



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างไข่ไก่เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณไอโอดีนโดยใช้เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีด้วยอิเล็กทริกคอลคอนดักติวิตี

Development of sample preparation for determination of iodine in eggs using ion chromatography with electrical conductivity detector

**ชื่อนิสิต** นางสาวศศิพัชร์ ศรีวะลา

**เลขประจำตัว** 5833087223

**ภาควิชา** เคมี

**ปีการศึกษา** 2561

**คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างไข่ไก่เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณไอโอดีนโดยใช้เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี  
ด้วยอิเล็กทริกคอลคอตักติวิตี

Development of sample preparation for determination of iodine in eggs using ion  
chromatography with electrical conductivity detector

โดย

นางสาวศศิพัชร์ ศรีวะลา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

โครงการ      พัฒนาวีธีการเตรียมตัวอย่างไข่ไก่เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณไอโอดีนโดยใช้เทคนิค  
                         ไอออนโครมาโทกราฟีด้วยอิเล็กโทรคอลคอนดักติวิตี

โดย              นางสาวศศิพัชร์ ศรีวะลา

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

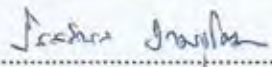
คณะกรรมการสอบโครงการ

  
.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรภคกุล)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปกรณ์ วรรณศุภากุล)

  
.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัสสรณ์พล งามอุโฆษ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

  
.....หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ 21 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2562



Project Title                    Development of sample preparation for determination of iodine in eggs using ion chromatography with electrical conductivity detector

Student Name                    Miss Sasipat Srivala      Student ID 5833087223

Advisor Name                    Associate Professor Pakorn Varanusupakul, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2018

### **Abstract**

In this research, was developed sample preparation method using protein precipitation technique for determination of iodine content in chicken eggs using ion chromatography. Parameters that affect protein precipitation efficiency were studied; such as types of organic solvent by observing the physical characteristics of the egg samples and matrix effect by evaluating the %recovery of spiked iodide and iodate in egg sample at the concentration of 5 mg/L. Protein precipitation method with organic solvent either MeOH or ACN with an addition of 1 %formic acid could physically remove egg matrix effectively. Regarding to the recovery study, methanol had showed a better performance in removing egg matrix for determination of iodide and iodate than acetonitrile. However, the %recovery showed that the egg matrix significantly affects the determination of iodide and iodate in the egg samples. The method was applied for determination of iodine content in the iodine enriched egg samples. The iodine content in iodine enriched egg sample 1 was 0.4103 µg/egg and 0.4534 µg/egg with %relative error of -6 – 4%. The iodine content in iodine enriched egg sample 2 was 0.8320 µg/egg and 0.5223 µg/egg with %relative error of 65 – 78%.

Keywords: Ion chromatography, Protein precipitation, Iodine

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.ปรกรณ์ วรานุศุภากุล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาสละเวลา ให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่อย่าง มาอย่างดีโดยตลอด ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรภคกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัสสรพล งามอุโฆษ ที่ยินดีสละเวลาในการตรวจทานแก้ไข และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนบางส่วนในการทำวิจัย รวมทั้งรุ่นพี่ในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดในการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคลากรทางการศึกษา และผู้สนใจทั่วไปไม่มากนัก

## สารบัญ

|  | หน้า      |
|--|-----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย  | ค         |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ   | ง         |
| กิตติกรรมประกาศ  | จ         |
| สารบัญ   | ฉ         |
| สารบัญตาราง  | ช         |
| สารบัญรูป  | ฌ         |
| <b>บทที่ 1 บทนำ</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ  | 1         |
| 1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย  | 2         |
| 1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง  | 2         |
| 1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง   | 4         |
| 1.4.1 องค์ประกอบของไข่ไก่  | 4         |
| 1.4.2 วิธีการตกตะกอนโปรตีน   | 6         |
| 1.4.3 ไอออนโครมาโทกราฟี (Ion chromatography)                                     | 9         |
| 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ  | 18        |
| <b>บทที่ 2 การทดลอง</b>  | <b>19</b> |
| 2.1 อุปกรณ์  | 19        |
| 2.2 สารเคมี  | 19        |
| 2.3 วิธีการทดลอง   | 20        |
| 2.3.1 การเตรียมสารละลายต่าง ๆ  | 20        |
| 2.3.2 การวิเคราะห์สารละลายไอโอดีนด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี                     | 20        |
| 2.3.3 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ | 21        |
| 2.3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ   | 23        |

|  |    |
|--|----|
| <b>บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง</b>                                    | 26 |
| 3.1 การวิเคราะห์ไอโอไดต์และไอโอเดตไอออนด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี               | 26 |
| 3.2 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์   | 28 |
| 3.2.1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์  | 28 |
| 3.2.2 เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอร์มิก                                | 29 |
| 3.2.3 เวลาที่ใช้ในการวอร์เท็กซ์  | 31 |
| 3.2.4 ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับ | 30 |
| 3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ   | 33 |
| 3.3.1 ความถูกต้องและความเที่ยง   | 33 |
| <b>บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง</b>  | 35 |
| บรรณานุกรม   | 36 |
| ภาคผนวก  | 39 |
| ประวัติผู้วิจัย  | 44 |



## สารบัญตาราง

|  | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบของไข่แดง   | 4    |
| ตารางที่ 1.2 องค์ประกอบของไข่ขาว   | 5    |
| ตารางที่ 2.1 สภาวะในการวิเคราะห์สารไอโอดีนและไอโอเดตด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี  | 21   |
| ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอดีน และไอโอเดตในเมทริกซ์น้ำ   | 31   |
| ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของไอโอดีนในการวอร์เท็กซ์ที่เวลาต่าง ๆ   | 32   |
| ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอเดตในเมทริกซ์ไข่  | 33   |
| ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอดีนในเมทริกซ์ไข่  | 33   |
| ตารางที่ 3.5 ปริมาณของไอโอดีนในไข่เสริมไอโอดีนตัวอย่างที่ 1 (ไข่เสริมไอโอดีน 24 ไมโครกรัม) และ ในไข่เสริมไอโอดีนตัวอย่างที่ 2 (ไข่เสริมไอโอดีน 150 ไมโครกรัม)  | 34   |
| ตารางที่ ก-1 พื้นที่ใต้พีคของสารละลายไอโอดีนในเมทริกซ์น้ำ  | 40   |
| ตารางที่ ก-2 พื้นที่ใต้พีคของสารละลายไอโอเดตในเมทริกซ์น้ำ  | 40   |
| ตารางที่ ก-3 พื้นที่ใต้พีคของไอโอดีนในการวอร์เท็กซ์ที่เวลาต่าง ๆ   | 40   |
| ตารางที่ ก-4 พื้นที่ใต้พีค เปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอเดต  | 41   |
| ตารางที่ ก-5 พื้นที่ใต้พีค เปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอดีน  | 42   |
| ตารางที่ ก-6 พื้นที่ใต้พีคของไอโอดีน ในไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 1 (ไข่เสริมไอโอดีน 24 ไมโครกรัม) และ ในไข่ไก่เสริมไอโอดีน 2 (ไข่เสริมไอโอดีน 150 ไมโครกรัม) | 43   |

## สารบัญรูป

|   | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1.1 การกระจายของประจุและบริเวณไม่ชอบน้ำในโมเลกุลโปรตีน   | 6    |
| รูปที่ 1.2 การละลายของโปรตีนที่ pH รอบจุดไอโซอิเล็กทริก   | 7    |
| รูปที่ 1.3 โมเลกุลของน้ำรอบ ๆ บริเวณไม่ชอบน้ำบนพื้นผิวของโปรตีน   | 7    |
| รูปที่ 1.4 การเกาะกลุ่มของโปรตีนโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์                                     | 8    |
| รูปที่ 1.5 โมเลกุลโปรตีนหลังจากใส่โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต  | 9    |
| รูปที่ 1.6 ส่วนประกอบของเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี  | 10   |
| รูปที่ 1.7 เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี รุ่น TM Dionex™ Integriion™ HPICTM  | 10   |
| รูปที่ 1.8 ส่วนประกอบของปั๊ม  | 11   |
| รูปที่ 1.9 เรซินเฟสคงที่ชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออน  | 12   |
| รูปที่ 1.10 เรซินเฟสคงที่ชนิดแลกเปลี่ยนแอนไอออน   | 13   |
| รูปที่ 1.11 แผนผังการไหลของวาล์วสำหรับการฉีด  | 15   |
| รูปที่ 1.12 อุปกรณ์ช่วยขยายสัญญาณการตรวจวัดและลดสัญญาณรบกวนของเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี                        | 16   |
| รูปที่ 1.13 กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนของตัวช่วยขยายสัญญาณการตรวจวัดและลดสัญญาณรบกวนของเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี | 16   |
| รูปที่ 1.14 electrical conductivity detector  | 17   |
| รูปที่ 1.15 Gradient elution profile  | 18   |
| รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการศึกษาผลของเมทริกซ์ต่อการหาปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดต                                       | 23   |
| รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไอโอไดด์และไอโอเดตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร                   | 26   |
| รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานแสดงสมการเส้นตรงของไอโอไดด์และไอโอเดตที่ความเข้มข้น 1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร           | 27   |

- รูปที่ 3.3** กราฟมาตรฐานแสดงสมการเส้นตรงของไอโอดีและไอโอดีที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 28
- รูปที่ 3.4** แสดงลักษณะทางกายภาพเมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในไข่ไก่ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น สารละลายกรดฟอร์มิกในอะซิโตนไตรล์ต่าง ๆ 29
- รูปที่ 3.5** แสดงลักษณะทางกายภาพเมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในไข่ไก่ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น สารละลายกรดฟอร์มิกในเมทานอลต่าง ๆ 30

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ไอโอดีน (Iodine) เป็นแร่ธาตุที่มีปริมาณน้อยในร่างกายมนุษย์ พบที่ต่อมไทรอยด์เป็นหลัก และมีบทบาทสำคัญในการสร้างฮอร์โมนไทรอยด์ การขาดสารไอโอดีนเป็นอันตรายต่อสุขภาพของบุคคลทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหมู่เด็กก่อนวัยเรียนและสตรีมีครรภ์ในประเทศที่มีรายได้ต่ำ ปัญหาและความผิดปกติเหล่านี้สามารถขจัดได้ด้วยการบริโภคไอโอดีนอย่างเพียงพอซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักของทั่วโลก หากทำได้จริงก็จะสามารถกำจัดการขาดสารไอโอดีนได้ โดยปกติร่างกายต้องการไอโอดีนประมาณ 150 ไมโครกรัมต่อวัน [1-2] การเสริมไอโอดีนในอาหารจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยควบคุมการขาดไอโอดีนได้ เช่น การเสริมไอโอดีนในนม และไข่ไก่เป็นต้น [3] ไข่ไก่เป็นวัตถุดิบสำคัญในการประกอบอาหาร สำหรับประชากรเกือบทุกเชื้อชาติบนโลกมีการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากราคาที่ถูกลง หาได้ง่าย และสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นคาวหรือหวาน และจัดเป็นอาหารที่ได้รับความนิยมมากในกลุ่มประชากรไทย ดังนั้นการเสริมไอโอดีนในไข่ไก่จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง [4] การกำหนดปริมาณไอโอดีนในอาหารเสริมไอโอดีนจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารและให้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณไอโอดีนแก่ผู้บริโภคได้ ดังนั้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนในไข่ไก่เป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง

วิธีการวิเคราะห์สำหรับการตรวจวัดไอโอดีนมีอยู่หลายวิธี เช่น อินดักทีฟ คัปเปิล พลาสมา-แมสสเปกโตรเมตรี (Inductively-Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP-MS) [5-6], แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, GC-MS) [7-8] สเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) [9] นอกจากนี้ยังมีเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี (ion chromatography, IC) เป็นเทคนิคการแยกโดยอาศัยการแลกเปลี่ยนไอออนเมื่อทำการตรวจวัดไอโอดีน จะทำให้วัดได้ทั้งไอโอดีนและไอโอดेटเมื่อทำการรันสารเพียงครั้งเดียว แต่เนื่องจากองค์ประกอบของตัวอย่างไข่ไม่สามารถตรวจวัดได้โดยตรง และจำเป็นต้องทำการเตรียมตัวอย่างก่อนตรวจวัดด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี เพื่อกำจัดองค์ประกอบของตัวอย่างไข่ และช่วยให้ไอโอดีนอยู่ในรูปที่เหมาะสมก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ โดยจะขึ้นอยู่กับตัวอย่าง เมทริกซ์ และระดับความเข้มข้นที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์

จากงานวิจัยก่อนหน้ามีการใช้หลายเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีน เช่น วิธีเผาให้เป็นขี้เถ้าที่อุณหภูมิสูง (Alkali dry ashing) [10] ด้วยเทคนิคนี้สารอินทรีย์ในกลุ่มตัวอย่างจะถูกทำลาย ไอโอดีนที่ถูกปล่อยให้เป็นอิสระจะได้รับการวิเคราะห์ แม้ว่าจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่วิธีการนี้ใช้เวลาค่อนข้างนานเนื่องจากมีหลายขั้นตอน อาจมีข้อเสียคือ ไอโอดีนบางส่วนระเหยกลายเป็นไอ และตัวอย่างเกิดการปนเปื้อนเนื่องจากฝุ่นละอองในอากาศ นอกจากนี้ อนุภาคที่เกิดขึ้นภายในเตาเผาความร้อนสูงอาจเป็นสาเหตุของการที่แบลงค์มีค่าสูง และไม่คงที่ซึ่งไม่สามารถยอมรับได้ในกรณีที่ความเข้มข้นของไอโอดีนในแบลงค์และสารตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกัน วิธีตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ [13] จึงเป็นอีกทางเลือกที่ถูกนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่าง พบว่าข้อดีของการตกตะกอนด้วยวิธีนี้สามารถนำโปรตีนออกได้ง่ายในสถานะที่ไม่รุนแรงและมีขั้นตอนน้อยกว่า ซึ่งแต่ละเทคนิคมีความเหมาะสมต่อวิธีวิเคราะห์แตกต่างกันไป โดยผู้วิจัยสนใจพัฒนาเตรียมตัวอย่างไข่ไก่ด้วยเทคนิคการตกตะกอนโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี [11]

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอนโปรตีนในไข่ไก่เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไอโอดีนโดยใช้เครื่องไอออนโครมาโทกราฟีด้วยอิเล็กโทรลิตคอนดักติวิตี (ion chromatography with electrical conductivity detector) ได้

## 1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน สำหรับตรวจวัดปริมาณไอโอดีนในไข่ไก่ โดยใช้เครื่องไอออนโครมาโทกราฟีด้วยอิเล็กโทรลิตคอนดักติวิตี

## 1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ และการวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนในตัวอย่างต่าง ๆ ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี ดังนี้

ค.ศ. 1988 Buchberger [12] ทำการตรวจวัดปริมาณไอโอดีนและโบรไมด์ ในตัวอย่าง เซรัม, นม, เกลีส และน้ำ ด้วยไอออนโครมาโทกราฟีโดยใช้ post-column reaction ตรวจวัด ซึ่งสามารถตรวจวัดไอโอดีนและโบรไมด์ในตัวอย่างสารชีวภาพและน้ำ โดยไม่ต้องทำการเตรียมตัวอย่าง

ค.ศ. 1990 Chadha และคณะ [13] ทำการหาปริมาณไอโอดีนในตัวอย่าง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม และเกลือแกงโดยไอออนโครมาโตกราฟี ด้วยอิเล็กโทรคอลคอนดักติวิตี ทำการเตรียมสารตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเพื่อตกตะกอนโปรตีนนม กำจัดตัวทำละลายอินทรีย์จากการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid-phase extraction, SPE) ก่อนตรวจวัดด้วยเครื่องไอออนโครมาโตกราฟี ส่วนเกลือแกงจะถูกเจือจางแล้วทำการกรองก่อนตรวจวัด

ค.ศ. 2001 Below และคณะ [14] ทำการหาปริมาณไอโอดีนในปัสสาวะโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคู่ออออน ด้วยอิเล็กโทรคอลคอนดักติวิตี โดยทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ ได้แก่ ผลของ pH, ความเข้มข้นของคู่ออออน, สัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ และ สารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ เช่นเดียวกับความเข้มข้นของเกลือที่เป็นตัวชะ โดยอิเล็กโทรคอลคอนดักติวิตีจะเพิ่มความไวในการตรวจวัด

ค.ศ. 2015 Srivorakul [15] ได้ตรวจวัดปริมาณไอโอดีนในไข่สดจากบริษัทต่าง ๆ ทำการเตรียมสารตัวอย่างด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic Acid, TCA) นอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบกับวิธีการเผาให้เป็นขี้เถ้าที่อุณหภูมิสูง (alkali dry ashing) และวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยโซเดียม โดเดคซิล ซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) โดยใช้เทคนิคการตรวจวัดเชิงสีด้วยปฏิกิริยาแซนเทลล์-คอลทอป

ค.ศ. 2018 Niemann [16] พัฒนาริธีเพื่อตรวจวัดและยืนยันไอโอดีนและไทโอไซยาเนตในนมผงและนมผงที่ดัดแปลงให้คล้ายนมแม่ ด้วยเครื่องไอออนโครมาโตกราฟีโดยใช้โฟโตไดโอดอาร์เรย์ photodiode array ตรวจวัด ใช้การปั่นเหวี่ยงแบบอัลตราฟิลเตรชัน (centrifugal ultrafiltration) พบไอโอดีนที่ 0.3 ถึง 1.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีขีดจำกัดของการตรวจวัดที่ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

ค.ศ. 2018 Malongo และคณะ [17] ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือเมทานอล และ อะซิโตนไนไตรล์ที่มีความเข้มข้นสารละลายกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหาปริมาณไอโอดีนที่มีความไวสูงในตัวอย่าง ได้แก่ เกลือแกง, อาหารทะเล, นม และ ยาที่มีไอโอดีนเป็นส่วนประกอบ ด้วยไอออนโครมาโตกราฟี โดยแอมเพอโรเมตริกที่มีขั้วอิเล็กโทรด เป็น silver-based solid carbon paste โดยความไวของไอโอดีนในตัวอย่างจริงจะขึ้นกับขนาดอนุภาคเงินที่นำมาตรวจวัด

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่า มีการใช้เทคนิคการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีแต่ยังไม่มีการนำไปใช้กับตัวอย่างไข่ไก่ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนจากตัวทำละลายอินทรีย์ และตรวจวัดปริมาณไอโอดีนในไข่ไก่โดยใช้เครื่องไอออนโครมาโทกราฟีด้วยอิเล็กทริกคอลคอนดักติวิตี

## 1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

### 1.4.1 องค์ประกอบของไข่ไก่

ไข่เป็นอาหารที่ถูกนำมาบริโภคในครัวเรือนอย่างแพร่หลาย ประกอบด้วย เปลือกไข่ที่ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายต่อไข่ขาวและไข่แดง ซึ่งรวมกันอยู่ภายใต้เนื้อเยื่อบาง ๆ หลายชั้น โดยองค์ประกอบของไข่ไก่ที่มีความสำคัญกับมนุษย์คือไข่ขาวและไข่แดง

#### 1.4.1.1 ไข่แดง (egg yolk)

ไข่แดง เป็นส่วนประกอบของไข่ โดยอยู่ภายในเปลือกไข่ ประกอบด้วยสารอาหารไว้ใช้เลี้ยงตัวอ่อน เมื่อรวมกับไข่ขาวจะเป็นเซลล์เดียวจนกว่าจะมีการปฏิสนธิ ไข่แดงมี 36% ของน้ำหนักทั้งหมด โดยตารางที่ 1.1 แสดงองค์ประกอบของไข่แดง ซึ่งมีไขมัน และโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลัก

#### ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบของไข่แดง [18]

|              | Dry yolk (%) |
|--------------|--------------|
| ไขมัน        | 62.5         |
| โปรตีน       | 33.0         |
| คาร์โบไฮเดรต | 1.0          |
| แร่ธาตุ      | 3.5          |

ไขมันมีเฉพาะในไข่แดง คิดเป็น 5-6 กรัม ในไข่ 60 กรัม ไขมันเกือบทั้งหมดอยู่ในรูปไลโปโปรตีนเชิงซ้อนในไข่แดง ไขมันไข่แดงส่วนใหญ่อยู่ในรูป ไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol), ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และ คอเลสเตอรอล (Cholesterol) อีสาระ ไตรเอซิลกลีเซอรอลและฟอสโฟลิพิดเป็นองค์ประกอบหลักในไข่แดง 65% และ 32% ตามลำดับ โปรตีนไข่ที่อยู่ในไข่แดงเป็นไลโปโปรตีน (Lipoprotein) ซึ่งมีความหนาแน่นต่ำและความหนาแน่นสูง ไลโปโปรตีนหนาแน่นต่ำ (Low-density lipoprotein, LDL) เป็นโปรตีนที่สำคัญมีถึง 65% ของโปรตีนไข่แดงทั้งหมด ไลโปโปรตีนหนาแน่นสูง (High-density lipoprotein, HDL) อยู่ในรูปสารเชิงซ้อนกับฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) เรียกว่า ฟอสวิทิน (phosvitin) เป็น 80% ของฟอสฟอรัสในไข่ ซึ่งได้มาจากไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin, VTG) ที่สร้างขึ้นในตับ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่น ๆ ในไข่แดง เช่น ลิเวติน (Livetin) และ โปรตีนที่จับกับไรโบฟลาวิน (riboflavin-binding protein)

#### 1.4.1.2 ไข่ขาว (egg white)

ไข่ขาว (egg white) มีอยู่ประมาณร้อยละ 58 ของน้ำหนักไข่ทั้งฟอง เป็นส่วนของเหลวชั้นหนืดล้อมรอบไข่แดง และยังช่วยเสริมอาหารให้ตัวอ่อนที่กำลังเติบโตด้วย ในไข่ขาวประกอบด้วยโปรตีนสำคัญดังตาราง 1.2 เช่น โอวัลบูมิน (ovalbumin), โอโวทรานส์เฟอรัริน (ovotransferrin), โอโวมิวคอยด์ (ovomuroid), โอโวมิวซิน (ovomucin) และ ไลโซไซม์ (lysozyme) คิดเป็น 83% ของโปรตีนไข่ขาวทั้งหมด โปรตีนย่อยอื่น ๆ พบที่ความเข้มข้นต่ำ คิดเป็น 17% ของโปรตีนไข่ขาวทั้งหมด

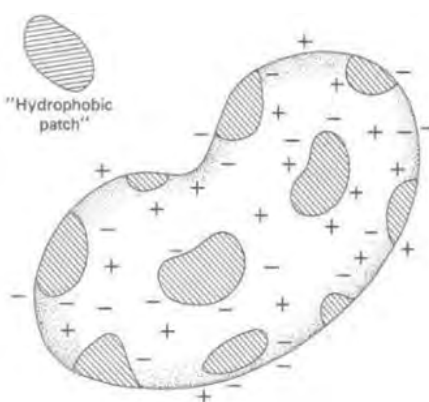
#### ตารางที่ 1.2 องค์ประกอบของไข่ขาว [18]

| โปรตีน                   | Dry egg white (%) |
|--------------------------|-------------------|
| โอวัลบูมิน (ovalbumin)   | 54                |
| โคแนลบูมิน (conalbumin)  | 13                |
| โอโวมิวคอยด์ (ovomuroid) | 1.2               |
| ไลโซไซม์ (lysosome)      | 3.5               |



### 1.4.2 วิธีการตกตะกอนโปรตีน [19]

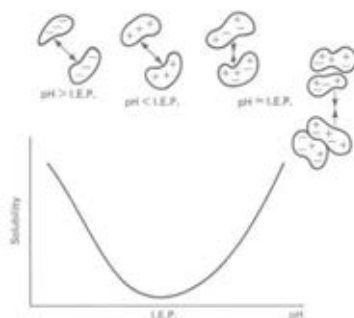
โดยทั่วไป พื้นผิวของโมเลกุลโปรตีนประกอบไปด้วยส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ส่วนต่าง ๆ เหล่านี้มีความสำคัญต่อการละลายของโปรตีน ความสามารถในการละลายของโปรตีนส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนหรือการลดลงของอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำ ทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน



รูปที่ 1.1 การกระจายของประจุและบริเวณไม่ชอบน้ำในโมเลกุลโปรตีน [19]

#### 1.4.2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยจุดไอโซอิเล็กทริก

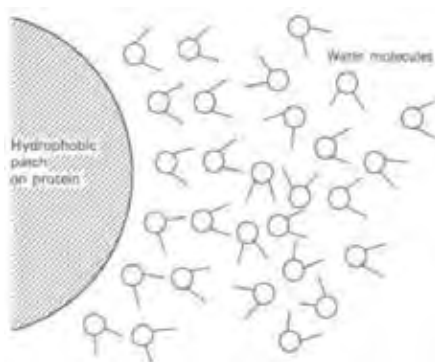
จุดไอโซอิเล็กทริกคือจุดของค่า pH ที่โมเลกุลกรดอะมิโนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ เมื่อกรดอะมิโนในสารละลายมีค่า pH ที่สอดคล้องกับจุดไอโซอิเล็กทริก โดยที่อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนจะเพิ่มขึ้น การละลายของโปรตีนจะลดลง และโปรตีนจะเกิดการตกตะกอนในสารละลาย รูปที่ 1.2 แสดงการตกตะกอนของโปรตีนเมื่อมีค่า pH ใกล้เคียงกับจุดไอโซอิเล็กทริก โปรตีนแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามจุดไอโซอิเล็กทริก คือ โปรตีนที่เป็นเบสมียจุดไอโซอิเล็กทริกสูงกว่า pH 7 และโปรตีนที่เป็นกรดจะมีค่าไอโซอิเล็กทริกต่ำกว่า pH 7 จากข้อมูลดังกล่าว จึงบอกได้ว่าส่วนประกอบของโปรตีนและจุดไอโซอิเล็กทริกมีความสำคัญสำหรับการตกตะกอนโปรตีน



รูปที่ 1.2 การละลายของโปรตีนที่ pH รอบจุดไอโซอิเล็กทริก [19]

#### 1.4.2.2 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง

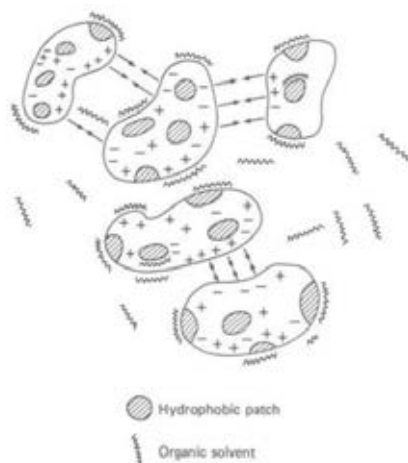
ในสภาพปกติ โปรตีนจะละลายอยู่ในน้ำ เมื่อเติมเกลือที่มีความเข้มข้นสูงลงไป น้ำจะถูกดึงออกจากโมเลกุลโปรตีน ดังรูป 1.3 โดยจะลดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำ ส่งผลให้อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนเพิ่มขึ้น คุณสมบัติและลักษณะที่สำคัญของเกลือที่ใช้ในการทำการแยกโดยการเติมเกลือ (salting out) คือคุณสมบัติการละลายของเกลือและความสามารถในการเกิดการแยกโดยเติมเกลือของประจุไอออน



รูปที่ 1.3 โมเลกุลของน้ำรอบ ๆ บริเวณไม่ชอบน้ำบนพื้นผิวของโปรตีน [19]

### 1.4.2.3 การตกตะกอนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

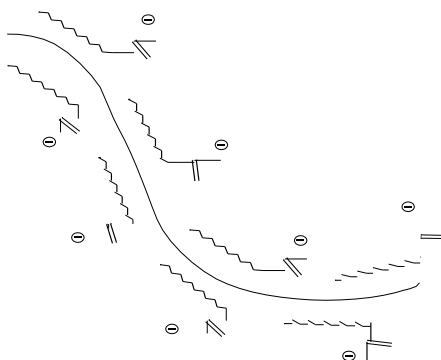
ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอลและอะซิโตนถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อตกตะกอนโปรตีน เนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ โดยตัวทำละลายอินทรีย์จะลดค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของน้ำ ส่งผลให้อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำลดลงและอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนจะเพิ่มขึ้น ดังรูป 1.4



รูปที่ 1.4 การเกาะกลุ่มของโปรตีนโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ [19]

### 1.4.2.4 การตกตะกอนโปรตีนด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตและอะซิเตทบัฟเฟอร์

การตกตะกอนโปรตีนด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตและอะซิเตทบัฟเฟอร์ เป็นส่วนหนึ่งของเทคนิคในการแยกพลาสมาชนิด โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดแอนไอออนิก เมื่อใส่ลงไปโปรตีน โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตสามารถคลายกลุ่มก้อนโปรตีน ทำให้เกิดโปรตีนที่คลายตัวแล้วที่เป็นประจุลบ ดังแสดงในรูป 1.5 บัฟเฟอร์ที่เติมลงไปเพื่อทำให้ประจุของโปรตีนเป็นกลาง ทำให้เกิดการรวมตัวกันและตกตะกอน



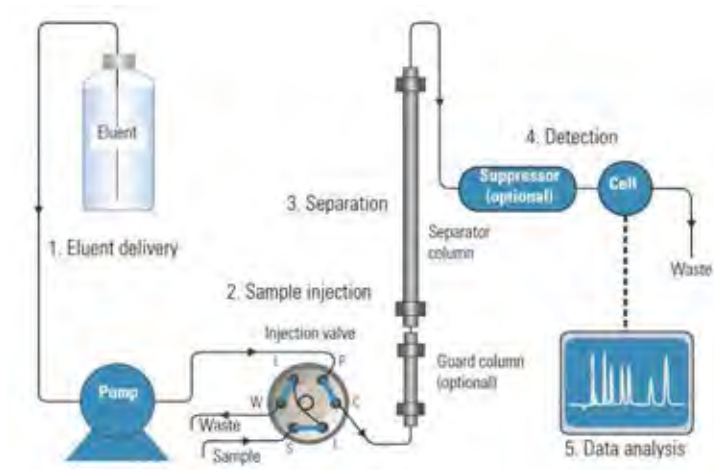
รูปที่ 1.5 โมเลกุลโปรตีนหลังจากใส่โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต [19]

#### 1.4.2.5 การตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอสिटิก

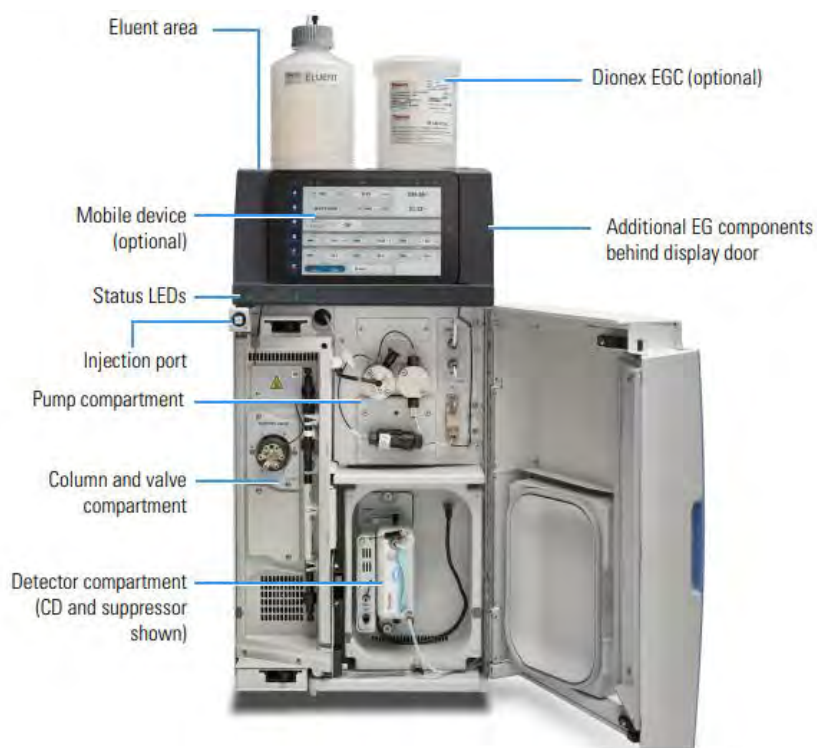
กรดไตรคลอโรแอสिटิกมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในฐานะตัวตกตะกอนโปรตีน การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอสिटิกนั้นเข้าใจยากและไม่ชัดเจน อาจอธิบายได้ว่าประจุลบของไตรคลอโรอะซิเตดอาจหยุดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน ส่งผลให้โปรตีนที่คลายออกเกิดการรวมตัวกัน โปรตีนที่ถูกคลายออกสามารถสัมผัสพื้นผิวที่ไม่มีขั้ว ก่อให้เกิดการรวมตัวและตกตะกอน

#### 1.4.3 ไอออนโครมาโทกราฟี (Ion chromatography)

ไอออนโครมาโทกราฟีเป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารในรูปไอออน โดยอาศัยหลักการแลกเปลี่ยนประจุภายในคอลัมน์ (Ion exchange) การวัดประกอบด้วยวิธีการฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในตัวชะสาร (eluent) ผ่านการแลกเปลี่ยนประจุภายในคอลัมน์ (ion exchange column) ตามด้วยอุปกรณ์สำหรับแยกชนิดประจุ (suppressor) และอุปกรณ์ตรวจวัดสัญญาณ (detector) ดังรูป 1.6 สำหรับการวิเคราะห์ไอออนลบ (anion) เช่น ซัลเฟต, ไนเตรต, โบรไมด์, คลอไรด์ และซิลิเฟต ซึ่งการแลกเปลี่ยนประจุภายในคอลัมน์จะชะลอการไหลของสารตัวอย่างในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งเครื่องไอออนโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นรุ่น™ Dionex™ Integri™on™ HPICT™ ยี่ห้อ Thermo Scientific ดังรูป 1.7



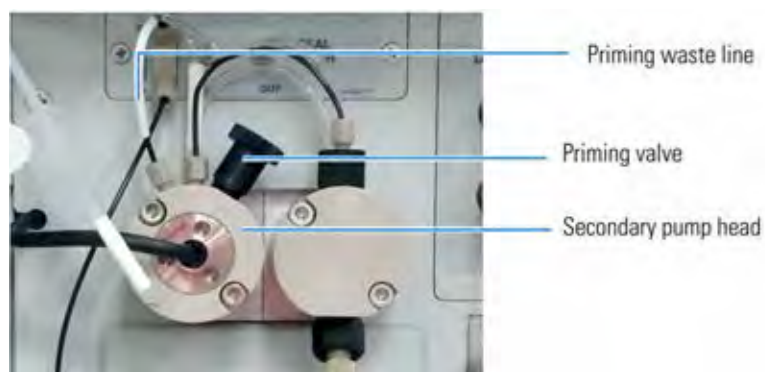
รูปที่ 1.6 ส่วนประกอบของเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี [20]



รูปที่ 1.7 เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี รุ่น TM Dionex™ Integrion™ HPICTM [21]

### 1.4.3.1 ปั๊ม (Pump)

ปั๊ม (Pump) ชนิด serial dual-piston pump with electronic เป็นส่วนประกอบสำคัญของเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี ดังรูป 1.8 โดยมีการไหลของตัวชะคองที่ผ่านหัวฉีด, คอลัมน์ และตัวตรวจวัด ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนสัดส่วนของเฟสที่เคลื่อนที่ได้ตามความเหมาะสม ความสามารถในการผสมนี้เพิ่มความเร็วในกระบวนการเลือกส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุดที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์แบบไอโซครติก (isocratic) มีชุดที่สามารถเก็บเฟสที่เคลื่อนที่ได้หลายชนิด ที่สามารถใช้แบบเดี่ยวหรือแบบผสมได้ เรียกว่า การไล่ระดับการชะ (gradient elution)



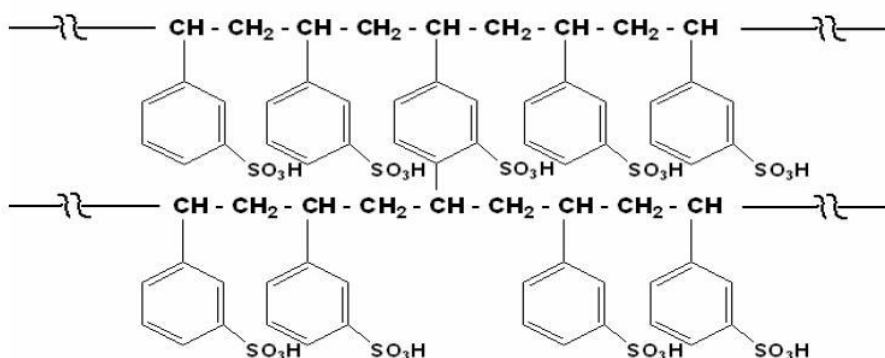
รูปที่ 1.8 ส่วนประกอบของปั๊ม [21]

### 1.4.3.2 คอลัมน์แยก (separation column)

เมื่อสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เป็นแคตไอออน เฟสคองที่ต้องเป็น ชนิดแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchanger) สารตัวอย่างเป็นแอนไอออน เฟสคองกับที่ต้องเป็น ชนิดแลกเปลี่ยนแอนไอออน (anion exchanger) โดยมีหมู่ฟังก์ชันนอล ที่ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนไอออน

#### 1.4.3.2.1 เฟสคองที่ชนิดแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchanger)

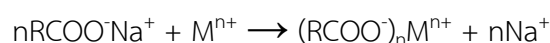
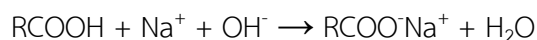
เฟสคองที่ชนิดแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchanger) เป็นโพลีเมอร์เรซินที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีองค์ประกอบ ได้แก่ หมู่  $-SO_3H$  ดังรูป 1.9



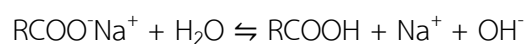
รูปที่ 1.9 เรซินเฟสคงที่ชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออน [22]

เรซินมีหมู่ฟังก์ชัน  $-SO_3H$  ที่ได้มีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนโปรตอนกับแคทไอออนอื่น ๆ ได้ดี จัดเป็นชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออนที่แข็งแรง (strong cation exchangers) นอกจากนี้ยังมีเฟสคงที่ชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออนที่แตกต่างกันที่หมู่ฟังก์ชันอลที่มีฤทธิ์เป็นกรด ทำปฏิกิริยาเคมีแบบแทนที่ระหว่าง หมู่ฟังก์ชันอลอื่น ๆ ได้แก่ กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid,  $-COOH$ ), กรดฟอสโฟนิก (phosphonic acid,  $-PO_2H_2$ ), กรดฟอสฟินิก (phosphinic acid,  $-HPO_2H_2$ ), กรดฟีนอลิก (phenolic,  $-OH$ ) และ กรดอาร์โซนิก (arsonic acid,  $-AsO_3H_2$ ) เป็นต้น

เฟสคงที่ชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออนที่ได้จากกรดข้างต้นจะมีความแรงน้อยกว่าหมู่  $-SO_3H$  จัดเป็นชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออนที่อ่อน (weak cation exchangers) โดยความแรงของหมู่กรดแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับค่าคงที่ของการแตกตัวของกรดนั้น ๆ และ pH ของโปรตอน



เนื่องจากเรซินที่อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมมีลักษณะเป็นเกลือของกรดอ่อนที่สามารถเกิดไฮโดรไลซิสได้ ดังนั้น ถ้าใช้น้ำกลั่นล้างเรซินจะทำให้เรซินเกิดไฮโดรไลซิสกลับมาอยู่ในรูปของกรดอ่อนที่มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนแคทไอออนต่ำ



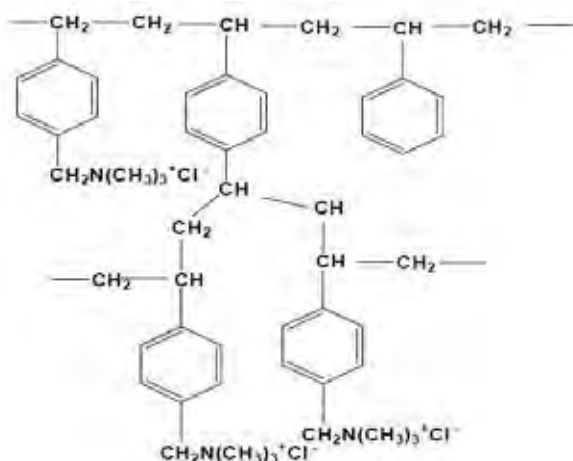
(R แทนด้วยโพลีเมอร์ของเรซิน)

แสดงว่า ถ้าต้องการให้ชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออนแบบอ่อนสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนแคทไอออนได้ดีควรทำในสารละลายที่เป็นเบส หรือทำให้เรซินอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม จะเห็นได้ว่า เรซินชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออนมีไอออนเข้าคู่ได้ 2 รูป คือที่อยู่ในรูปของ  $H^+$  (hydrogen form) และในรูปของ  $Na^+$  (sodium form)

#### 1.4.3.2.1 เฟสคิงที่ชนิดแลกเปลี่ยนแอนไอออน (anion exchanger)

เฟสคิงที่ชนิดแลกเปลี่ยนแอนไอออน (anion exchanger) จะมีหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุบวก ได้แก่ quaternary amine group ( $-CH_2N(CH_3)_3^+$ ) เรซินที่เตรียมได้จะมีฤทธิ์เป็นเบสแก่ เรียกว่า ชนิดแลกเปลี่ยนแอนไอออนชนิดแก่ (strong anion exchangers) จะมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนได้ดี ถ้ากลุ่มของเบสเป็น tertiary และ secondary amine ( $-CH_2NH(CH_3)_2^+$ ,  $-CH_2NH_2(CH_3)^+$ ) ความแรงของเบสจะลดน้อยลงตามลำดับ จัดเป็นเรซินที่มีความแรงขนาดกลาง (moderately basic anion exchangers) แต่ถ้ากลุ่มของเบส คือ อะมีน ( $-NH_2$ ) จะมีความเป็นเบสต่ำมาก จัดเป็นเรซินชนิดอ่อน (weak anion exchangers)

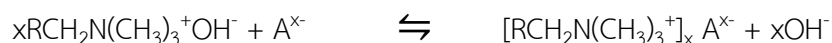
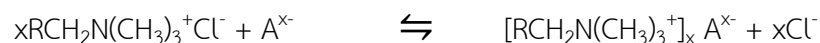
โครงสร้างเรซินที่เตรียมได้มีลักษณะดังแสดงในรูป 1.10



รูปที่ 1.10 เรซินเฟสคิงที่ชนิดแลกเปลี่ยนแอนไอออน [22]

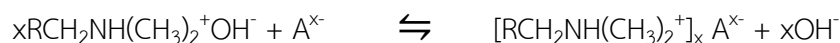
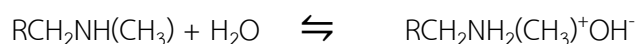
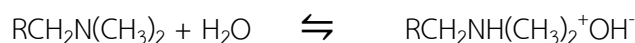
เฟสคิงที่ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนที่มีความแรงสูง สามารถแลกเปลี่ยนไอออนกับแอนไอออนต่าง ๆ ได้ดีโดยไม่ขึ้นกับ pH ของสารละลาย



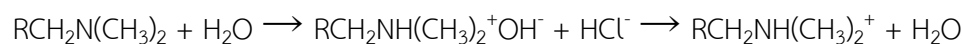


$\text{A}^{x-}$  คือ คู่แอนไอออนต่าง ๆ เช่น  $\text{OH}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$

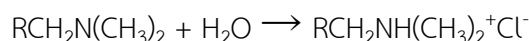
เฟสคงที่ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบที่มีความแข็งแรงปานกลาง เมื่ออยู่ในสารละลายของน้ำจะเกิดการแตกตัวได้  $\text{OH}^-$  ที่สามารถแลกเปลี่ยนกับแอนไอออนตัวอื่นได้



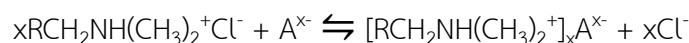
การแตกตัวของเรซินเพื่อให้  $\text{OH}^-$  สำหรับแลกเปลี่ยนไอออนกันนั้นขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลาย สารละลายที่ pH สูง หรือเป็นเบส จะทำให้เรซินแตกตัวได้น้อย ความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนมีค่าน้อย ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรดจะทำให้เรซินแตกตัวได้  $\text{OH}^-$  ได้ดี และได้เรซินที่อยู่ในรูปของเกลือที่มีการแตกตัวได้ดี



รวม 2 ปฏิกิริยานี้สามารถเขียนได้ ดังนี้

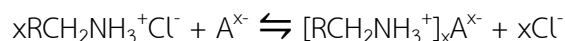
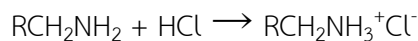


เรซินที่อยู่ในรูปของเกลือคลอไรด์สามารถแลกเปลี่ยนแอนไอออนได้ดีเช่นเดียวกับเรซินชนิดแก่



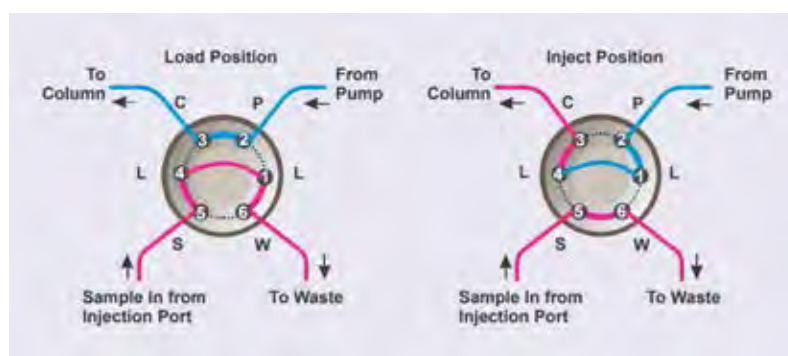
นั่นคือ ถ้าต้องการให้แอนไอออนเรซินชนิดอ่อนปานกลางสามารถแลกเปลี่ยนแอนไอออนได้ดี ควรทำในสารละลายที่เป็นกรดหรือ pH ต่ำ ๆ เพื่อเปลี่ยนเรซินให้อยู่ในรูปของคลอไรด์ที่สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนได้ดี จะเห็นได้ว่าลักษณะของเรซินที่นำมาใช้ในการแลกเปลี่ยนไอออนมีได้ 2 รูป คือ  $\text{OH}^-$  (hydroxide form) และอยู่ในรูปของคลอไรด์  $\text{Cl}^-$  (chloride form)

สำหรับเฟสคงที่ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบความแข็งแรงอ่อน จะอยู่ในรูปของเบสอิสระ ( $\text{RCH}_2\text{NH}_2$ ) เมื่อต้องการนำมาใช้งานต้องนำมาทำปฏิกิริยากับกรดเกลือ เพื่อให้อยู่ในรูปของคลอไรด์ จากนั้นจึงนำไปแลกเปลี่ยนกับแอนไอออนอื่น ๆ



### 1.4.3.3 การฉีดสารตัวอย่าง (sample injector)

ตัวอย่างของเหลวจะถูกฉีดเข้าสู่ระบบโดยผู้ใช้หรืออัตโนมัติผ่านวาล์ว ดังรูป 1.11 เมื่อทำการฉีดตัวอย่างเข้าไปในกระแสน้ำของตัวชะ ป้อนจะดันตัวชะและตัวอย่างคอลัมน์ป้องกัน (Guard Column) และคอลัมน์สำหรับแยกแอนไอออน (separator column) โดยคอลัมน์ป้องกันจะกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อาจเป็นพิษ



รูปที่ 1.11 แผนผังการไหลของวาล์วสำหรับการฉีด [21]

### 1.4.3.4 การแยก (separator)

ตัวชะและตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แยกไอออน โดยตัวอย่างจะถูกแยกออกผ่านโหมดของการแยก เรียกว่า การแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับเคลื่อนที่ที่ต่างกันของตัวอย่างผ่านคอลัมน์ IC ในอัตราที่ต่างกันขึ้นกับอันตรกิริยากับบริเวณแลกเปลี่ยนไอออน

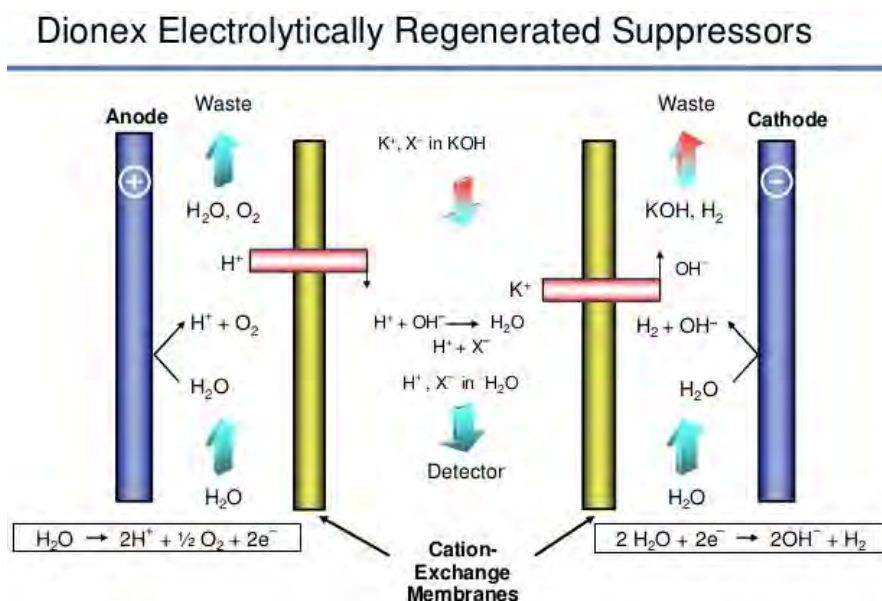
### 1.4.3.5 อุปกรณ์ช่วยขยายสัญญาณการตรวจวัดและลดสัญญาณรบกวน (Suppressor column)

อุปกรณ์ช่วยขยายสัญญาณการตรวจวัดและลดสัญญาณรบกวน ดังรูป 1.12 มีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์ไอออนที่มีประจุลบ และกรดอินทรีย์ สำหรับการตรวจวัดด้วยอิเล็กโทรดคอนดักติวิตีเท่านั้น โดยการใช้การแลกเปลี่ยนไอออนและการนำไฟฟ้าในการตรวจวัด หลังจากตัวชะและไอออนสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ จะไหลผ่านอุปกรณ์ช่วยขยายสัญญาณการตรวจวัดและลดสัญญาณรบกวน โดยจะเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนสารตัวอย่าง ในขณะที่ลดศักย์ไฟฟ้าของตัวชะลง ทั้งนี้ภายในตัวช่วยขยายสัญญาณการตรวจวัดสารตัวอย่างและลดสัญญาณรบกวนจะมีวฏภาคหยุดนิ่งเป็นเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนที่ผิวภายนอกมีประจุแตกต่างกับผิวภายนอกของคอลัมน์แยก เช่น เฟสแลกเปลี่ยนไอออน

ชนิดแรง ที่อยู่ในรูปของ  $H^+$  จะเกิดการแลกเปลี่ยนกับไอออนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ในรูปของเกลือ ได้ เป็นกรด ทำให้เกิดการนำไฟฟ้าสูงขึ้น ส่วนตัวชะ เช่น KOH จะสามารถแลกเปลี่ยนไอออนกับเมมเบรนได้ เช่นกัน ทำให้เกิดน้ำขึ้นแทน ทำให้ค่าคอนดักติวิตีของน้ำลดลง ค่าการนำไฟฟ้าของตัวอีลูทจึงไม่รบกวนค่า การนำไฟฟ้าที่วัดได้ ดังรูป 1.13



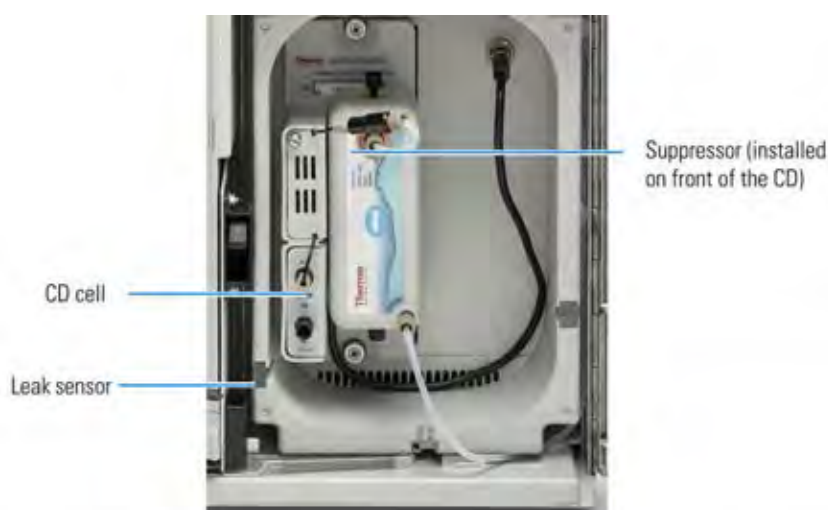
รูปที่ 1.12 อุปกรณ์ช่วยขยายสัญญาณการตรวจวัดและลดสัญญาณรบกวนของเครื่องไอออนโคร มาโทกราฟี [20]



รูปที่ 1.13 กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนของตัวช่วยขยายสัญญาณการตรวจวัดและลดสัญญาณ รบกวนของเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี [20]

#### 1.4.3.6 ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector)

เซลล์วัดค่าศักย์ไฟฟ้าของสารตัวอย่าง ตรวจวัดสารละลายที่ได้จากการชะด้วย electrical conductivity detector ดังรูป 1.14 การตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าเป็นวิธีที่เหมาะสมในการทำไอออนเอ็กซ์เซนจ์โครมาโทกราฟี เนื่องจากไอออนทุกตัวสามารถละลายน้ำได้ โดยค่าการนำไฟฟ้าจะแปรผันตรงกับปริมาณของไอออนในสารตัวอย่าง และระยะเวลาที่ใช้ในการชะสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ จะขึ้นกับสมบัติทางเคมีหรือทางกายภาพของสารที่ต้องการวิเคราะห์



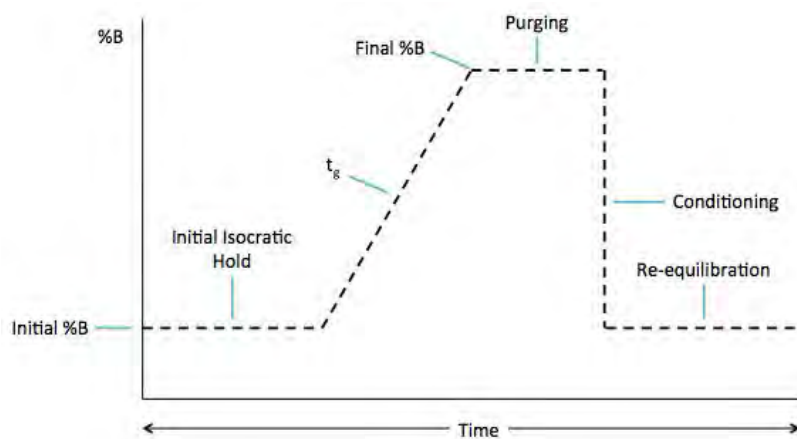
รูปที่ 1.14 electrical conductivity detector [21]

#### 1.4.3.7 การชะสารออกจากคอลัมน์ (Elution)

การใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการชะสารออกจากคอลัมน์พบได้ 2 ลักษณะ ได้แก่

**1.4.3.7.1 Isocratic elution** เป็นการใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คงที่ตลอดทั้งรอบการวิเคราะห์ อาจใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันได้ แต่สัดส่วนคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดการวิเคราะห์ เหมาะกับการวิเคราะห์สารเพียงชนิดเดียว หรือสารผสมก็ได้

**1.4.3.7.1 Gradient elution** ดังรูป 1.15 เป็นการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในระหว่างการวิเคราะห์ ซึ่งต้องใช้ชนิดของเฟสเคลื่อนที่อย่างน้อย 2 ชนิด เหมาะกับตัวอย่างที่เป็นสารผสม



รูปที่ 1.15 Gradient elution profile [23]

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับนำไปใช้ในการตรวจวัดไอโอดีนด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟีได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ

## บทที่ 2

### การทดลอง

#### 2.1 อุปกรณ์

1. เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี (Dionex Integrion HPLC System)
2. ขวดวัดปริมาตรขนาด 10, 25, 50, 100, 250 mL (class A, witeg, Germany)
3. ปิเปตและ ปิเปตทิปขนาด 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L, 10 mL (Eppendorf, Germany)
4. เครื่องแก้ว ได้แก่ ปิกเกอร์, แท่งแก้วคน
5. อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (Elma Elmasonic S100H, Germany)
6. เครื่องชั่งสาร (METTLER TOLEDO, Switzerland)
7. กระบอกฉีดสารขนาด 5 mL (BD, Singapore)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Hettich, Germany)
9. ขวดพลาสติก 10 mL
10. เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (IKA, Germany)
11. เครื่องตีไข่ไฟฟ้าแบบมือถือ (DMALL, N180)
12. เครื่องเขย่าสาร (Scientific Industries, USA)

#### 2.2 สารเคมี

1. โปแทสเซียมไอโอไดด์ (CARLO ERBA, France)
2. โปแทสเซียมไอโอเดต (CARLO ERBA, France)
3. เมทานอล (RCI Labscan Limited, Thailand)
4. อะซิโตนไทรล์ (RCI Labscan Limited, Thailand)
5. กรดฟอร์มิก 85 เปอร์เซ็นต์ (QReC, New Zealand)
6. น้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q water)

## 2.3 วิธีการทดลอง

### 2.3.1 การเตรียมสารละลายต่าง ๆ

#### 2.3.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไอโอดีน

เตรียมสารละลายไอโอดีนเข้มข้นที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการละลายโพแทสเซียมไอโอดีน 0.0327 กรัม ด้วยน้ำบริสุทธิ์ และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

#### 2.3.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไอโอดีต

เตรียมสารละลายไอโอดีตเข้มข้นที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการละลายโพแทสเซียมไอโอดีต 0.0306 กรัม ด้วยน้ำบริสุทธิ์ และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

### 2.3.2 การวิเคราะห์สารละลายไอโอดีนด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี

เพื่อวิเคราะห์การแยกออกของพีคไอโอดีนและไอโอดีต โดยใช้การตรวจวัดด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี โดยพิจารณาภาวะในการวิเคราะห์ได้อ้างอิงตามงานวิจัยต่าง ๆ ที่ผ่านมา [14, 23] และนำมาปรับใช้ให้เหมาะสมกับวิธีการทดลองนี้ แสดงดังตาราง 2.1

ตารางที่ 2.1 สภาวะในการวิเคราะห์สารไอโอดีนและไอโอดेटด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี

| พารามิเตอร์                                   | สภาวะ                                   |
|---|---|
| คอลัมน์                                       | Dionex IonPac™AG 19 ขนาด 4x50 มิลลิเมตร |
| เฟสเคลื่อนที่ Gradient, โพลแทสเซียมไฮดรอกไซด์ | 10 มิลลิโมลาร์ (0 – 5 นาที)             |
| ไอโซต์  | 20 มิลลิโมลาร์ (5 – 50 นาที)            |
| อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่                   | 1 มิลลิลิตรต่อนาที                      |
| eluent generator setpoint                     | 38 มิลลิโมลาร์                          |
| suppressor setpoint                           | 95 มิลลิแอมป์                           |
| inject volume                                 | 25 ไมโครลิตร                            |
| โปรแกรม                                       | Chromeleon 7 chromatography data system |
| ตัวตรวจวัด                                    | conductivity detector                   |
| เวลาที่ใช้ในการตรวจวัด                        | 25 นาที                                 |

### 2.3.3 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

#### 2.3.3.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

เตรียมตัวอย่างไข่ไก่โดยการตีให้เข้ากัน ซึ่งปริมาตรไข่ไก่ใส่ในหลอดเอพเพนดอร์ฟ 0.5 กรัม เติมตัวทำละลายอินทรีย์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในไข่สด นำไปออร์เทกซ์ให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ที่ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พิจารณาลักษณะทางกายภาพ จากนั้นทำการดูของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) นำไประเหยแห้งโดยใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 100 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนเพื่อทำการละลาย กรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ ไนลอน รูพรุน 0.45 ไมครอน ลงในขวดพลาสติก ปรับปริมาตรจนกระทั่งได้สารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดปริมาณไอโอดีนและไอโอดेटโดยใช้เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี

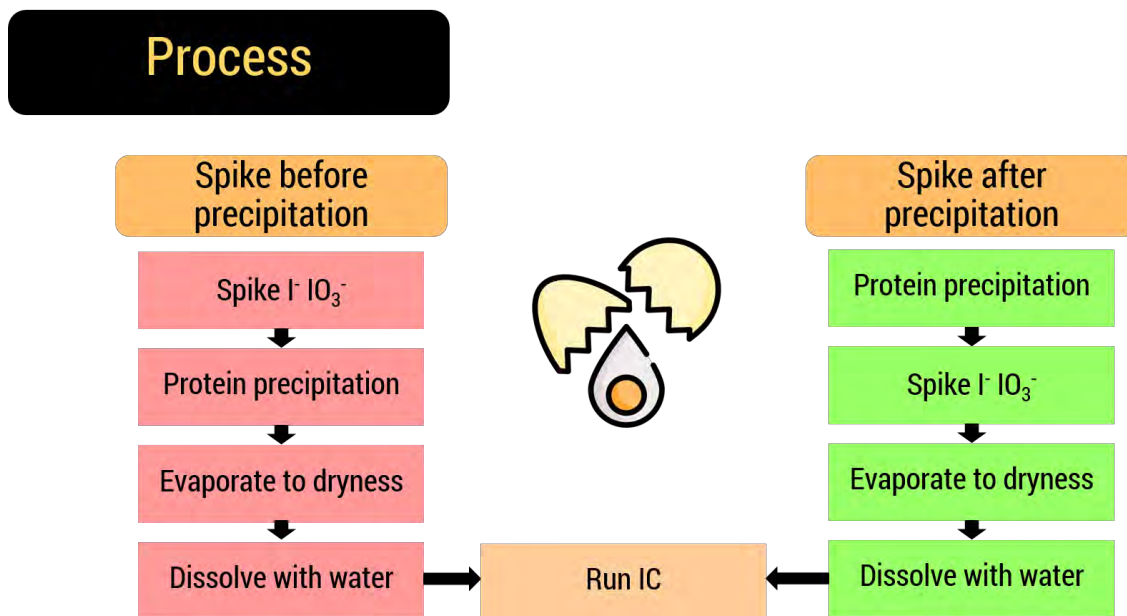


### 2.3.3.2 ศึกษาลักษณะทางกายภาพการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ เมทานอล และ อะซิโตนไไตรล์ และจากงานวิจัยก่อนหน้า [17] พบว่ามีการนำกรดอ่อนมาช่วยในการตกตะกอนโปรตีนร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ ผู้วิจัยสนใจศึกษากรดฟอร์มิก เนื่องจากกรดฟอร์มิกจะทำลายพันธะเปปไทด์ ช่วยให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง เพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวทำละลาย ทำให้ตกตะกอนโปรตีนได้ดีขึ้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นจึงทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของกรดฟอร์มิกที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นสารละลายกรดฟอร์มิก 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 ในเมทานอลและเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นสารละลายกรดฟอร์มิก 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 ในอะซิโตนไไตรล์

### 2.3.3.3 ศึกษาประสิทธิภาพของการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ

ประสิทธิภาพของวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ โดยศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างโดยการเติมและไม่เติมสารละลายไอโอไดด์และไอโอเดตทำการเติมไอโอไดด์และไอโอเดตที่ 2 ขั้นตอน ได้แก่ เติวก่อนตกตะกอนโปรตีน และ เติมห้ตกตะกอนโปรตีน เพื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างไม่เติมสารละลายมาตรฐานไอโอไดด์และไอโอเดต, เติมสารละลายมาตรฐานไอโอไดด์และไอโอเดตก่อนทำการตกตะกอนโปรตีน และเติมสารละลายมาตรฐานไอโอไดด์และไอโอเดตหลังทำการตกตะกอนโปรตีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำปราศจากไอออน ดังรูป 2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตกตะกอนโปรตีนโดยการศึกษา เปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับจากสารละลายไอโอไดด์และไอโอเดต เปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับจากตัวอย่างไข่ไก่โดยการเติมและไม่เติมสารละลายไอโอไดด์และไอโอเดต และศึกษาผลของเมทริกซ์ไข่ต่อการหาปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตโดยการหาเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับจากตัวอย่างไข่ที่เติมสารละลายไอโอไดด์และไอโอเดตก่อนตกตะกอนโปรตีนและหลังตกตะกอนโปรตีน



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการศึกษาผลของเมทริกซ์ต่อการหาปริมาณไอโอไดต์และไอโอเดต

#### 2.3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

##### 2.3.4.1 กราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve)

กราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) เป็นวิธีในการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ กราฟมาตรฐานเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของเครื่องมือ (response) กับปริมาณของสารที่ต้องการตรวจวัด โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน (working standard solution) ไอโอไดต์และไอโอเดต ที่ความเข้มข้น 0.05 ถึง 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำปราศจากไอออน และความเข้มข้น 1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำปราศจากไอออน ตรวจวัดด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี พิจารณาค่าพื้นที่ใต้พีค

##### 2.3.4.2 ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection; LOD)

ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection; LOD หรือ detection limit; DL) คือ ระดับความเข้มข้นของสารที่สนใจที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีนั้น ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด การตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบ ทำได้หลายกรณี ดังนี้

1. กรณีแปลงค่าอ่านค่าได้ สามารถคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัด ดังนี้

$$\text{LOD} = \bar{X}_{bl} + 3S_{bl}$$

โดยที่  $\bar{X}_{bl}$  = ค่าเฉลี่ยของแปลงค์

$3S_{bl}$  = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแปลงค์

2. กรณีแปลงค่าอ่านค่าไม่ได้ ให้ทดสอบ spiked sample blank โดยการเติมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงค่าขีดจำกัดการตรวจวัด คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยไม่ต้องหาค่าเฉลี่ย เนื่องจากเป็นสารมาตรฐานที่เติมลงไป และคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด ดังนี้

$$\text{LOD} = 3S$$

3. ทดสอบ spiked sample blank ที่ความเข้มข้นน้อย ๆ หลายระดับ อย่างน้อย 3 ระดับ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น เขียนกราฟระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน กับความเข้มข้นเฉลี่ยแต่ละจุด ลากเส้นตัดแกน y จุดตัด คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแปลงค์ ( $S_0$ ) การสร้างกราฟต้องตรวจสอบความเป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด ดังนี้

$$\text{LOD} = 3S_0$$

### 2.3.4.3 ความถูกต้อง (accuracy)

ความถูกต้อง (accuracy) คือ ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดได้ใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการวิเคราะห์เป็นค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ซึ่งเป็นการหาค่าประมาณความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ โดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

$$\% \text{recovery} = \frac{C_{\text{found}} - C_{\text{real}}}{C_{\text{spiked}}} \times 100$$

โดย  $C_{\text{found}}$  = ความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่างจริงหลังการสกัดที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

$C_{\text{real}}$  = ความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่างจริงที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐาน

$C_{\text{spiked}}$  = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างจริง

ซึ่งค่าความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่างจริงหลังการสกัดที่มีการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น และ ความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่างจริงที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐาน ต้องคำนวณจากสมการเส้นตรงของสารที่สนใจ

#### 2.3.4.4 ความเที่ยง (precision)

ความเที่ยง (precision) คือ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ของการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ หลายครั้ง ซึ่งความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ นี้มักจะแสดงเป็นค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ซึ่งในการวิเคราะห์นี้เป็นการวิเคราะห์ในลักษณะความสามารถในการทบทวนซ้ำ (repeatability) คือ ความเที่ยงที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ภายใต้สภาพการทำงานเดียวกัน โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน โดยปกติจะวิเคราะห์เสร็จพร้อม ๆ กัน ซ้ำกันหลายๆครั้ง โดยระดับความแม่นยำขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์

#### 2.3.4.5 เปอร์เซ็นต์ค่าคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (% relative error)

ผลต่างระหว่างค่าที่วัดได้กับค่าที่แท้จริง โดยทั่วไปแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ถ้าค่าที่วัดได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากแสดงว่าการวัดนั้นมีความแม่นยำหรือความถูกต้อง (accuracy) สูง โดยการวัดทุกครั้งมักมีค่าความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ การเข้าใจถึงสาเหตุจะช่วยลดความคลาดเคลื่อนให้น้อยลงได้ โดยความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดความไม่แน่นอน (uncertainty)

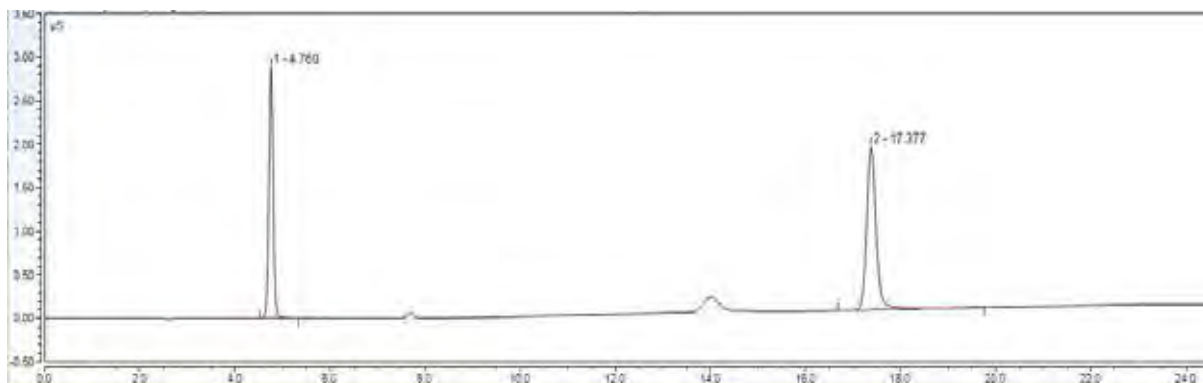
$$\% \text{relative error} = \frac{C_{\text{real}} - C_{\text{found}}}{C_{\text{real}}} \times 100$$

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

##### 3.1 การวิเคราะห์ไอโอดีและไอโอเดตไอออนด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี

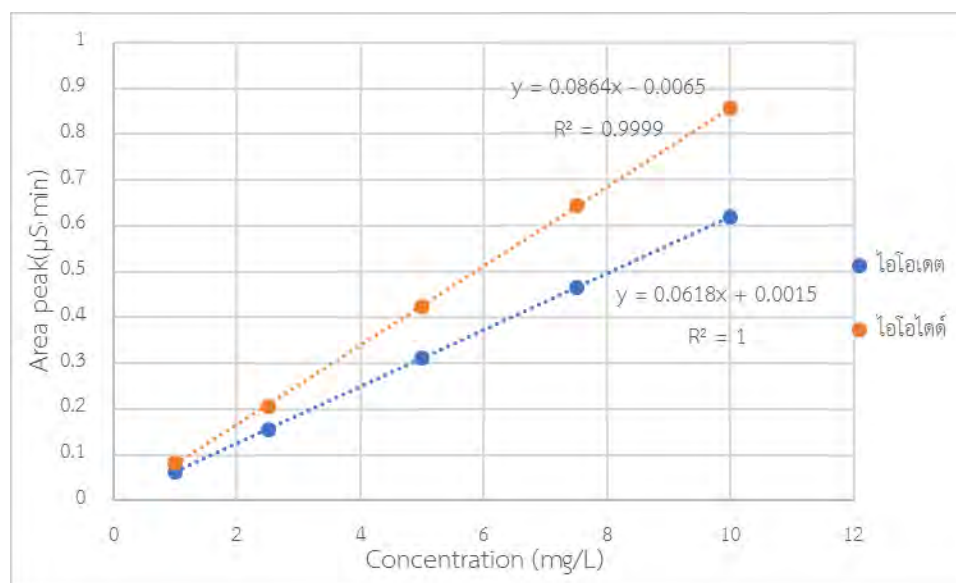
จากการวิเคราะห์ไอโอดีและไอโอเดตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำปราศจากไอออน โดยใช้เวลาวิเคราะห์ 25 นาที ได้โครมาโทแกรมดังรูป 3.1 พบว่า เวลาที่ไอโอเดตเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ เท่ากับ 4.760 นาที และ เวลาที่ไอโอดีเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ เท่ากับ 17.377 นาที



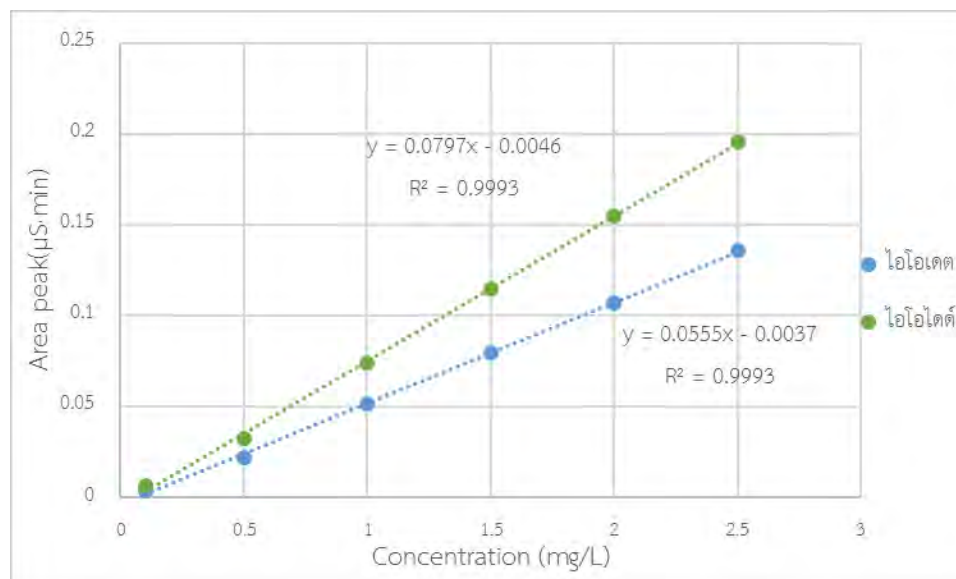
รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไอโอดี และ ไอโอเดต ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากสมการเส้นตรงที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณของไอโอดีและไอโอเดตที่ความเข้มข้น 1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากรูป 3.2 พบว่าเมื่อทำการพล็อตระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโอดี มีหน่วยเป็นไมโครซีเมนต์ นาที ( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) กับความเข้มข้นของไอโอดี มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร ได้สมการเส้นตรง  $y = 0.0864X - 0.0065$  และให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $R^2$ ) เท่ากับ 0.9999 และเมื่อทำการพล็อตระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโอเดต มีหน่วยเป็นไมโครซีเมนต์ นาที ( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) กับความเข้มข้นของไอโอเดต มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร ได้สมการเส้นตรง  $y = 0.0618X + 0.0015$  และให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $R^2$ ) เท่ากับ 1.000 จากรูป 3.3 ได้สมการเส้นตรง  $y = 0.0555X - 0.0037$  และให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $R^2$ ) เท่ากับ 0.9993 มีขีดจำกัดของการ

ตรวจวัดที่ 0.1344 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อทำการพล็อตระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโอไดด์ มีหน่วยเป็น ไมโครซีเมนต์ นาที ( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) กับความเข้มข้นของไอโอไดด์ มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร ได้สมการเส้นตรง  $y = 0.0797X - 0.0046$  และให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $R^2$ ) เท่ากับ 0.9993 ขีดจำกัดของการตรวจวัดที่ 0.2233 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานสมการเส้นตรงของไอโอไดด์และไอโอเดตที่ความเข้มข้น 1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐานสมการเส้นตรงของไอโอโตคและไอโอเดคที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 3.2 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอร์มิก และประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำปราศจากไอออน และทำการทำลอง 3 ซ้ำ

#### 3.2.1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

##### 3.2.1.1 กรดไตรคลอโรแอสติก

ในงานวิจัยก่อนหน้า [15] ได้ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอสติกซึ่งให้ผลที่ดีมีความน่าเชื่อถือ แต่เมื่อนำมาตรวจวัดด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี พบว่าพีคของกรดไตรคลอโรแอสติกมีการซ้อนทับซึ่งรบกวนการวิเคราะห์พีคของไอโอเดค ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาตัวทำละลายชนิดอื่นเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี

##### 3.2.1.2 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

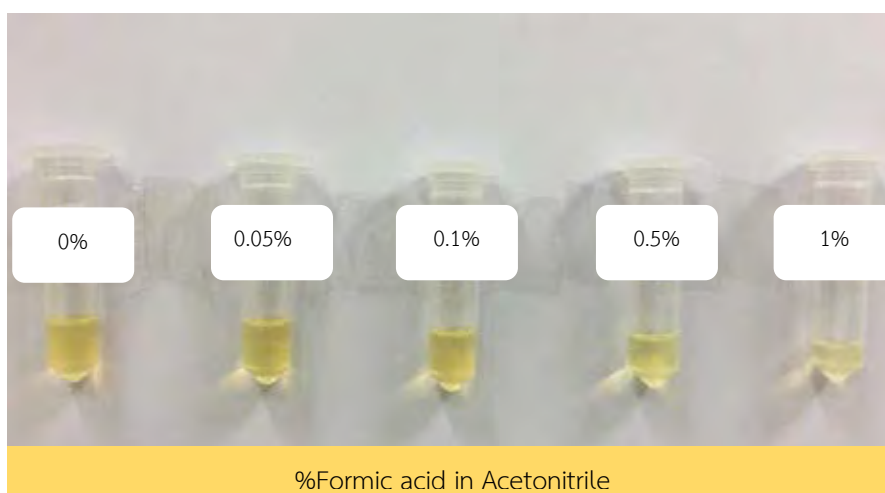
ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอลและอะซิโตนไตรลถูกนำมาใช้เพื่อตกตะกอนโปรตีนเนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ โดยตัวละลายอินทรีย์เหล่านี้จะลดค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของน้ำ ส่งผลให้อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำลดลงและอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนจะเพิ่มขึ้น เกิดการตกตะกอนของ

โปรตีน และไม่มีผลของพีคบริเวณสารที่ต้องการวิเคราะห์เมื่อใช้เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เมทานอลและอะซิโตไนไตรล์มาใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

### 3.2.2 เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอร์มิก

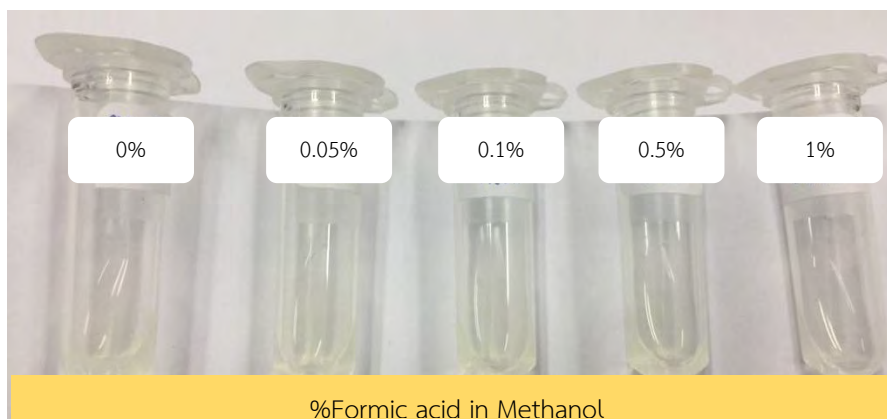
จากลักษณะทางกายภาพ ผลลัพธ์แสดงในรูป 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ เมื่อตกตะกอนด้วยอะซิโตไนไตรล์ได้สารละลายใสสีเหลือง และเมทานอลได้สารละลายใสไม่มีสี แต่สารละลายที่ได้ยังมีความขุ่น ไม่เหมาะที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี จากงานวิจัยก่อนหน้า [17] สารละลายกรดฟอร์มิกถูกนำมาใช้ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีน ทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง ได้สารละลายใสที่เหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอร์มิก ในเมทานอล และ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอร์มิก ในอะซิโตไนไตรล์ ที่เปอร์เซ็นต์แตกต่างกัน ดังนี้ 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นสารละลายกรดฟอร์มิก ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ตกตะกอนโปรตีนในไขไก่คือ 1% กรดฟอร์มิก ในอะซิโตไนไตรล์ และ เมทานอล เนื่องจากของเหลวเหนือตะกอนมีความใสมากที่สุด ทำให้สารตัวอย่างอยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีที่ว่ากรดฟอร์มิกที่เติมลงไปจะทำลายพันธะเปปไทด์ ช่วยให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง เพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวทำละลาย ทำให้ตกตะกอนโปรตีนได้ดีขึ้น



รูปที่ 3.4 ลักษณะทางกายภาพเมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในไขไก่ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นสารละลายกรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ต่าง ๆ





รูปที่ 3.5 ลักษณะทางกายภาพเมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในไข่ไก่ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นสารละลายกรดฟอร์มิกในเมทานอลต่าง ๆ

### 3.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับ

ในการศึกษาตัวอย่างไข่ไก่หลังทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิโตนไตรีล และ ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล จากนั้นนำมาตรวจวัดไอโอดีนโดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี วิธีการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้สามารถกำจัดเมทริกซ์ในไข่ไก่ออกไปจนได้สารละลายใสที่สามารถนำไปตรวจวัดโดยใช้เครื่องไอออนโครมาโทกราฟีได้ และศึกษาผลของเมทริกซ์โดยการประเมินจากเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับ จากการเปรียบเทียบระหว่างไม่เติมสารละลายมาตรฐานไอโอดีนและไอโอเดต, เติมสารละลายมาตรฐานไอโอดีนและไอโอเดตก่อนทำการตกตะกอนโปรตีน และ เติมสารละลายมาตรฐานไอโอดีนและไอโอเดตหลังทำการตกตะกอนโปรตีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำปราศจากไอออน

#### 3.2.3.1 ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับในเมทริกซ์น้ำ

จากการศึกษาผลของเมทริกซ์โดยใช้น้ำ ดังตารางที่ 3.1 และ 3.2 พบว่า ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของไอโอดีนและไอโอเดตอยู่ในช่วง 82 ถึง 102 แสดงว่าวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิโตนไตรีล และ ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอลสามารถใช้ได้ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไอโอดีนและไอโอเดตที่ตรวจวัดได้ พบว่า เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของไอโอเดตหายไปอย่างมีนัยสำคัญ และในการทดลองทำการเติมทั้งไอโอดีนและไอโอเดตลงไปพร้อมกัน อีกทั้งการเติมกรดลงไปในปฏิกิริยาทำให้เกิดการออกซิไดซ์ไอโอดีนและไอโอเดตเป็นไอโอดีน

สอดคล้องกับปฏิกิริยา ดังสมการ  $\text{IO}_3^- + 5\text{I}^- + 6\text{H}^+ \rightarrow 3\text{I}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$  ไอโอดेट์และไอโอดอิดอาจเกิดปฏิกิริยากับกรดเปลี่ยนไปอยู่ในรูปไอโอดีนจึงทำให้ไม่สามารถตรวจวัดด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟีได้

**ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอดेट์และไอโอดอิดในเมทริกซ์น้ำ**

| ตัวทำละลาย | Spiked (ppm) | วิธีตกตะกอนโปรตีน           | ความเข้มข้นของสารละลาย iodide |           | ความเข้มข้นของสารละลาย iodate |           |
|------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|
|            |              |                             | (ppm)                         | %recovery | (ppm)                         | %recovery |
| ACN        | 5.000        | Spiked before precipitation | 5.087                         | 102       | 4.354                         | 87.1      |
|            | 5.000        | Spiked after precipitation  | 5.102                         | 102       | 4.584                         | 91.7      |
| MeOH       | 5.000        | Spiked before precipitation | 4.946                         | 98.9      | 4.095                         | 81.9      |
|            | 5.000        | Spiked after precipitation  | 5.069                         | 101       | 4.307                         | 86.1      |

### 3.2.3.2 เวลาที่ใช้ในการรอร์เท็กซ์

เวลาที่ใช้ในการรอร์เท็กซ์ คือ เวลาที่ใช้ในการผสมตัวทำละลายอินทรีย์และเมทริกซ์ให้เข้ากัน ซึ่งบ่งบอกถึงการทำปฏิกิริยาของเมทริกซ์และตัวทำละลายที่มากขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการรอร์เท็กซ์ที่ 1 และ 5 นาที โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำปราศจากไอออน ซึ่งเมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับที่ได้ พบว่าที่ 5 นาที มีเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับ

ที่มากขึ้น ดังตารางที่ 3.1 อย่างไรก็ตามสามารถเลือกใช้เวลาในการวอร์เท็กซ์ที่ 1 นาทีได้ เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับที่ใกล้เคียงกัน จึงเลือกใช้เวลา 1 นาทีในการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของไอโอดีต์ ในการวอร์เท็กซ์ที่เวลาต่าง ๆ

| สารละลาย | เวลา (นาที) | Spiked (ppm) | ความเข้มข้นสารละลาย (ppm) | %recovery |
|----------|-------------|--------------|---------------------------|-----------|
| ACN      | 1           | 0.3000       | 0.2785                    | 92.8      |
|          | 5           | 0.3000       | 0.2861                    | 95.4      |
| MeOH     | 1           | 0.3000       | 0.2547                    | 84.9      |
|          | 5           | 0.3000       | 0.2698                    | 89.9      |

### 3.2.3.3 ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับในเมทริกซ์ไข่

จากตารางที่ 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ เปรียบเทียบระหว่างการเติมสารละลายมาตรฐานไอโอดีต์และไอโอดีต์ก่อนทำการตกตะกอนโปรตีน และเติมสารละลายมาตรฐานไอโอดีต์และไอโอดีต์หลังทำการตกตะกอนโปรตีน พบว่าปริมาณไอโอดีต์และไอโอดีต์ก่อนการตกตะกอนโปรตีนมีการสูญหาย เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับในเมทริกซ์น้ำ พบว่าอาจเกิดจากผลของเมทริกซ์ไข่ไก่ที่เกิดอันตรกิริยากับไอโอดีต์ ทำให้ความสามารถในการปลดปล่อยไอโอดีต์ลดลงในการเปลี่ยนไอโอดีต์ให้อยู่ในรูปฟรีไอออนที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนระหว่างเมทานอลและอะซิโตนไตรล พบว่า เมทานอลมีเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของไอโอดีต์และไอโอดีต์ที่ดีกว่าอะซิโตนไตรลเล็กน้อย แต่เนื่องจากอะซิโตนไตรลมีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสูงกว่าเมทานอล ส่งผลให้อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำลดลงและอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนเพิ่มขึ้น ทำให้มีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนที่ดีกว่า [23] การปลดปล่อยไอโอดีต์จึงลดลง

ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอดีต

| ตัวทำละลาย | วิธีตกตะกอนโปรตีน    | Spiked (ppm) | ความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีต (ppm) | %recovery |
|------------|----------------------|--------------|-------------------------------------|-----------|
|            | Non-spiked           | -            | 0                                   | -         |
| ACN        | before precipitation | 5.000        | 0                                   | -         |
|            | after precipitation  | 5.000        | 2.036                               | 40.7      |
|            | Non-spiked           | -            | 0                                   | -         |
| MeOH       | before precipitation | 5.000        | 0                                   | -         |
|            | after precipitation  | 5.000        | 2.519                               | 50.4      |

ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอดีต

| ตัวทำละลาย | วิธีตกตะกอนโปรตีน    | Spiked (ppm) | ความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีต (ppm) | %recovery |
|------------|----------------------|--------------|-------------------------------------|-----------|
|            | Non-spiked           | -            | 0                                   | -         |
| ACN        | before precipitation | 5.000        | 1.915                               | 38.3      |
|            | after precipitation  | 5.000        | 5.445                               | 109       |
|            | Non-spiked           | -            | 0                                   | -         |
| MeOH       | before precipitation | 5.000        | 3.448                               | 68.9      |
|            | after precipitation  | 5.000        | 4.943                               | 98.7      |

### 3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

#### 3.3.1 ความถูกต้องและความเที่ยง

การทดลองกับตัวอย่างจริง คือ ไข่ไก่เสริมไอโอดีต ทำการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตกตะกอนโปรตีนไข่ไก่เพื่อให้อยู่ในรูปสารละลายใสที่สามารถนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องไอออนโครมาโทกราฟีได้ นำไปคำนวณหาปริมาณไอโอดีต ดังตารางที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ พบว่าไข่เสริมไอโอดีต ตัวอย่างที่ 1 เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วย ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิโตนไตรรล์

และ ความเข้มข้นกรดฟอร์มิค 1 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล มีปริมาณไอโอดีนในไข่ 0.4103 ไมโครกรัมต่อฟอง และ 0.4534 ไมโครกรัมต่อฟอง ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์ค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์ -6 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ ไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 2 เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วย ความเข้มข้นกรดฟอร์มิค 1 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิโตนไนไตรล์ และ ความเข้มข้นกรดฟอร์มิค 1 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล มีปริมาณไอโอดีนในไข่ 0.8320 ไมโครกรัมต่อฟอง และ 0.5223 ไมโครกรัมต่อฟอง ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์ค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์ 65 ถึง 78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากค่าที่ได้แสดงให้เห็นว่าวิธีการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เมทานอล และอะซิโตนไนไตรล์เมื่อนำมาใช้หาปริมาณไอโอดีนในตัวอย่างไข่ที่ถูกเสริมไอโอดีนได้ด้วยผลของเมทริกซ์ พบว่ามีความแม่นยำในการวัดต่ำ

**ตารางที่ 3.5 ปริมาณของไอโอดีน ในไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 1 (ไข่เสริมไอโอดีน 24 ไมโครกรัม) และ ในไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 2 (ไข่เสริมไอโอดีน 150 ไมโครกรัม)**

| ตัวอย่าง  | สารละลาย | Iodide ( $\mu\text{g}/$<br>ฟอง) | Average ( $\mu\text{g}/$<br>ฟอง) | %relative<br>error |
|---|----------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| ไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่<br>1<br>(0.4267 $\mu\text{g}/$ ฟอง) | ACN      | 0.4020                          | 0.4103                           | 4                  |
|   |          | 0.4186                          |                                  |                    |
|   | MeOH     | 0.4409                          | 0.4534                           | -6                 |
|   |          | 0.4659                          |                                  |                    |
| ไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่<br>2<br>(2.365 $\mu\text{g}/$ ฟอง)  | ACN      | 0.8110                          | 0.8320                           | 65                 |
|   |          | 0.8335                          |                                  |                    |
|   |          | 0.8515                          |                                  |                    |
|   | MeOH     | 0.5230                          | 0.5223                           | 78                 |
|   |          | 0.5200                          |                                  |                    |
|   |          | 0.5240                          |                                  |                    |

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อพัฒนาวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี เมื่อศึกษาศึกษาลักษณะทางกายภาพการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล และ ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิโตไนไตรล์ มีประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนได้ดีที่สุด จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ พบว่า เมทานอลและอะซิโตไนไตรล์สามารถตกตะกอนโปรตีนในไขไก่ได้เนื่องจากได้สารละลายใส แต่เปอร์เซ็นต์การคืนกลับมีค่าน้อย แสดงให้เห็นว่าเมทริกซ์ในไขไก่มีผลต่อการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ผล วิธีการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เมทานอล และ อะซิโตไนไตรล์อาจไม่ดีพอที่จะสามารถแยกไอโอไดด์และไอโอเดตออกจากโปรตีนได้ทั้งหมด

เมื่อนำเทคนิคการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มาใช้ตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างจริง ได้แก่ ไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 1 และไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 2 พบว่ามีเพียงไอโอไดด์ที่สามารถวัดปริมาณได้ และจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ แสดงปริมาณไอโอไดด์ในไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 1 พบว่าตกตะกอนโปรตีนด้วย ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิโตไนไตรล์ และ ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล มีปริมาณไอโอไดด์ในไข่ 0.4103 ไมโครกรัมต่อฟอง และ 0.4534 ไมโครกรัมต่อฟอง ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์ค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์ -6 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ ไข่เสริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 2 เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วย ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิโตไนไตรล์ และ ความเข้มข้นกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล มีปริมาณไอโอไดด์ในไข่ 0.8320 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 0.5223 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์ค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์ 65 ถึง 78 เปอร์เซ็นต์

### บรรณานุกรม

- [1] De Benoist B et al., eds. Iodine status worldwide. WHO Global Database on Iodine Deficiency. Geneva, World Health Organization, 2004.
- [2] Tulchinsky, T. H. Endemic Goiter and Elimination of Iodine Deficiency Disorders. *Case Studies in Public Health*, 2018, 201-225.
- [3] Opaliński, S. Supplemental Iodine. *Egg Innovations and Strategies for Improvements* 2017, 393-402.
- [4] สมโภชน์ อัมเอบ. ไข่เสริมไอโอดีนโดยเทคนิคการเคลื่อนย้ายไอออน. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ* 2012, 20(2), 289-293.
- [5] Silva, J. S.; Diehl, L. O.; Frohlich, A. C.; Costa, V. C.; Mesko, M. F.; Duarte, F. A.; Flores, E. M. M., Determination of bromine and iodine in edible flours by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion. *Microchemical Journal* 2017, 133, 246-250.
- [6] Devouge-Boyer, C.; Mouda, S.; Gueguen, O.; Marcotte, S., Determination of iodine in polyamide by inductively-coupled plasma/mass spectrometry. *Talanta* 2018, 189, 568-572.
- [7] Das, P.; Gupta, M.; Jain, A.; Verma, K. K., Single drop microextraction or solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of iodine in pharmaceuticals, iodized salt, milk powder and vegetables involving conversion into 4-iodo-N, N-dimethylaniline. *Journal of Chromatography A* 2004, 1023 (1), 33-39.
- [8] Reddy-Noone, K.; Jain, A.; Verma, K. K., Liquid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of bromate, iodate, bromide and iodide in high-chloride matrix. *Journal of Chromatography A* 2007, 1148 (2), 145-151.
- [9] Gavrilenko, N. A.; Fedan, D. A.; Saranchina, N. V.; Gavrilenko, M. A., Solid phase colorimetric determination of iodine in food grade salt using polymethacrylate matrix. *Food Chemistry* 2019, 280, 15-19.

- [10] Andersson, S.; Forsman, U. Determination of total iodine in biological material by alkaline ashing and column-switching ion-pair liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1997**, *692* (1), 53-59.
- [11] Isaac-Olive, K.; Acharya, R.; Chatt, A. Fractionation analysis of iodine in bovine milk by preconcentration neutron activation analysis. *Talanta* **2008**, *77* (2), 827-832.
- [12] Buchberger, W., Determination of iodide and bromide by ion chromatography with post-column reaction detection. *Journal of Chromatography* **1988**, *439* (1), 129-35.
- [13] Chadha, R. K.; Lawrence, J. F., Determination of iodide in dairy products and table salt by ion chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* **1990**, *518*, 268-272.
- [14] Below, H.; Kahlert, H., Determination of iodide in urine by ion-pair chromatography with electrochemical detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371* (4), 431-436.
- [15] Srivorakul, T., Precipitation of proteins as sample preparation for determination of iodine content in egg by Sandell - Kolthoff flow injection method. *Master's Thesis, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University* **2015**.
- [16] Niemann, R. A.; Anderson, D. L., Determination of iodide and thiocyanate in powdered milk and infant formula by on-line enrichment ion chromatography with photodiode array detection. *J Chromatogr A* **2008**, *1200* (2), 193-7.
- [17] Malongo, T. K.; Patris, S.; Macours, P.; Cotton, F.; Nsangu, J.; Kauffmann, J. M., Highly sensitive determination of iodide by ion chromatography with amperometric detection at a silver-based carbon paste electrode. *Talanta* **2008**, *76* (3), 540-7.
- [18] Sunwoo, H. H.; Gujral, N., Chemical Composition of Eggs and Egg Products. *In Handbook of Food Chemistry* **2015**, 331-363.
- [19] Bollag, D.M.; Rozycki, M.D.; Edelman, S.J. Protein Methods. 2nd ed. New York, USA: *Wiley-Liss A John Wiley & Sons, Inc*, **1996**.
- [20] Srinivasan, K., Chapter Nine - Ion Chromatography Instrumentation for Water Analysis. *In Chemistry and Water*, Ahuja, S., Ed. Elsevier: 2017; pp 329-351.



- [21] Yasser, M.; Rania, E., Ion Exchange Chromatography - *An Overview. In Column Chromatography*, **2013**.
- [22] Ghosh, S.; Dhole, K.; Tripathy, M.; Kumar, R.; Sharma, R., FTIR spectroscopy in the characterization of the mixture of nuclear grade cation and anion exchange resins. *Journal of Radioanalytical & Nuclear Chemistry* **2015**, *304* (2), 917-923.
- [23] Földi, P.; Knöfel, A.; Marten, S., Gradient Performance Tests for Reversed-Phase and Biochemical Applications using High Salt Buffers. *LCGC Europe*, **2008**, *21*(7), 372–378.
- [24] Polson; et al., Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **2003**, *785*(2), 263–275.

ภาคผนวก

ตารางที่ ก-1 พื้นที่ใต้พีคของสารละลายไอโอดีนในเมทริกซ์น้ำ

| ตัวทำละลาย | วิธีตกตะกอนโปรตีน           | Area peak ( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) |
|------------|-----------------------------|--|
| ACN        | Spiked before precipitation | 0.4330                                     |
|            | Spiked after precipitation  | 0.4343                                     |
| MeOH       | Spiked before precipitation | 0.4208                                     |
|            | Spiked after precipitation  | 0.4315                                     |

ตารางที่ ก-2 พื้นที่ใต้พีคของสารละลายไอโอดีตในเมทริกซ์น้ำ

| ตัวทำละลาย | วิธีตกตะกอนโปรตีน           | Area peak ( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) |
|------------|-----------------------------|--|
| ACN        | Spiked before precipitation | 0.2706                                     |
|            | Spiked after precipitation  | 0.2848                                     |
| MeOH       | Spiked before precipitation | 0.2546                                     |
|            | Spiked after precipitation  | 0.2677                                     |

ตารางที่ ก-3 พื้นที่ใต้พีคของไอโอดีต ในการวอร์เท็กซ์ที่เวลาต่าง ๆ

| สารละลาย | เวลา (นาที) | Area peak ( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) |
|----------|-------------|--|
| ACN      | 1           | 0.0176                                     |
|          | 5           | 0.0182                                     |
| MeOH     | 1           | 0.0157                                     |
|          | 5           | 0.0169                                     |

ตารางที่ ก-4 พื้นที่ใต้พีค เปอร์เซนต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอเดต

| ตัวทำละลาย | วิธีตกตะกอนโปรตีน           | Area peak ( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) | %recovery | average | %RSD |
|------------|-----------------------------|--|-----------|---------|------|
| ACN        | Non-spiked                  | 0  | -         |         |      |
|            |                             | 0  | -         | -       | -    |
|            | Spiked before precipitation | 0  | -         |         |      |
|            |                             | 0  | -         | -       | -    |
|            |                             | 0  | -         |         |      |
|            |                             | 0  | -         |         |      |
|            | Spiked after precipitation  | 0.1366                                     | 43.7      |         |      |
|            |                             | 0.1137                                     | 36.3      | 40.7    | 9.5  |
|            |                             | 0.1316                                     | 42.1      |         |      |
| MeOH       | Non-spiked                  | 0  | -         |         |      |
|            |                             | 0  | -         | -       | -    |
|            | Spiked before precipitation | 0  | -         |         |      |
|            |                             | 0  | -         | -       | -    |
|            |                             | 0  | -         |         |      |
|            |                             | 0  | -         |         |      |
|            | Spiked after precipitation  | 0.1582                                     | 50.7      |         |      |
|            |                             | 0.1568                                     | 50.2      | 50.4    | 0.6  |
|            |                             | 0.1565                                     | 50.2      |         |      |

ตารางที่ ก-5 พื้นที่ใต้พีค เปอร์เซนต์ค่าการคืนกลับของสารละลายไอโอดีน

| ตัวทำละลาย                  | วิธีตกตะกอนโปรตีน           | Area peak ( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) | %recovery | average | %RSD |
|-----------------------------|-----------------------------|--|-----------|---------|------|
| ACN                         | Non-spiked                  | 0  | -         |         |      |
|                             |                             | 0  | -         | -       | -    |
|                             |                             | 0  | -         |         |      |
|                             | Spiked before precipitation | 0.1676                                     | 40.3      |         |      |
|                             |                             | 0.1507                                     | 36.4      | 38.3    | 5.0  |
|                             |                             | 0.1586                                     | 38.2      |         |      |
|                             | Spiked after precipitation  | 0.4629                                     | 109       |         |      |
|                             |                             | 0.4652                                     | 109       | 109     | 0.3  |
|                             |                             | 0.4638                                     | 109       |         |      |
|                             | MeOH                        | Non-spiked                                 | 0         | -       |      |
| 0                           |                             |  | -         | -       | -    |
| 0                           |                             |  | -         |         |      |
| Spiked before precipitation |                             | 0.2826                                     | 66.9      |         |      |
|                             |                             | 0.2864                                     | 67.8      | 68.9    | 4.0  |
|                             |                             | 0.3051                                     | 72.1      |         |      |
| Spiked after precipitation  |                             | 0.4165                                     | 97.9      |         |      |
|                             | 0.4174                      | 98.1                                       | 98.7      | 1.5     |      |
|                             |                             | 0.4277                                     | 100       |         |      |

ตารางที่ ก-6 พื้นที่ใต้พีคของไอโอไดด์ ในไซเตริมไอโอดีน ตัวอย่างที่ 1 (ไซเตริมไอโอดีน 24 ไมโครกรัม) และ ในไซไคเตริมไอโอดีน 2 (ไซเตริมไอโอดีน 150 ไมโครกรัม)

| ตัวอย่าง                        | น้ำหนักไซ<br>(ฟอง) | น้ำหนักไซ<br>(กรัม) | สารละลาย | Area peak<br>( $\mu\text{S}\cdot\text{min}$ ) |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|----------|---|
| ไซเตริมไอโอดีน ตัวอย่างที่<br>1 | 56.25              | 0.4752              | ACN      | 0.8459  |
|                                 |                    | 0.5004              |          | 0.8366  |
|                                 |                    | 0.4965              | MeOH     | 0.8888  |
|                                 |                    | 0.5129              |          | 0.9084  |
| ไซเตริมไอโอดีน ตัวอย่างที่<br>2 | 63.43              | 0.4935              | ACN      | 0.3287  |
|                                 |                    | 0.5047              |          | 0.3302  |
|                                 |                    | 0.5113              | MeOH     | 0.3330  |
|                                 |                    | 0.5069              |          | 0.2064  |
|                                 |                    | 0.5006              |          | 0.2078  |
| 0.4942                          |                    | 0.2120              |          |   |

## ประวัติผู้วิจัย

นางสาวศศิพัชร์ ศรีวะลา เกิดเมื่อวันที่ 24 เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2539 ที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนร้อยเอ็ดวิทยาลัย จังหวัดร้อยเอ็ด เมื่อปีการศึกษา 2557 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2561 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 5 ถนนรณชัยชาญยุทธ ซอย 27 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ด รหัสไปรษณีย์ 45000 อีเมล Sasipat\_tk323@hotmail.com