีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ จุดประสงค์ของการไล่อากาศ คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจน ซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้และมีผลต่อค่าเวลาของสารด้วย

<u>ระบบของปั๊ม</u> (Pumping System)

ในคอลัมน์มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่เนื่องจากภายในคอลัมน์มีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลที่ว่านี้จะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหล

ปั๊มแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

1. ปั๊มแมคคานิคอล (mechanical pump) เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

ปั๊มประเภทนี้แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

(1) ปั๊มชนิดไซริงค์ (syringe pump) ปั๊มชนิดนี้มีลักษณะเป็นกระบอกสูบ (cylinder) ซึ่งบรรจุตัวทำละลายไว้แล้ว มีก้านสูบ (plunger) ซึ่งจะเคลื่อนที่เป็นแบบสกูล (screw) ผ่านกล่องเกียร์ (gear box) โดยมีมอเตอร์ (stepping motor) เป็นตัวควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่โดยจะไปทำให้ก้านสูบเคลื่อนที่เร็วหรือช้าลง

(2) ปั๊มชนิดกระบอกสูบ (reciprocating pumps) ปั๊มชนิดนี้นิยมใช้กันมาก ก้านสูบของปั๊มเคลื่อนที่เข้าออกตลอดเวลาการทำงาน เมื่อลูกสูบเคลื่อนที่เข้าจะเป็นการดันเฟสเคลื่อนที่ให้เข้าสู่คอลัมน์ และเมื่อเคลื่อนออกจะดึงเอาเฟสเคลื่อนที่จากภาชนะ (reservoir) เข้าสู่ลูกสูบผ่านวาล์ว (check valve) การควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กระทำได้โดยปรับอัตราเร็วของการชักลูกสูบผ่านมอเตอร์

2. ปั๊มนิวเมติก (pneumatic pump) เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

<u>การ์ดคอลัมน์</u> (Guard column)

เป็นคอลัมน์ที่ทำหน้าที่ดักสารที่ไม่ต้องการหรืออนุภาคเล็ก ๆ เช่น ฝุ่น หรือสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในเฟสเคลื่อนที่และสารตัวอย่างออก เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์

คอลัมน์

คอลัมน์แบบเดิมที่ใช้เป็นแบบแพค (packed column) แบ่งตามกลไกการแยก

1. กระบวนการดูดซับ อาศัยหลักการเกิดอันตรกิริยาที่แตกต่างกันระหว่างตัวถูกละลายกับตำแหน่งว่องไวบนผิวของวัสดุดูดซับที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่
2. การกระจายตัว อาศัยหลักการที่ตัวถูกละลายมีการกระจายตัวระหว่างเฟสทั้งสอง ที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เฟสทั้งสองจะต้องเลือกจากการของเหลวที่มีค่าความมีขั้วต่างกันมาก ๆ

- เฟสอยู่กับที่ ที่มีขั้วและใช้เฟสเคลื่อนที่ ที่ไม่มีขั้ว เรียกว่า นอร์มอล (Normal phase)
- เฟสอยู่กับที่ ที่ไม่มีขั้ว และใช้เฟสเคลื่อนที่ ที่มีขั้วเรียกว่า รีเวิร์สเฟส (Reverse phase)

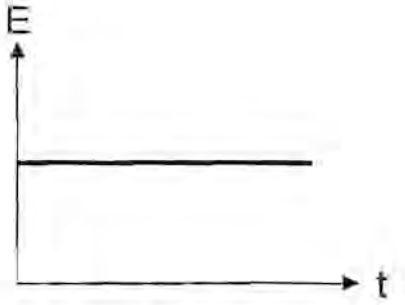
3. การแลกเปลี่ยนประจุ อาศัยหลักการเกิดอันตรกิริยาของประจุของตัวถูกละลายกับประจุที่มีประจุตรงกันข้ามซึ่งอยู่บนพื้นผิวของเฟสอยู่กับที่
4. การแยกสารตามขนาด อาศัยหลักการที่ตัวทำละลายจะถูกเลือกให้แพร่ผ่านรูพรุนของอนุภาคในคอลัมน์โดยตัวทำละลายขนาดเล็กจะสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในรูพรุนได้จะถูกยึดในคอลัมน์ได้นานกว่าขนาดใหญ่

ปัจจุบันคอลัมน์ของไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีมีการพัฒนามากขึ้น คอลัมน์มอนอลิต (monolithic column) เป็นคอลัมน์อีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากคอลัมน์มอนอลิตถูกออกแบบให้มีโครงสร้างเป็นระบบเครือข่ายมีรูพรุนสูง จึงมีประสิทธิภาพสูงกว่าแพคคอลัมน์แบบดั้งเดิม [5] ข้อดีของคอลัมน์มอนอลิต คือ สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้เร็วขึ้น โดยสามารถปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้ตั้งแต่ 1-9 มิลลิลิตรต่อนาที ช่วยยืดอายุการใช้งานปั๊มและเครื่องวิเคราะห์ด้วยสมบัติที่เป็นรูพรุนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงช่วยให้ระบบลำเลียงสารตัวอย่างมีประสิทธิภาพ ความดันต้านกลับต่ำ (น้อยกว่า 150 บาร์) จึงเป็นคอลัมน์ที่เหมาะสมทั้งกับงานด้านเภสัชกรรม อาหารและเครื่องดื่ม เทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์และพิษวิทยา

2.4 เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

2.4.1 **แอมเพอโรเมตรี** เป็นเทคนิคที่ประยุกต์โดยใช้หลักการของโวลแทมเมตรี ด้วยการให้ศักย์ไฟฟ้าที่คงที่แก่ขั้วไฟฟ้าทำงานที่เพียงพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าและวัดค่ากระแสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ [11] ขั้วไฟฟ้าทำงานที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันคือ ขั้วไฟฟ้าโบรอนโดปไดมอนด์ เนื่องจากมีสมบัติพิเศษหลายประการได้แก่ มีช่วงศักย์ไฟฟ้าใช้งาน

(electrochemical window) กว้าง เกิดการดูดซับสารบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงานน้อยและให้กระแสพื้นหลัง (background current) ต่ำ [12]



รูปที่ 2.3 โวลแทมโมแกรมของแอมเพอโรเมตรี

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter)

3.1.2 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์สูง (Milli-Q water system)

3.1.3 เครื่องชั่งสาร

3.1.4 เครื่องเขย่าสาร (sonicator)

3.1.5 แผ่นกรองเมมเบรนไนลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Nylon membrane syringe filter with polypropylene (PP) housing)

3.1.6 เครื่องโพเทนชิโอสแตท (Potentiostat, PG-100)

3.1.7 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.1.8 วาว์ลสำหรับฉีดสารขนาด 20 ไมโครลิตร (injection valve, 20 μL)

3.1.9 เครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge)

3.1.10 ขั้วไฟฟ้าสแตนเลส (stainless steel electrode)

3.1.11 ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (silver/silver chloride electrode)

3.1.12 ขั้วไฟฟ้าโบรอนโดปไดมอนด์ Boron-doped diamond electrode (BDD)

3.1.13 โฟลว์เซลล์ (flow cell)

3.1.14 แผ่นเทปลอน (teflon cell gasket)

3.1.15 ชุดการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

3.1.16 คอลัมน์มอนอลิต (monolithic column)

3.1.17 เครื่องซีเควันเซียลอินเจ็กชัน

3.2 สารเคมี

3.2.1 ซัลฟาไดอาซีน (sulfadiazine)

3.2.2 ซัลฟาเมธาซีน (sulfamethazine)

3.3.3 ซัลฟาเมโธซาโซล (sulfamethoxazole)

3.2.4 ซัลฟาไดเมธาโธซีน (sulfadimethoxine)

3.2.5 ซัลฟาควิโนซาลีน (sulfaquinoxaline)

3.2.6 ซัลฟากัวนิดีน (sulfaguanidine)

3.2.7 ซัลฟาโมโนเมททอกซีน (Sulfamonomethoxine)

3.2.8 อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile)

3.2.9 เอทานอล (ethanol)

3.2.10 เมทานอล (methanol)

3.2.11 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate)

3.3.12 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate)

3.3.13 กรดซิตริก (citric acid)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 บรรจุเฟสของแข็งชนิด Oasis HLB

นำอนุภาคของแข็งชนิด Oasis HLE จากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง จำนวน 0.048 กรัม บรรจุลงในท่อเพื่อเตรียมทำการสกัดตัวอย่างแบบอัตโนมัติ ดังภาพ

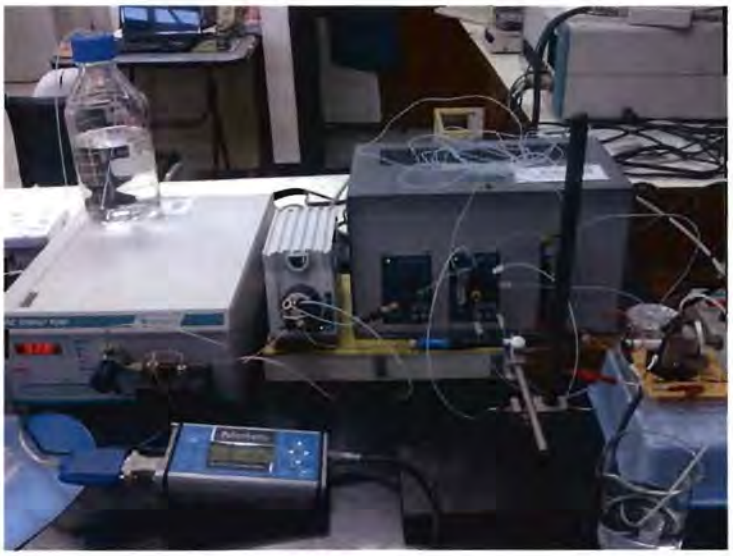
รูปที่ 3.1 อนุภาคของแข็งชนิด Oasis HLB จากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

รูปที่ 3.2 อนุภาคของแข็งชนิด Oasis HLB ที่บรรจุในท่อ

3.3.2 การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ

นำอนุภาคของแข็งชนิด Oasis HLB ที่บรรจุในท่อต่อกับระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน ดังรูป

รูปที่ 3.3 ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชัน



รูปที่ 3.4 การสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ โดยใช้ระบบซีเควินเชียลอินเจ็กชันร่วมกับเทคนิคแอมเพอโรเมตรี

3.3.3 **ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบไม่อัตโนมัติในการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเคว็นเชียลอินเจ็กชัน**

นำสารละลายมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ 10 พีพีเอ็ม ใส่ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์จากเฟสของแข็งด้วยระบบซีเคว็นเชียลอินเจ็กชัน หลังจากนั้นนำสารที่สกัดได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคโฟลว์อินเจ็กชันด้วยวิธีการฉีดเข้าสู่ระบบ โดยมีคอลัมน์มอนอลิตสำหรับแยกสารทั้ง 7 ชนิด ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี

3.3.3.1 ศึกษาอัตราเร็วในการชะเฟสของแข็งที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดโดยทำการศึกษาที่อัตราเร็ว 7, 8, 9, 10 และ 11 ไมโครลิตรต่อวินาที โดยใส่สารมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

3.3.3.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเฟตเคลื่อนที่คือ สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ต่ออะซีโตนไนไตรล์ต่อเอทานอลกับสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ถูกชะด้วยเมทานอล ในอัตราส่วน 95:5, 75:25, 50:50, 25:75 และ 10:90 โดยใส่สารมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็มลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

3.3.3.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด ด้วยเมทานอลโดยใส่สารมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

3.3.4 **ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติในการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเคว็นเชียลอินเจ็กชันร่วมกับเทคนิคแอมเพอโรเมตรี**

นำสารละลายมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ 10 พีพีเอ็ม ใส่ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์จากเฟสของแข็งพร้อมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณด้วยระบบซีเคว็นเชียลอินเจ็กชัน ซึ่งสารที่สกัดได้จะผ่านเข้าสู่คอลัมน์มอนอลิตแบบอัตโนมัติ โดยมีคอลัมน์มอนอลิตสำหรับแยกสารทั้ง 7 ชนิด ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี

3.3.4.1 ศึกษาอัตราเร็วในการชะเฟสของแข็งที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดโดยทำการศึกษาที่อัตราเร็ว 8, 9, 10 และ 11 ไมโครลิตรต่อวินาที โดยใส่สารมาตราฐานซัลโฟนาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

3.3.4.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเมทานอลกับเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ต่ออะซีโตนไนไตรด์ต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 และ 50:50 โดยใส่สารมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

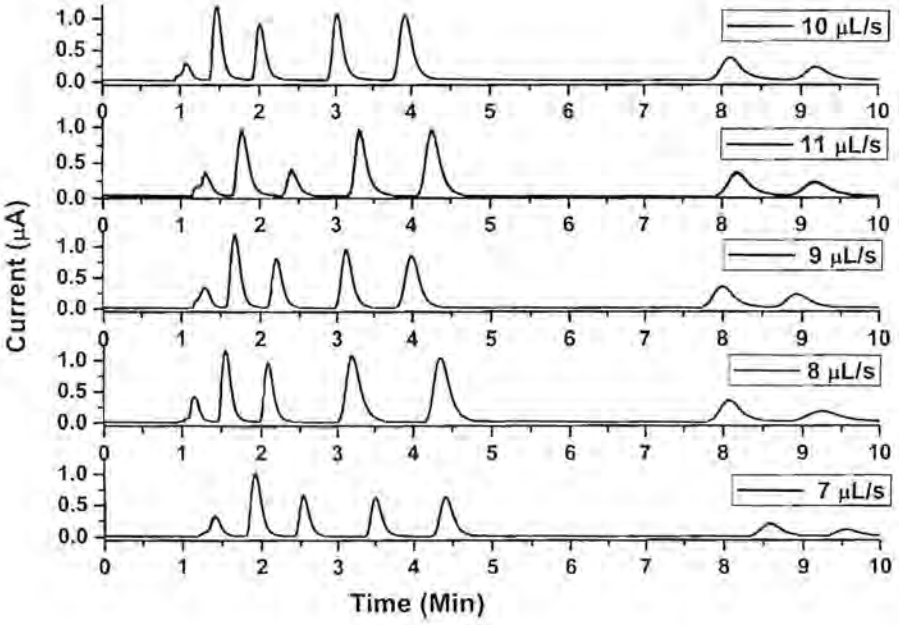
3.3.4.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด ด้วยเมทานอลโดยใส่สารมาตราฐานซัลโฟนาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบไม่อัตโนมัติในการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเควันเชียลอินเจ็กชัน

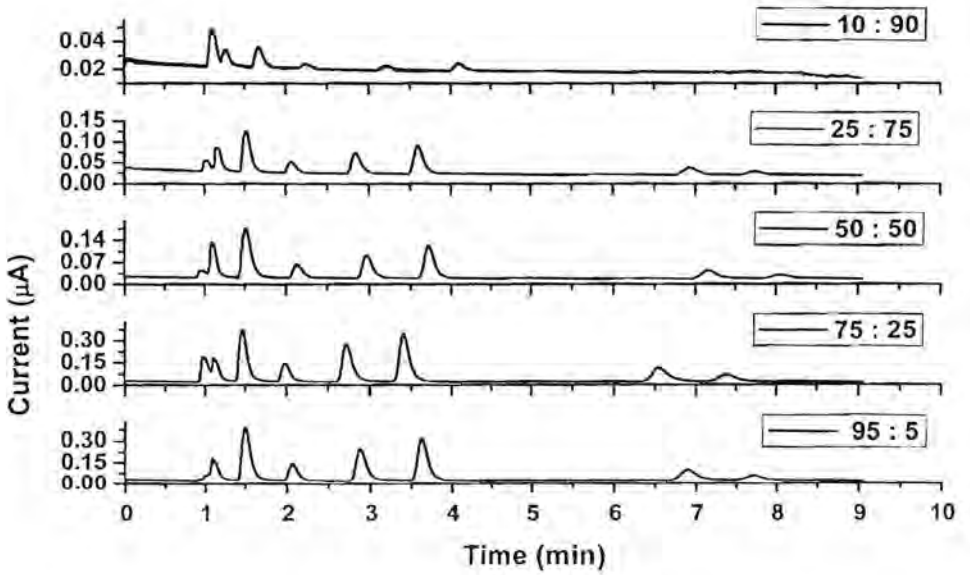
4.1.1 ศึกษาอัตราเร็วของการชะเฟสของแข็งที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด

อัตราเร็วของการชะที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด คือ 8 ไมโครลิตรต่อวินาที เนื่องจากให้สัญญาณตอบสนองที่สูงที่สุด



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของการชะสารจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

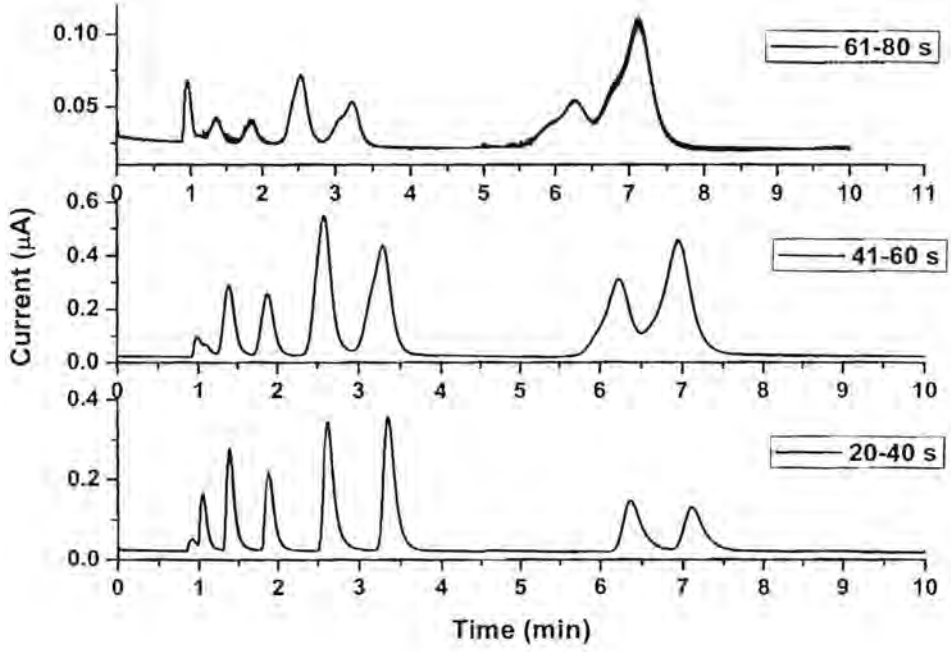
4.1.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ต่ออะซีโตนไนไตรด์ต่อเอทานอลกับสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ถูกซะด้วยเมทานอล โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่และสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ถูกซะด้วยเมทานอล คือ 95 : 5



รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่และสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ถูกซะด้วยเมทานอล

4.1.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดด้วยเมทานอล โดยใส่สารมาตราฐานซัลโฟนาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็ง จาก การสกัดด้วยเฟสของแข็ง

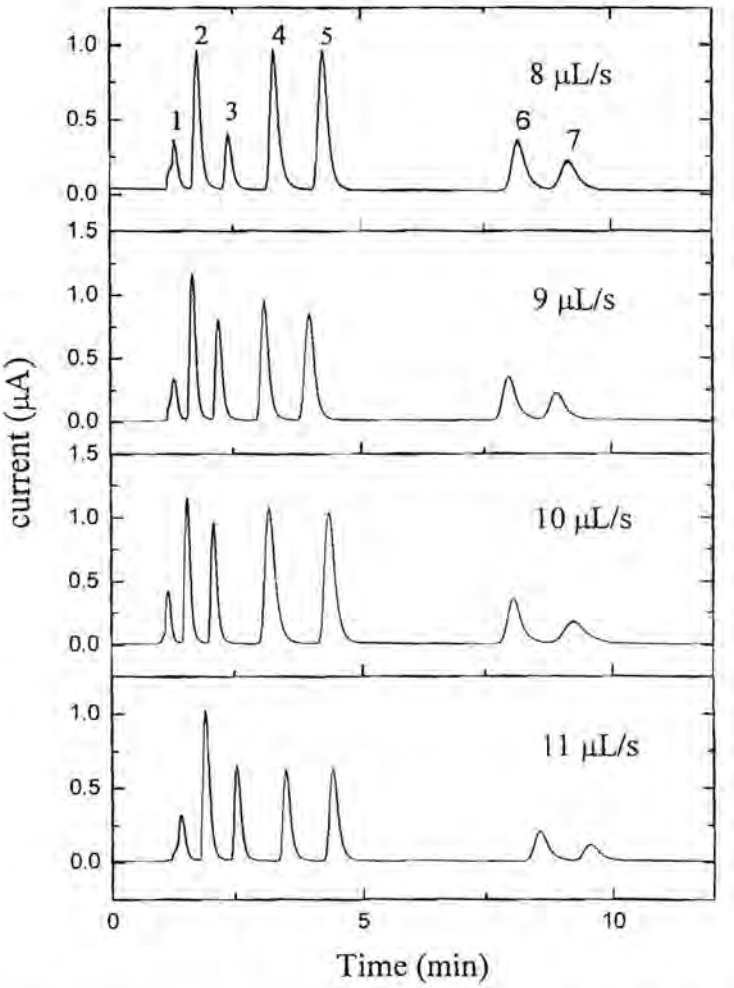
เวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด คือ วินาทีที่ 20-40 วินาที



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเก็บสารจากการชะ

4.2 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ ในการวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเควันเชียลอินเจ็กชันร่วมกับเทคนิคแอมเพอโรเมตรี

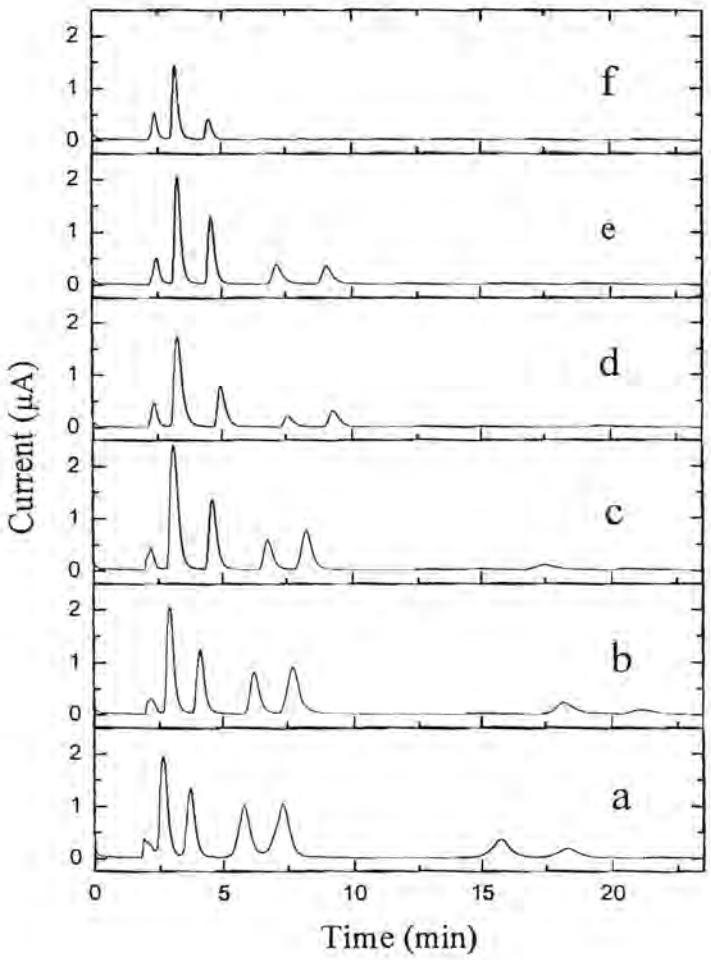
4.2.1 ศึกษาอัตราการเร็วของสารในขั้นตอนการผ่านสารตัวอย่างและการชะสารตัวอย่างที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด อัตราเร็วของการชะที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด คือ 10 ไมโครลิตรต่อวินาที เนื่องจากสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดมีการแยกที่ดีและให้สัญญาณตอบสนองที่สูงที่สุด



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของการชะสารจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

4.2.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเมทานอลต่อเฟสเคลื่อนที่ คือสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ต่ออะซีโตนไนไตรล์ต่อเอทานอล

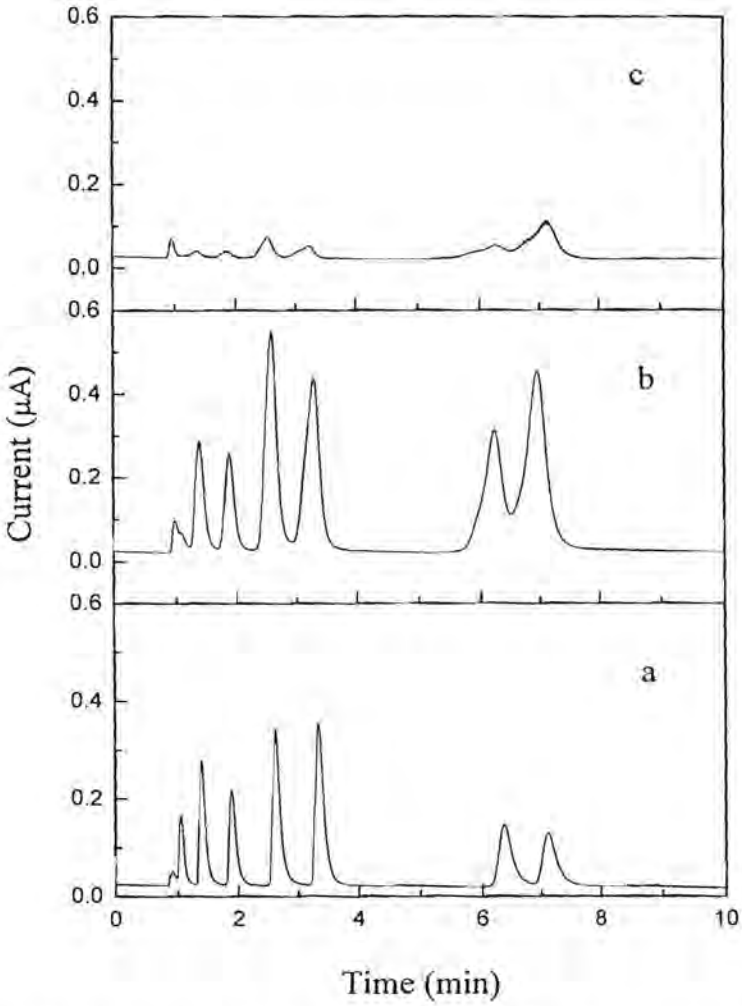
อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง เมทานอลต่อเฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากให้สัญญาณตอบสนองที่สูงที่สุด และได้สัญญาณของสารซัลโฟนาไมด์ครบทั้ง 7 ชนิด



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ เมทานอลต่อเฟสเคลื่อนที่ (a) 100:0, (b) 90:10, (c) 80:20, (d) 70:30, (e) 60:40, (f) 50:50

4.2.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดด้วยเมทานอลโดยใส่สารมาตราฐานซัลโฟนาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ลงท่อที่บรรจุอนุภาคของแข็งจากการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

เวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด คือ วินาทีที่ 20-24 วินาที เนื่องจากให้สัญญาณตอบสนองที่สมบูรณ์ที่สุด



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเก็บสารจากการชะ (a) 20-24 วินาที, (b) 25-29 วินาที, (c) 30-34 วินาที

4.3 ค่าความเป็นเส้นตรง และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าความเป็นเส้นตรง, ขีดจำกัดต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ และขีดจำกัดต่ำสุดที่วัดปริมาณได้

สารที่วิเคราะห์	ช่วงความเป็นเส้นตรง ($\mu g\ mL^{-1}$)	ความชัน (peak area units / ppm)	จุดตัด (μA)	R^2	ขีดจำกัดต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ ($\mu g\ mL^{-1}$)	ขีดจำกัดต่ำสุดที่วัดปริมาณได้ ($\mu g\ mL^{-1}$)
ซัลฟากัวนิดีน	0.01-8	0.0101	0.014	0.9972	1.75	5.85
ซัลฟาไดอาซีน	0.01-8	0.0348	0.0152	0.9981	0.27	0.88
ซัลฟาเมธาซีน	0.01-8	0.0244	0.0117	0.9998	0.34	1.13
ซัลฟาโมโนเมททอกซิน	0.01-8	0.0186	0.0104	0.9993	0.42	1.42
ซัลฟาเมโธซาโซล	0.01-8	0.0165	0.0114	0.9997	0.44	1.47
ซัลฟาไดเมธาโธซีน	0.1-8	0.006	0.0088	0.9972	1.23	4.1
ซัลฟาควิโนซาลีน	0.1-8	0.0035	0.0082	0.9941	1.85	6.18

สรุปผลการวิจัย

การสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติโดยใช้ระบบซีเคว็นเชียลอินเจ็กชัน ใช้ระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างน้อยและลดปริมาณการใช้ตัวทำละลาย ในการทดลองนี้ได้หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์โดยใช้ระบบซีเคว็นเชียลอินเจ็กชันร่วมกับเทคนิคแอมเพอโรเมตรีได้ดังนี้ อัตราเร็วของการชะที่เหมาะสมของสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด คือ 8 ไมโครลิตรต่อวินาที อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิดที่ถูกชะด้วยเมทานอลคือ 95:5 และ เวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด คือ วินาทีที่ 20-40 วินาที และได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ ร่วมกับระบบซีเคว็นเชียลอินเจ็กชันและเทคนิคแอมเพอโรเมตรีดังนี้ อัตราการไหลของสารในขั้นตอนการผ่านสารตัวอย่างและการชะสารตัวอย่าง คือ 10 ไมโครลิตรต่อวินาที อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเมทานอลต่อเฟสเคลื่อนที่ คือ 100:0 และ เวลาที่เหมาะสมสำหรับการชะสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 7 ชนิด คือ วินาทีที่ 20-24 วินาที จากภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบอัตโนมัติ ทำให้สามารถตรวจวัดสารซัลโฟนาไมด์ 7 ชนิด โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอโรเมตรีได้สัญญาณการตอบสนองที่ดีและลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างลง

บรรณานุกรม

[11] ลาวัลย์ ศรีพงษ์, "การวิเคราะห์เชิงเคมีไฟฟ้า", โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, กรุงเทพ, พิมพ์ครั้งที่ 1, (2543).

[1] Preechaworapun, A., Chuanuwatanakul, S., Einaga, Y., Grudpan, K., Motomizu, S., Chailapakul, O., "Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode", Talanta, 68 . (2006) : 1726-1731.

[2] Cubarsi, M. G., Castellari, M., Valero, A., Regueiro, J. A., "A simplified LC-DAD method with an RP-C_{12} column for routine monitoring of three sulfonamides in edible calf and pig tissue" Analytical Bioanalytical Chemistry, 385. (2006) : 1218-1224.

[3] Posyniak, A., Zmudzki, J., Mitrowska, K., "Dispersive solid-phase extraction for the Determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography", Journal of Chromatography A, 1087. (2005) : 259-264.

[4] Gehring, T. A., Griffin, B., Williams, R., Geiseker, C., Rushing, L. G., Siitonen, P. H., "Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection", Journal of Chromatography B, 840. (2006) : 132-138.

[5] Kishida, K., Furusawa, N., "Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken", Journal of Chromatography A, 937. (2001) : 49-55.

[6] Fuh, M. S., Chu, S., "Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis", Analytica Chimica Acta, 499. (2003) : 215-221.

[7] Thompson, T. S., Noot, D. K., "Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry", Analytica Chimica Acta, 551. (2005) : 168-176.

[8] Cavaliere, C., Curini, R., Corcia, D. A., Nazzari, M., Samperi, R., "A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51. (2003) : 558-566.

[9] Li, H., Kijak, P. J., Turnipseed, S. B., Cui, W., "Analysis of veterinary drug residues in shrimp a multi- class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry", Journal of Chromatography B, 836. (2006) : 22-38.

[10] Wang, X., Li, K., Shi, D., Xiong, N., Jin, X., Yi, J., Bi, D., "Development of an immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55. (2007) : 2072-2078.

[12] Fujishima, A., Einaga, Y., Rao, T. N., Tryk, D. A., "Diamond electrochemistry", BKC, Tokyo, (2005).