การพัฒนาวิธีการเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อตรวจวัดสาร PPCPs สารกลุ่ม Tetracycline (Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline) Naproxen และ Gemfibrozil ในน้ำ

Development of sample preparation method for determination of PPCPs Tetracycline group (Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline) Naproxen and Gemfibrozil residues in water

โดย

นางสาวศุภนาถ เห็นสว่าง

นางสาววิสุทธิพร สุรสิทธิ์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

เรื่อง การพัฒนาวิธีการเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อตรวจวัดสาร PPCPs สารกลุ่ม Tetracycline (Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline) Naproxen และGemfibrozil ในน้ำ

โดย นางสาวศุภนาถ เห็นสว่าง

นางสาววิสุทธิพร สุรสิทธิ์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

…….. ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มล. ศิริพัสตร์ ไชยันต์)

ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษา

..... ปฏิบัติหน้าที่แทนอาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร)

…….. กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ เพียรวณิช)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

……

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่…… เดือน……. พ.ศ……

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อตรวจวัดสาร PPCPs สารกลุ่ม Tetracycline (Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline) Naproxen และ Gemfibrozil ในน้ำ

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวศุภนาถ เห็นสว่าง เลขประจำตัว 5333123723

นางสาววิสุทธิพร สุรสิทธิ์ เลขประจำตัว 5333120823

อาจารย์ที่ปรึกษา **ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์**

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร 5 ชนิด ได้แก่ naproxen, gemfibrozil และสารในกลุ่ม tetracycline ในน้ำ รวม 5 ชนิด โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยของเหลวโดยใช้เกลือช่วย (SALLE) และไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ภาวะที่เหมาะสมของ SALLE สำหรับการสกัดน้ำตัวอย่าง (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) คือ 0.5% กรดฟอร์มิกในอะซีโตไนไทรล์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เกลือ Na_2SO_4 ปริมาณ 1 กรัม และเวลาในการสกัด 5 นาที เมื่อใช้วิธีกราฟสอบเทียบแบบ matrix blank ได้สัมประสิทธ์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงด้วยค่า R^2 มากกว่า 0.99 สำหรับ naproxen และ gemfibrozil ในช่วงความเข้มข้น 0.10-10.00 ppm และ tetracycline ในช่วงความเข้มข้น 0.30-10.00 ppm โดยที่ขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.04-0.30 ppm และขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.14-1.00 ppm เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารที่ 1 และ 4 ppm พบว่า 43% ของข้อมูลร้อยละการกลับคืน (80-110%) ของภายในวันเดียวกัน (ซ้ำ 6 ตัวอย่างในแต่ละวันเป็นเวลา 3 วัน) แต่ 50% ของข้อมูลร้อยละการกลับคืน (61-75%) และ 7% ของข้อมูลร้อยละการกลับคืน (112-114%) อยู่นอกช่วงที่ยอมรับได้ นอกจากนี้วิธี SALLE ที่พัฒนาขึ้น ให้ความเที่ยงของร้อยละการกลับคืน (ที่ความเข้มข้น 1 ppm) ที่ยอมรับได้ด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า 10% ภายในวันเดียวกันและ 11% ระหว่างวันซึ่งอยู่ในช่วงน้อยกว่า 11% ที่ยอมรับได้ตาม AOAC ยกเว้นส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ gemfibrozil ระหว่างวันที่ RSD เท่ากับ 15% เทคนิคการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว สะดวกและปลอดภัย และอาจใช้เป็นแนวทางข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อไปเพื่อพัฒนาร้อยละการกลับคืนให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

คำสำคัญ: สารกลุ่ม PPCPs, ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี , salting-out assisted liquid-liquid extraction

Title Development of sample preparation method for determination of PPCPs Tetracycline group (Tetracycline, Oxytetracycline and Chlortetracycline) Naproxen and Gemfibrozil residues in water

Student names Miss Supanad Hensawong I.D. 5333123723

Miss Visuttiporn Surasith I.D. 5333120823

Advisor **Assist. Prof. Dr. Natchanun Leepipatpiboon**

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2013

Abstract

In this work, the quantitative determination of five compounds, including naproxen, gemfibrozil and a class of tetracycline compounds, in water samples was developed using salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) and high performance liquid chromatography. The following suitable SALLE conditions for extraction of water sample (5 mL) were obtained: 2.5 mL of acetonitrile with 0.5% formic acid, 1 g of Na_2SO_4 and the extraction time of 5 min. Using the matrix blank calibration method, high values of linear correlation coefficient, $R^2 > 0.99$, were found for naproxen and gemfibrozil in a concentration range of 0.10-10.00 ppm, and a class of tetracycline compounds in a concentration range of 0.30-10.00 ppm, along with the limit of detection in a range of 0.04-0.30 ppm and limit of quantitation of 0.14-1.00 ppm. Using the analyte concentration levels of 1 and 4 ppm, 43% of the average recovery data (82-104%) for intraday (six samples each day and for three days) was obtained to be within the AOAC acceptable recovery of 80-110%, while 50% of the average recovery data (61-75%) and 7% of the average recovery data(112-114%) are not within the acceptable value. In addition, this developed SALLE method provided acceptable precision in the recovery (1 ppm) with relative standard deviation (RSD) of less than 10% for intraday and 11% for interday being within the AOAC acceptable RSD of less than 11%, except for interday-RSD of 15% for gemfibrozil. Our developed analysis method is easy, fast, convenient and safe, and may be used as an informative way for further study to improve the recovery being within the acceptable value.

Keyword: HPLC, high performance liquid chromatography, salting-out assisted liquid-liquid extraction, SALLE

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยในครั้งนี้ได้สร้างความรู้ ประสบการณ์ มิตรภาพ และสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย อนึ่งขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ เป็นอย่างสูง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้ให้ความกรุณา ความรู้ คำแนะนำ และความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการดำเนินงานวิจัยที่ผ่านมา อีกทั้งต้องขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจแก้รายงานฉบับนี้ให้มีเนื้อหาที่ครบถ้วนและให้คำแนะนำในการสอบปากเปล่า ทำให้การทำโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หม่อมหลวง ศิริพัสตร์ ไชยันต์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ เพียรวณิช ที่ได้ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบและสละเวลาในการตรวจแก้ ให้คำแนะนำ จนทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเคมีแห่งนี้ที่ได้ถ่ายทอดความรู้อันมีคุณค่าเหนือสิ่งอื่นใด สิ่งที่ผู้วิจัยได้รับมิได้มีเพียงความรู้เท่านั้น หากแต่เป็นความรักความอบอุ่นและความช่วยเหลือตลอดมาจากที่แห่งนี้ ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา รวมไปถึงขอขอบพระคุณพี่ปริญญาโทและเอก และเพื่อน ๆ เคมีทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจเสมอมาในการทำวิจัยนี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญรูป ซ
สารบัญตาราง ญ
สารบัญสัญลักษณ์และคำย่อ ฏ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 มูลเหตุจูงใจ 1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
1.3 วัตถุประสงค์ 9
1.4 ขอบเขตงานวิจัย 9
1.5 ผลได้คาดว่าจะได้รับ 9
บทที่ 2 ทฤษฎี 10
2.1 high performance liquid chromatography (HPLC) 10
2.2 เทคนิคการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid -liquid extraction, LLE) 18
2.3 เทคนิค QuEChERS 19
2.3 เทคนิค salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) 20
2.4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ (method validation) 23
บทที่ 3 การทดลอง 25
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 25
3.2 สารเคมี 26
3.3 การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการทดลอง 27
3.4 ขั้นตอนการทดลอง 28
3.4.1 การหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด 29
3.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างน้ำ 30
3.4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ 32
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 35

หน้า

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC ในการแยกสารมาตรฐาน Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Naproxen และ Gemfibrozil 35
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธี salting-out assisted Liquid-liquid extraction 43
4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) 49
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 57
5.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกด้วยเทคนิค HPLC 57
5.2 ภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างแบบใหม่ 58
5.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี 59

เอกสารอ้างอิง 61
ภาคผนวก 63
ประวัติผู้วิจัย 69

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2-1 ส่วนประกอบของเครื่องมือ HPLC 11
รูปที่ 2-2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ Isocratic Elution 12
รูปที่ 2-3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ Gradient Elution 12
รูปที่ 2-4 six-port rotary sampling injection valve สำหรับ HPLC 13
รูปที่ 2-5 bonded phase ที่มีหมู่ฟังก์ชัน (n-Octyl และ n-Octadecyl) เกิดพันธะอยู่กับซิลิกา 14
รูปที่ 2-6 ภาพจำลองแสดงกลไกการหน่วงเหนี่ยวตัวถูกละลาย solvophobic model และ partioning Model 15
รูปที่ 2-7 ส่วนประกอบของ Diode Array Detector 17
รูปที่ 2-8 ขั้นตอนการทดลองการทำ Salting-out assisted liquid-liquid extraction 20
รูปที่ 4-1 โครมาโทแกรมของเฟสเคลื่อนที่ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q) และอะซีโตไนไทรล์ในอัตราส่วนเริ่มต้น 90:10 (%v/v) 37
รูปที่ 4-2 โครมาโทแกรมของเฟสเคลื่อนที่ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q) และอะซีโตไนไทรล์ในอัตราส่วนเริ่มต้น 80:20 (%v/v) 37
รูปที่ 4-3 โครมาโทแกรมของเฟสเคลื่อนที่ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q) และอะซีโตไนไทรล์ในอัตราส่วนเริ่มต้น 70:30 (%v/v) 38
รูปที่ 4-4 โครมาโทแกรมของเฟสเคลื่อนที่ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q) และอะซีโตไนไทรล์ในอัตราส่วนเริ่มต้น 80:20 (%v/v) พร้อมลำดับของพีกสารตัวอย่าง 39
รูปที่ 4-5 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Tetracycline กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3) 40
รูปที่ 4-6 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Oxytetracycline กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3) 40

หน้า

รูปที่ 4-7 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Chlortetracycline กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3) 41

รูปที่ 4-8 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Naproxen กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3) 41

รูปที่ 4-9 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Gemfibrozil กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3) 42

รูปที่ 4-10 โครมาโทแกรมโดยใช้เกลือของ Na_2SO_4 ในการสกัด 44

รูปที่ 4-11 โครมาโทแกรมโดยใช้เกลือของ $MgSO_4$ ในการสกัด 45

รูปที่ 4-12 โครมาโทแกรมโดยใช้เกลือของ $(NH_4)_2SO_4$ ในการสกัด 45

รูปที่ 4-13 ความสัมพันธ์ระหว่าง % recovery ของสารทั้ง 5 ชนิด กับปริมาตรของตัวทำละลาย 46

รูปที่ 4-14 ความสัมพันธ์ระหว่าง % recovery และปริมาณเกลือที่ใช้ในการสกัด 47

รูปที่ 4-15 ความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery และเวลาในการสกัด 48

รูปที่ 4-16 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Tetracycline กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3) 50

รูปที่ 4-17 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Oxytetracycline กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3) 50

รูปที่ 4-18 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Chlortetracycline กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3) 51

รูปที่ 4-19 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Naproxen กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3) 51

รูปที่ 4-20 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Gemfibrozil กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3) 52

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1-1 แสดงชนิดของสารปนเปื้อนในกลุ่ม PPCPs ที่วิเคราะห์ตามมาตรการของ EPA	2
ตารางที่ 1-2 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสารกลุ่ม Tetracycline 3 ชนิด สาร Naproxen และ Gemfibrozil ที่ทำการศึกษา	4
ตารางที่ 4-1 แสดงสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์สารแล้ว	42
ตารางที่ 4-2 แสดงค่า retention time ของสารทั้ง 5 ชนิด ตามลำดับการแยก	43
ตารางที่ 4-3 แสดงความจำเพาะของสารที่น้ำตัวอย่างแตกต่างกัน	52
ตารางที่ 4-4 แสดงความแม่นในการวิเคราะห์	53
ตารางที่ 4-5 แสดงความเที่ยงในการวิเคราะห์	55
ตารางที่ 4-6 ค่าประสิทธิภาพการเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration) ของสารทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบใหม่ ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	55
ตารางที่ 4-7 แสดงค่า LOD และ LOQ	56
ตารางที่ 5-1 ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และสาร Gemfibrozil โดยเทคนิค HPLC	57
ตารางที่ 5-2 ภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างแบบใหม่	58
ตารางที่ 5-3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	59

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญสัญลักษณ์และคำย่อ

A_{org}	ความเข้มข้นของสารในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์
A_{aq}	ความเข้มข้นของสารในชั้นน้ำ
K_a	acid dissociation constant
K_d	distribution coefficient
K_{ow}	octanol-water distribution constant
t_r	รีเทนชันไทม์ (retention time)
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาสารเคมีตกค้างในแหล่งน้ำต่าง ๆ ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ของทั้งมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นอย่างมาก อันเนื่องมาจากการขยายตัวของระบบอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และน้ำเสียจากการอุปโภคบริโภค จึงทำให้มีการปนเปื้อนสารเคมีลงสู่แหล่งน้ำเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อเป็นการสร้างมาตรฐานในการควบคุมสารเคมีที่ตกค้างในแหล่งน้ำจึงได้มีการรวมสารในกลุ่ม PPCPs (pharmaceuticals and personal care products) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเภสัชกรรมและเป็นสารที่ใช้ในชีวิตประจำวัน อันประกอบไปด้วยส่วนประกอบในตัวยาของการรักษาโรคต่าง ๆ ทั้งในมนุษย์และสัตว์ รวมถึงเป็นส่วนประกอบในเครื่องหอม เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดด ปรากฏในโภชนเภสัช หรือที่เรียกว่า อาหารเสริม อีกทั้งยังมาจากกิจกรรมต่าง ๆ ในชีวิตประจำวันของมนุษย์ ประกอบไปด้วย การขับถ่ายที่ไม่ถูกสุขลักษณะ การชำระร่างกาย การทิ้งยาลงในชักโครก ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้จะส่งผลให้มีการตกค้างสารกลุ่ม PPCPs ในสิ่งแวดล้อมอย่างรวดเร็ว โดยจะพบในท่อน้ำทิ้งเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ PPCPs ที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมยังมาจากกากของเสียของโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตยาและโรงพยาบาล ยาปฏิชีวนะ ยาที่ใช้ในการรักษาสัตว์ สเตอร์รอย ยาที่ผิดกฎหมาย การเกษตร โดยการตกค้างของสารในกลุ่ม PPCPs นอกจากจะทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพมนุษย์แล้ว ยังเกิดผลเสียโดยตรงในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ตระหนักถึงความสำคัญและความเข้าใจถึงผลกระทบของการตกค้างสารในกลุ่มดังกล่าวเท่าที่ควร

หากมีการตรวจพบสารในกลุ่ม PPCPs ในปริมาณที่มีจำนวนมาก จะก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์ ปัญหาในการรักษาโรค (การดื้อยา) การเกิดโรคชนิดใหม่ และส่งผลกระทบต่อผู้ที่แพ้ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ ยังมีผลต่อคุณภาพน้ำ ทำให้ระบบนิเวศน์ทางแหล่งน้ำธรรมชาติเสียสมดุล ดังนั้นการควบคุมปริมาณ และความเข้มข้นของสารกลุ่มนี้ให้อยู่ภายใต้ข้อกำหนดการปนเปื้อนสูงสุด (maximum concentration limit, MCL) เพื่อทราบถึงความเสี่ยงและอันตรายที่อาจมีผลต่อผู้บริโภค จึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง

โดยปกติการวิเคราะห์หาสารในกลุ่มดังกล่าว จะใช้วิธีการของหน่วยสิ่งแวดล้อมจากสหรัฐอเมริกา (EPA) อาศัยเครื่องมือในการวิเคราะห์คือ HPLC/MS/MS หรือ GC/MS/MS โดยจะแสดงชื่อสารแต่ละชนิดในกลุ่ม PPCPs ในตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 แสดงชนิดของสารปนเปื้อนในกลุ่ม PPCPs ที่วิเคราะห์ตามมาตรการของ EPA บางส่วน

Method 1694: 74 Pharmaceuticals or Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS	
PPCP	**Classification**
Ibuprofen	Analgesic
Cimetidine	Anti-acid reflux
Ranitidine	Anti-acid reflux
Albuterol	Antiasthmatic
Gemfibrozil	Antilipemic
Digoxin	cardiac glycoside
Cefotaxime	Cephalosporin antibiotic
Anhydrochlortetracycline (ACTC)	chlorotetracycline degradate
Anhydrotetracycline (ATC)	chlorotetracycline degradate
4-Epianhydrochlortetracycline (EACTC)	chlorotetracycline degradate
4-Epianhydrotetracycline (EATC)	chlorotetracycline degradate
4-Epichlortetracycline (ECTC)	chlorotetracycline degradate
Isochlortetracycline (ICTC)	chlorotetracycline degradate
Clarithromycin	Macrolide antibiotic
Roxithromycin	Macrolide antibiotic
Tylosin	Macrolide antibiotic
Virginiamycin	Macrolide antibiotic
Naproxen	non-steroidal anti-inflammatory drug
Oxacillin	β-lactam antibiotics
Fluoxetine	SSRI Antidepressant
Caffeine	Stimulant
Chlortetracycline (CTC)	Tetracycline antibiotic
Oxytetracycline (OTC)	Tetracycline antibiotic
Tetracycline (TC)	Tetracycline antibiotic

ที่มา : http://www.epa.gov/ppcp

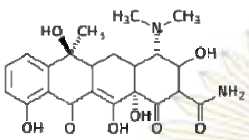
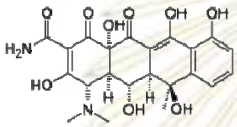
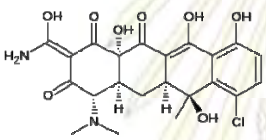
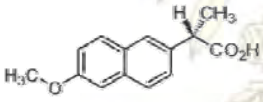
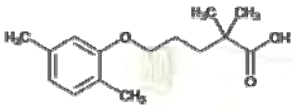
ปัจจุบันการตรวจวัดสารกลุ่ม PPCPs ใช้การเตรียมตัวอย่าง ด้วยวิธีการแยกด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction, SPE) ตามมาตรการของหน่วยสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (EPA) อาศัยขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน ซึ่งเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลานาน และมีราคาสูง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะใช้เทคนิค salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) ซึ่งเป็นเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ได้มีการพัฒนามาจากเทคนิคการสกัดพื้นฐาน คือเทคนิคการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid -liquid extraction, LLE) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยกสารออกจากสารผสม โดยใช้หลักการ like dissolves like เป็นวิธีการสกัดสารผสมที่เป็นของเหลวหรือของผสมที่ละลายในตัวทำละลายชนิดหนึ่งด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง โดยสารที่มีสภาพขั้วเหมือนกันจะละลายซึ่งกันและกันได้ดี ในทางปฏิบัติสารตัวอย่างมักเป็นน้ำ และตัวทำละลายที่ใช้ต้องละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีกว่า ควรมีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่ายและไม่เป็นพิษ ซึ่งเป็นเทคนิคที่กำลังได้รับการยอมรับว่าง่าย รวดเร็ว ประหยัด มีประสิทธิภาพ คงทน และปลอดภัย ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดสาร หากสามารถนำมาดัดแปลงให้ใช้กับการตรวจวัดสารกลุ่ม PPCPs ได้ จะเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว ปลอดภัย และมีค่าใช้จ่ายต่ำ

ส่วนวิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC เป็นเทคนิคที่มีราคาถูกกว่า เมื่อเทียบกับ ESI-MS และเป็นเครื่องมือที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาการสกัดและวิเคราะห์สารในกลุ่ม PPCPs โดยยกตัวอย่างสารในการวิเคราะห์มา 5 ชนิด คือ Tetracycline (TC), Oxytetracycline (OTC) และ Chlotetracycline (CTC), Naproxen (NP) และGemfibrozil (GFZ) ซึ่งอาจตกค้างอยู่ในแหล่งน้ำต่าง ๆ ที่มนุษย์ใช้บริโภคหรือทำกิจกรรมในชีวิตประจำวันต่าง ๆ โดยอาศัยเทคนิค SALLE ที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นเพื่อให้เหมาะสมในการนำมาเพื่อเตรียมตัวอย่างน้ำและสกัดสารที่ต้องการ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) ให้มีความเที่ยงและความแม่นสูง รวมถึงสามารถวิเคราะห์สารทั้ง 5 ชนิดได้ที่ความเข้มข้นในระดับ มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L)

ชนิดของสารทั้ง 5 ชนิด รวมถึงโครงสร้าง และสมบัติทางเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1-2 และ 1-3

ถ้าหากวิธีการสกัดและวิเคราะห์สารในกลุ่ม PPCPs แบบใหม่นี้ ประสบผลสำเร็จจึงจะสามารถนำมาขยายขอบเขตงานวิเคราะห์ให้ครอบคลุมการวิเคราะห์สารทุกชนิดในกลุ่มของ PPCPs ได้

ตารางที่ 1-2 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสารกลุ่ม tetracycline 3 ชนิด Naproxen และ Gemfibrozil ที่ทำการศึกษา

สาร	โครงสร้าง	สูตรเคมี	มวลโมเลกุล (g/mol)	pK_a	logK_{ow}
Tetracycline (TC)		$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.44	3.32,7.78,9.58	-1.44
Oxytetracycline (OTC)		$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460.43	3.22,7.46,8.94	-0.9
Chlortetracycline (CTC)		$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	478.88	3.30,7.55,9.33	-0.62
Naproxen (NP)		$C_{14}H_{14}O_3$	230.26	4.15	3.2
Gemfibrozil (GFZ)		$C_{15}H_{22}O_3$	250.33	4.5-4.8	4.77

$K_{ow.}$ *คือ* octanol-water distribution constant

ที่มา: http://www.chemspider.com

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากเอกสารงานวิจัยที่กล่าวถึงการปนเปื้อนของ สารกลุ่ม PPCPs (pharmaceuticals and personal care products) ในประเทศต่าง ๆ เช่น

ในปีค.ศ. 2008 Kasprzyk-Hordern B. และคณะ [1] ได้ทำการศึกษาสารกลุ่ม PPCPs 56 ชนิด ในแม่น้ำทาฟฟ์และแม่น้ำเอลล์ลี่เมืองเซาร์ทเวลประเทศสหราชอาณาจักร โดยติดตาม 10 เดือน จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นส่วนใหญ่ที่พบในแม่น้ำจะอยู่ในช่วง µg/L ซึ่งความเข้มข้นจะเปลี่ยนแปลงไปโดยขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝน สาเหตุหลักที่มีการปนเปื้อน มาจากการบำบัดน้ำเสียจากชุมชนเวลซ์และพบว่ามีการปล่อยสารกลุ่ม PPCPs ลงสู่แม่น้ำประมาณ 6 กิโลกรัมต่อวัน

ในปีค.ศ. 2009 Yoon Y. และคณะ [2] ได้ทำการวัดสารกลุ่ม PPCPs ในแม่น้ำฮาน จากต้นน้ำจนผ่านตัวเมืองโซล พบว่าปริมาณสารกลุ่ม PPCPs ถูกปล่อยออกมาในปริมาณ 56 ng/L จนถึง 1013 ng/L และสารกลุ่มนี้ เป็นสาเหตุหลักในการเพิ่มปริมาณ COD และ BOD ในแม่น้ำ ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคในการเตรียมสารตัวอย่างที่ผู้ศึกษาโครงการสนใจมาใช้คือ salting-out assisted liquid-liquid extraction ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถทำการสกัดได้อย่างรวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายต่ำ และสามารถนำไปใช้ในกรณีที่มีสารตัวอย่างจำนวนมากได้

ในปีค.ศ. 2009 Gupta M. และคณะ [3] ได้รายงานวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่ที่เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการวิเคราะห์สารประกอบ Carbonylทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine และการสกัดของ hydrazones โดยใช้น้ำกับตัวทำละลายออร์แกนิกที่ละลายน้ำได้ คือ อะซีโตไนไตรล์ จะเกิดการแยกชั้นเกิดขึ้น โดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และกระบวนการนี้เรียกว่า salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) การสกัดจะถูกวิเคราะห์โดยใช้ HPLC-DADที่ 360 nm กระบวนการทดลองจะมีการปรับเปลี่ยนตัวทำละลายที่เหมาะแก่การสกัด เกลือสำหรับการแยกชั้นระหว่างชั้นน้ำกับชั้นตัวทำละลายออร์แกนิก อุณหภูมิและเวลา โดยวิธีการทดลองนี้ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีได้ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 7-15 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่ามากกว่า 0.9964-0.9991 และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.58-3.2 ไมโครกรัมต่อลิตร

ซึ่งเทคนิคในการเตรียมสารตัวอย่างที่ผู้ศึกษาโครงการสนใจในการศึกษานี้คือเทคนิค SALLE เป็นวิธีการที่สามารถสกัดได้อย่างรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายที่ใช้ต่ำ และสามารถนำไปใช้ในกรณีที่มีสารตัวอย่างจำนวนมากได้งานวิจัยที่ได้มีการกล่าวถึงวิธีดังกล่าว ดังนี้

ในปีค.ศ. 2009 Myasein F. และคณะ [4] มีรายงานวิธีการวิเคราะห์สารโลปินา-เวียร์ (Lopinavir) และริโตนาเวียร์ (Ritonavir) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคเอดส์ โดยมีวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานคือวิธีการใช้การติดตามการรักษาของยาในมนุษย์ แต่ในงานวิจัยนี้ มีการเสนอวิธีที่เร็วและสะดวกในการวิเคราะห์มากกว่า โดยการศึกษายานี้ในเลือดมนุษย์กับชั้นโปรตีน ใช้เทคนิค SALLE ร่วมกับ LC-MS/MS ซึ่งการศึกษาใช้คอลัมน์ Agilent Zobax Extend-C18 Rapid resolution HT (1.8μm, 2.1 mm × 30 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ อะซีโตไนไตรล์:0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำ (55:45 v/v) ในขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีจะอ้างอิงจาก Industry Guidance for Bioanalytical Method validation แม้ว่าผลในการตรวจสอบออกมาไม่ดีนักแต่ด้วยเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้รวดเร็วจึงใช้ในการพัฒนาการวิเคราะห์ต่อไป

ในปีค.ศ. 2009 Tsai W.H. และคณะ [5] ใช้เทคนิค SALLE ร่วมกับการสกัดแบบย้อนกลับ โดยใช้น้ำ อะซีโตไนไตรล์และไดคลอโรมีเทน ประกอบกับ HPLC-DAD ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ หลังจากที่เนื้อเยื่อรวมเข้ากันกับอะซีโตไนไตรล์และใช้เกลือทำให้เกิดการแยกชั้นนั้น ใน 1 มิลลิลิตรของอะซีโตไนไตรล์จะมีไดคลอโรมีเทนประมาณ 250-400 ไมโครลิตร ทำให้เป็นเบสด้วยไดเอทิลาไมน์ สารสกัดชั้นออร์แกนิกนั้นจะเป็นเฟสในการให้และชั้นน้ำจะเป็นเฟสในการรับในขั้นตอนการสกัดแบบย้อนกลับ สารสกัดที่ได้นำไปฉีดสู่เครื่อง HPLC ได้ทันที ในการวิเคราะห์ในเนื้อเยื่อหมูจะพบสารตัวอย่างอยู่ที่ 10 นาโนกรัมต่อกรัม ความเป็นเส้นตรงของซัลโฟนา-ไมด์ ทั้ง 5 ชนิด ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่ามากกว่า 0.998 ร้อยละการคืนกลับอยู่ที่ 96.5-109.2% และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.2-1.0 นาโน-กรัมต่อกรัม

ในปีค.ศ. 2011 Noche, G.G. และคณะ [6] ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ เพื่อตรวจหาความเป็นไปได้ที่จะพบการปนเปื้อนจากยาต้านการอักเสบที่มีสารสเตียรอยด์ผสมอยู่ โดยสนใจสารดังต่อไปนี้ กรดโคลฟิบริก (clofibric acid) ไอบูโพรเฟน (ibuprofen) นาพรอกเซน (naproxen) ไดโคลฟีแนค(diclofenac) และคีโตโปรเฟน (ketoprofen) ซึ่งละลายอยู่ในน้ำ โดยขั้นตอนการวิจัยเริ่มจากการนำอนุพันธ์ *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) และ 2,2,2-trifluoroethylamine hydro-chloride (TFEA) มาสกัดด้วยเทคนิค SALLE ตามด้วยการตรวจวัดผลโดยเครื่อง gas chromatography–programmed temperature

vaporizer–mass spectrometry (GC–PTV–MS) จากอิทธิพลของค่าพารามิเตอร์ในขั้นตอนการวิเคราะห์หลายขั้น ทำให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในน้ำของ ไอบูโพรเฟน จากวิธีการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.042 µg/L และสำหรับคีโตโปรเฟนอยู่ที่ 1.2 µg/L ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) พบว่ามีค่อนข้างต่ำ (<10% สำหรับทุกสารประกอบ) การตรวจวัดนี้จะถูกนำไปพัฒนาเพื่อวิเคราะห์สารในกลุ่ม non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ได้อีกเป็นจำนวนมากในแหล่งน้ำธรรมชาติต่อไป จากผลการทดลองตรวจพบไอบูโพรเฟนและนาพรอกเซนเป็นจำนวนมากในน้ำเสียต่าง ๆ

ในปีค.ศ. 2012 Song, S. และคณะ [7] ได้ตรวจวิเคราะห์หาสารพิษและเชื้อราโดยตรงจากปัสสาวะซึ่งให้ผลที่ดีกว่าการตรวจวิเคราะห์หาสารพิษในการบริโภคเฉลี่ย ในการศึกษานี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาใหม่และได้ตรวจสอบสาร aflatoxin B_1, deoxynivalenol, fumonisin B_1, ochratoxin A, zearalenone และ T_2 toxin รวมถึงการทำงานของสารดังกล่าวในปัสสาวะสุกร โดยสารที่ตรวจวัดมีทั้งหมด 12 ชนิดได้ใช้เทคนิคการสกัดโดย SALLE ในการเตรียมสารตัวอย่างและใช้ HPLC/MS/MS ในการตรวจวัดผลการแยกของสาร เปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 70–108% ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าต่ำกว่า 25 % ของสารประกอบส่วนใหญ่ในแต่ละความเข้มข้น ค่าขีดจำกัดต่ำสุดตั้งแต่ 0.07 $ngmL^{-1}$ สำหรับ ochratoxin และ 3.3 $ngmL^{-1}$ สำหรับ deoxynivalenol ใช้การประเมินผล carlibration curve จาก matrix-matched การวิเคราะห์นี้นำไปต่อยอดในการตรวจวัดหาสารพิษในปัสสาวะมนุษย์ต่อไป สุดท้ายวิธีการพัฒนานี้สามารถใช้ในการศึกษานำร่อง การวิเคราะห์สารตัวอย่าง 28 ชนิดในปัสสาวะสุกรโดยมีการตรวจพบสารเพิ่มคือ Deoxynivalenol, aflatoxin B1, fumonisin B1 และ ochratoxin

ในปีค.ศ.2012 Wen, Y. และคณะ [8] ได้พัฒนาวิธีการใหม่สำหรับการแยกสารฆ่าเชื้อรา benzimidazole (carbendazim, fuberidazole, thiophanate-methylandthiophanate) ในตัวอย่างที่มีความเค็มสูง โดยใช้เทคนิค SALLE ในการเตรียมสารตัวอย่าง โดยใช้อะซิโตไนไตรล์และน้ำผสมกัน เพื่อแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกมา มีการออกแบบอุปกรณ์สำหรับใช้ในการทดลองชื่อว่า กล่อง Behnken มีรูปร่างลักษณะที่สามารถตอบสนองการทำงานได้ดี เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำการสกัดโดยเทคนิค SALLE แก้ปัญหาที่มีความเป็นกรดด่างให้เหมาะสม ทำโดยใส่โซเดียมคลอไรด์ที่ pH 7 ซึ่งใช้ในขั้นตอนการสกัด วิธีนี้มีผลดีคือประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน ให้ผลที่ดีในการตรวจวัดสารฆ่าเชื้อรา เบนซิมิดาโซล (benzimidazole) โดยมีขีดจำกัดในการตรวจวัดอยู่ระหว่าง 0.14 ng/ml 1 และ 0.38 ng/ml ได้นำไปทดลองหาในน้ำตัวอย่างที่มีความเค็ม 3 ชนิด มีร้อยละการได้กลับคืนเพิ่มจากวิธีเดิม 60.4% เป็น 99.1%. ซึ่งในตัวเทคนิค ง่ายและรวดเร็ว ใช้สำหรับการวิเคราะห์การหาสารฆ่าเชื้อรา เบนซิมิดาโซล (benzimidazole) ในตัวอย่างความเค็มสูงอื่น ๆ ได้ต่อไป

ในปีค.ศ. 2013 Sánchez, M.D.N. และคณะ [9] ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับการสกัดและการแยกสาร 2 ชนิดที่แตกต่างกันของหมู่อะโรมาติกเอมีน จากหมู่ azo dyes (พวกสีย้อมผ้า) จากสิ่งทอผสม ซึ่งตรวจวัดโดยใช้ GC–MS โดยใช้เทคนิค microextraction by packed sorbent (MEPS) ในขั้นแรกหลังจากนั้นตามด้วยการใช้เทคนิค SALLE มีอิทธิพลของค่าพารามิเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกโดยใช้วิธี MEPS แบ่งออกเป็นวัสดุที่ใช้ในการดูดซับ ปริมาณสารตัวอย่าง ชนิดของตัวทำละลาย ปริมาณของตัวทำละลาย และขั้นตอนการล้าง ในส่วนของวิธี SALLE ค่าพารามิเตอร์คือ ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดและจำนวนของเกลือ นอกจากนี้ในการตรวจวิเคราะห์สารใช้หลักการแยกทางโครมาโทกราฟี รวมถึงใช้หลักการของ quadrupole mass spectrometer ซึ่งให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) มีค่าต่ำกว่า 15 และ 11 % เมื่อใช้เทคนิค MEPS และ SALLE ตามลำดับ ผลลัพธ์จากการวิเคราะห์สารในเส้นใยผ้าเปิดเผยว่า ในเนื้อผ้ามีสารจากสีย้อมผ้าด้วยกันหลายชนิดคือ p-chloroaniline, 4-chloro-o-toluidine, 2-naphthylamineand 3,3′-dimethoxybenzidine.

ในปีค.ศ. 2013 Valente, I.M. และคณะ [10] ได้ศึกษาผลกระทบของเกลือจากการสกัดในการวิเคราะห์ทางเคมีซึ่งมีความหลากหลายเป็นอย่างมาก และสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มความผันผวนของสารสกัดในช่องว่างเหนือของเหลวที่จะก่อให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในทางชีววิทยาได้อีกด้วย อาจเป็นการใช้เพื่อปรับปรุงเปอร์เซ็นต์ร้อยละในการกลับคืนจากการสกัดของเหลวจากของเหลว ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในระยะหลังเทคนิค salting-out สามารถใช้เพื่อให้การแยกเฟสระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายในน้ำกับน้ำได้ กระบวนการนี้มีชื่อว่า SALLE ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยเตรียมสารตัวอย่างที่จะถูกนำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV ให้สามารถตรวจวัดได้ดีขึ้น ในการทดลองนี้เน้นการใช้อะซิโตไนไตรล์เป็นตัวทำละลายและใช้ในการสกัดร่วมกับน้ำ โดยมีค่าพารามิเตอร์ดังนี้ ปริมาณน้ำและอะซิโตไนไตรล์ในการสกัด อัตราส่วนระหว่างน้ำและอะซิโตไนไตรล์ในงานวิจัยนี้ สารประกอบในกลุ่มไดคาร์บอนิล (dicarbonyl) และเบียร์ถูกนำมาใช้ในการทดสอบ อิทธิพลของค่าพารามิเตอร์ถูกวิเคราะห์ผลโดยปริมาณอัตราส่วนในการแยกเฟสของสาร และอัตราส่วนของแอลฟาไดคาร์บอนิล (α-dicarbonyls) ที่ถูกสกัดให้แยกไปอยู่ในเฟสของชั้นอะซิโตไนไตรล์ ผลจากการแยก แบ่งสารได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของคลอไรด์และอะซิเตท กลุ่มของคาร์บอนเนต(carbonates) และซัลเฟตและกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มของแมกนีเซียมซัลเฟต สำหรับเกลือทั้งหมดพบว่าโซเดียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการแยกเฟสของสารได้ดีที่สุด

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

พัฒนาวิธีการในการเตรียมน้ำตัวอย่าง เพื่อตรวจวัดสารตกค้างในกลุ่ม PPCPs โดยแบ่งออกเป็น Naproxen และ Gemfibrozil รวมถึงสารในกลุ่ม Tetracycline ในน้ำ โดยใช้ HPLC

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้ HPLC ได้ รวมทั้งสามารถสกัดสารตัวอย่างในน้ำในสภาวะที่เหมาะสมได้ และสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างให้เหมาะสมต่อการตรวจวัดได้ นอกจากนี้สามารถตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นได้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. การประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับสารในกลุ่ม PPCPs ชนิดอื่น ๆ ได้
2. ฝึกกระบวนการคิดวิเคราะห์วางแผนในการทำงานวิจัย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

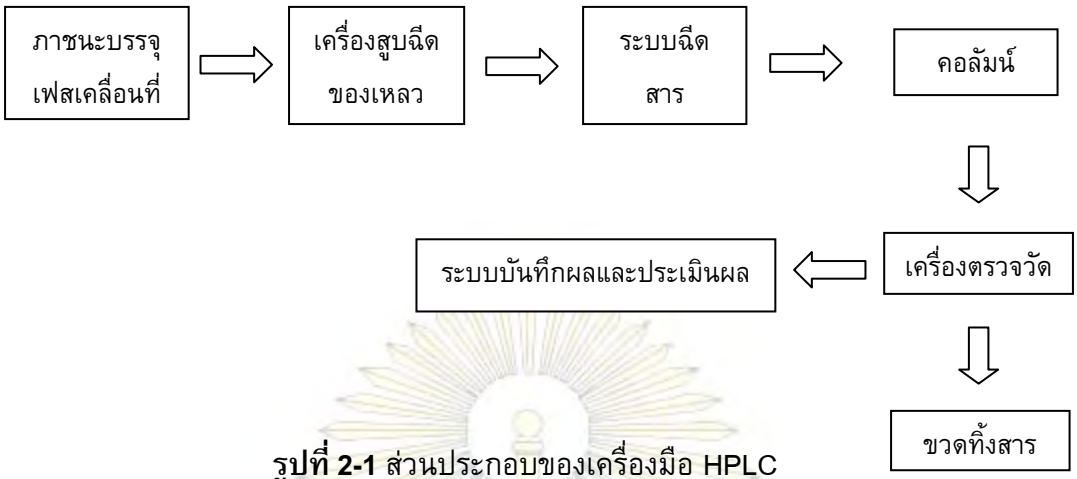
บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 High performance liquid chromatography (HPLC)

ลิควิดโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารผสมในสภาวะของเหลว อาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบในคอลัมน์ที่เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) โดยการชะหรือพาของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปในเฟสคงที่ โดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่ของเหลวพาผ่านเข้าไป สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ได้เร็วช้าแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาระหว่างสารกับเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ ต่อมามีการพัฒนาเฟสคงที่ให้มีขนาดเล็กลง พบว่ายิ่งอนุภาคของเฟสคงที่ในคอลัมน์มีขนาดเล็กลงเท่าใด จะทำให้สมรรถนะในการแยกสารเพิ่มขึ้น จึงเป็นที่มาของเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงหรือ high performance liquid chromatography, HPLC จำเป็นต้องใช้เครื่องสูบหรือปั๊มในการพาเฟสเคลื่อนที่เข้าในระบบการแยก การแยกในเทคนิค HPLC มีอยู่หลายประเภท ที่นิยมใช้มากสุด ได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบรีเวิรส์เฟส (Reversed Phase HPLC) ใช้เฟสคงที่เป็นหมู่ฟังก์ชันที่ไม่มีสภาพขั้ว เช่น C-18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายได้ในน้ำ

การแยกและวิเคราะห์สารที่ผสมรวมกันอยู่ ทำโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ เกิดอันตรกิริยาการแยกในคอลัมน์และผ่านไปสู่เครื่องตรวจวัด (detector) จากนั้นรายงานผลทางเครื่องบันทึกผล (recorder) หรือเครื่องบันทึกและคำนวณผล (integrator) หรือเครื่องคอมพิวเตอร์ แสดงผลเป็นกราฟความสัมพันธ์ของเวลา (แกนนอน) กับสัญญาณการตรวจวัด (แกนตั้ง) เรียกโครมาโทแกรม เครื่อง HPLC ใช้วิเคราะห์หาชนิดปริมาณของสารประกอบอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยการเลือกใช้คอลัมน์และเครื่องตรวจวัด ที่เหมาะสม และใช้ในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้ในระดับส่วนในล้านส่วน (ppm หรือ mg/L) หรือส่วนในพันล้านส่วน (ppb หรือ µg/L) ได้ เครื่อง HPLC มีส่วนประกอบที่สำคัญดังแสดงในรูปที่ 2-1

หน้าที่แต่ละส่วนขององค์ประกอบ HPLC



รูปที่ 2-1 ส่วนประกอบของเครื่องมือ HPLC

หน้าที่แต่ละส่วนขององค์ประกอบ HPLC

1. ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir)

ทำจากแก้วหรือสเตนเลส มีขนาดบรรจุประมาณ 1 ลิตร การเลือกใช้ต้องคำนึงถึงสมบัติการละลายและความเข้ากันได้ ความบริสุทธิ์ของตัวทำละลาย ขั้นตอนสำคัญในการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ คือการกรองด้วยไมโครเมมเบรนเพื่อกำจัดอนุภาคและสิ่งปนเปื้อนในเฟสเคลื่อนที่ออกให้หมด เพราะอนุภาคขนาดเล็กอาจก่อให้เกิดปัญหาการอุดตันในระบบได้

2. เครื่องสูบฉีดของเหลว (pump)

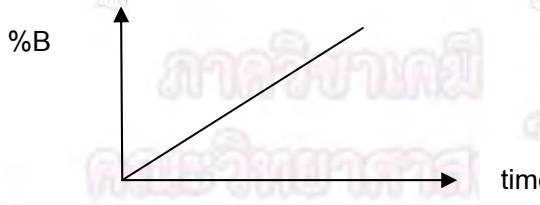
ช่วยขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลผ่านคอลัมน์ไปได้ เพราะภายในคอลัมน์นั้นมีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากขนาดของอนุภาคในเฟสคงที่มีขนาดเล็ก นอกจากนั้นยังทำหน้าที่ควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ด้วย เครื่องสูบฉีดของเหลวประกอบด้วยลูกสูบหรือกลไกอื่นที่ใช้ในการขับดันของเหลว วาวล์ ตัวควบคุมการไหล ตัวลดจังหวะ และ pressure transducer

การผ่านตัวทำละลายเข้าสู่ระบบการแยก ทำได้ 2 วิธี คือ

1. การผ่านสารละลายแบบไอโซเครติก (Isocratic Elution) คือการใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายผสมคงที่ ตลอดการวิเคราะห์

รูปที่ 2-2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ Isocratic Elution

2. การผ่านสารละลายแบบเกรเดียนท์ (Gradient Elution) มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของตัวทำละลายในระหว่างที่ทำการวิเคราะห์ เป็นวิธีที่เหมาะสมในการแยกสารผสมที่ซับซ้อนและมีค่า retention factor แตกต่างกันมาก ซึ่งจะช่วยทำให้สารผสมสามารถเกิดการแยกได้ดีกว่าการใช้ Isocratic elution โดยการปรับความแรงของขั้วของตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์



รูปที่ 2-3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ Gradient Elution

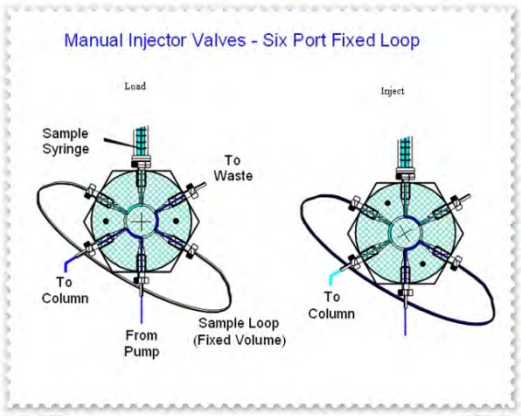
เครื่องมือที่ใช้ในการควบคุมการผสมสารละลายสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. แบบ Low Pressure Mixing เป็น Gradient elution ที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายภายใต้ความดันบรรยากาศ ก่อนที่จะส่งเข้าสู่เครื่องสูบฉีดของเหลว แล้วเพิ่มความดันให้สูงขึ้นตามที่ต้องการก่อนผ่านเข้าสู่คอลัมน์

2. แบบ high pressure mixing ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะเข้าสู่เครื่องสูบฉีดของเหลวให้ผ่านเข้ามาและผสมกันภายใต้ความดันสูงก่อนจะผ่านคอลัมน์

3. ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (sample injection system)

การผ่านสารเข้าสู่คอลัมน์ควรจะใช้แถบที่แคบมากที่สุด และไม่รบกวนการไหลของเฟสเคลื่อนที่ นิยมใช้ระบบ microsample value ซึ่งมี six-port rotary sampling injection valve ดังรูป



รูปที่ 2-4 six-port rotary sampling injection valve สำหรับ HPLC

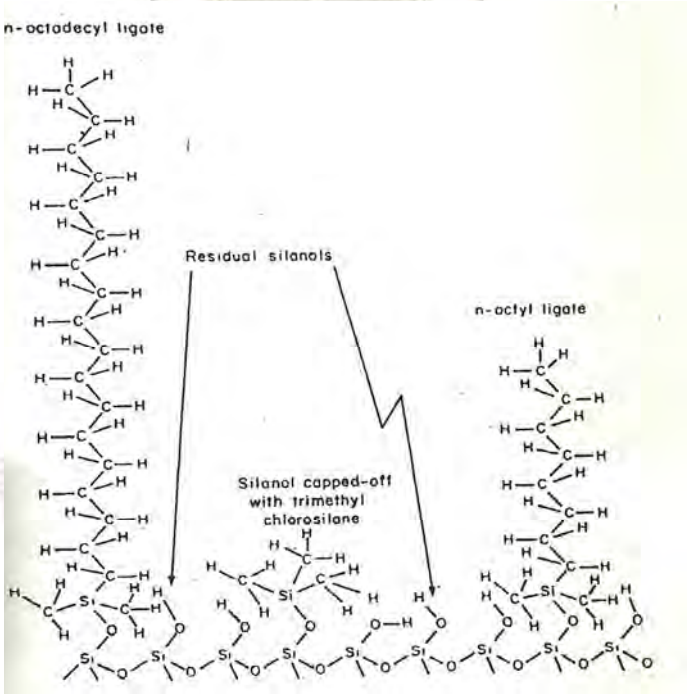
4. คอลัมน์ (column)

ทำมาจากท่อแก้วอย่างหนาหรือสเตนเลส โดยมีสารที่บรรจุในคอลัมน์ 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีอนุภาคขนาดเล็กมากและมีได้หลายขนาด โดยอนุภาคที่นิยมใช้ใน HPLC คือซิลิกาและอะลูมินา ส่วนอีกชนิดหนึ่งเป็นของเหลวชนิดที่มีขั้วฉาบอยู่บนอนุภาคจะเรียกว่าเฟสปกติ (normal phase) แต่ถ้าใช้ของเหลวที่ไม่มีขั้วฉาบอยู่บนอนุภาคจะเรียกว่า เฟสย้อนกลับ (reverse phase)

5. ชนิดของเฟส

5.1 normal phase BPC อนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์จะมีสภาพขั้วสูง ได้แก่ ซิลิกา และไซยาไนด์ เป็นต้น ส่วนเฟสเคลื่อนที่จะมีสภาพขั้วต่ำกว่า โดยมากจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สภาพขั้วต่ำถึงปานกลาง สมบัติดังกล่าวจะใช้ในการแยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่า หลักการแยกอาศัยสภาพขั้ว (polarity) คือ ถ้าสารที่มีสภาพขั้วสูงกว่า จะถูกเหนี่ยวในคอลัมน์นานกว่า เนื่องจากจะถูกอนุภาคในคอลัมน์หน่วงเหนี่ยวเอาไว้ด้วยสภาพขั้วที่เหมือนกัน ส่วนสารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าจะถูกหน่วงเหนี่ยวด้วยอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ได้น้อย โดยเฟสเคลื่อนที่จะพาสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกมาก่อน การเพิ่มสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่จะลดการหน่วงเหนี่ยวของสารในคอลัมน์ ตัวอย่างคอลัมน์ประเภทนี้

5.2 reversed phase BPC เป็นเทคนิคที่นิยมมากสุดในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC reversed phase มีความหมายตรงข้ามกับ normal phase คือจะใช้เฟสคงที่ที่ไม่มีสภาพขั้ว เช่น C-18 และเฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วสูง โดยทั่วไปจะใช้น้ำและตัวทำละลายออร์แกนิกที่ละลายในน้ำ เฟสคงที่ในระบบนี้ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลวที่เกิดพันธะเกาะบนวัสดุค้ำจุน (solid support) เช่น ซิลิกา และพอลิเมอร์ เป็นต้น ซิลิกาจัดเป็นวัสดุค้ำจุนที่นิยมใช้แพร่หลาย



รูปที่ 2-5 bonded phase ที่มีหมู่ฟังก์ชัน (n-Octyl และ n-Octadecyl) เกิดพันธะอยู่กับซิลิกา

6. กลไกการหน่วงเหนี่ยว

กลไกการหน่วงเหนี่ยวในโครมาโทกราฟี แบบ reversed phase เกิดจากอันตรกริยา nonpolar-norpolar การแยกระบบนี้สัมพันธ์กับสมบัติทางกายภาพของโมเลกุลที่จะแยกด้าน hydrophobicity และ ionic character ทฤษฎีที่ใช้ในการอธิบายกลไกการแยกบนเฟสคงที่ชนิดมีขั้วมี 2 ทฤษฎี คือ

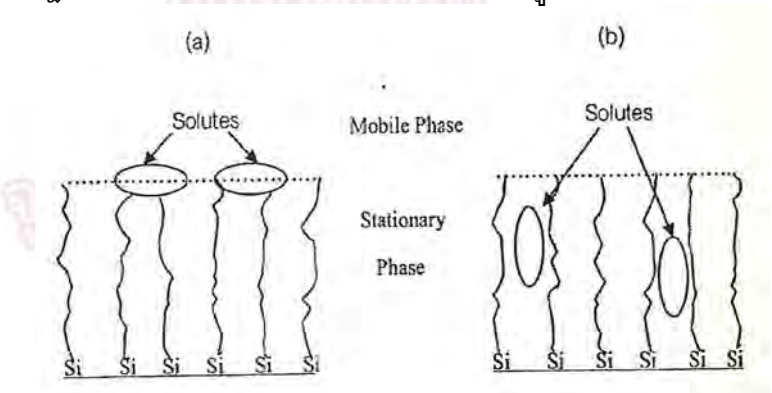
6.1 Solvophobic theory

เป็นทฤษฎีใช้อธิบาย selectivity ในระบบ reversed-phase chromatography ได้เป็นอย่างดี โดยแนวความคิดทฤษฎีคือ โมเลกุลใด ๆ ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะแยกตัวออกจากตัวทำละลายที่มีขั้วแล้วเข้าสู่เฟสที่เป็นไฮโดรคาร์บอน อันตรกิริยาแบบไม่ชอบน้ำนี้เกิดจากแรงผลักระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้ว สารที่ไม่มีขั้วและเฟสคงที่ ดังนั้นแรงที่ยึดสารให้อยู่บนเฟสคงที่จะอ่อนลง ถ้าโมเลกุลของสารถูกล้อมรอบด้วยตัวทำละลาย สารที่เข้ากันไม่ได้กับตัวทำละลายจะถูกหน่วงโดยเฟสคงที่ภายในคอลัมน์ได้นานกว่า

6.2 Partition theory

ทฤษฎีกล่าวว่า สารตัวอย่างจะฝังตัวอยู่ในสายโซ่ของเฟสคงที่แทนที่จะเป็นการยึดเกาะบนพื้นผิวเหมือนในทฤษฎี solvophobic แม้ว่ากลไกการแยกสารยังไม่เป็นที่แน่ชัดแต่ก็เป็นที่ยอมรับว่า ความยาวของสายโซ่ของเฟสคงที่นั้นมีผลต่อ retention time ของสาร โดยถ้าสายโซ่ยาวเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ก็จะใกล้เคียงกับการเกิด partition และถ้าสายโซ่สั้น กลไกจะเกิดใกล้เคียงกับการดูดซับ (adsorption)

จากทั้ง 2 ทฤษฎีสามารถแสดงกลไกลการหน่วงเหนี่ยวในรูปที่ 2-6



รูปที่ 2-6 ภาพจำลองแสดงกลไกการหน่วงเหนี่ยวตัวถูกละลาย Solvophobic Model และ Partioning Model

7. เครื่องตรวจวัดสาร (Detector) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประการ คือ

7.1 เครื่องตรวจวัดสารแบบทั่วไป (Universal Detector)

เป็นเครื่องตรวจวัดสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่หรือตัวชะสารที่ออกมาจากคอลัมน์เป็นสมบัติรวมของเฟสเคลื่อนที่และสารที่สนใจ การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณจะขึ้นอยู่กับประมาณสารที่สนใจ เช่น เครื่องวัดดัชนีหักเหแสง เป็นต้น

7.2 เครื่องตรวจวัดสารแบบเฉพาะ (Selective Detector)

เป็นการวัดสมบัติทางเคมีหรือกายภาพของตัวถูกละลายในของเหลว โดยไม่มีสัญญาณรบกวนใด ๆ จากเฟสเคลื่อนที่ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสูง สำหรับเครื่องตรวจวัดที่ใช้ในเทคนิค HPLC มีหลายชนิด ในที่นี้ขอยกตัวอย่างเพียง 2 ชนิด คือ

1) เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์

ใช้ตรวจปริมาณการเรืองแสงของโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนพลังงานที่ความยาวคลื่นสั้น เพื่อเปลี่ยนไปอยู่สภาวะเร้า เมื่อกลับคืนสู่สภาวะพื้น (โดยทันที) จะคายพลังงานออกมาในช่วงความยาวคลื่นที่ยาวกว่า (พลังงานลดลง) เกิดในโมเลกุลที่มีวงแหวนเบนซีนหรือมีพันธะคู่สลับเดี่ยวที่มีความเสถียรเรโซแนนซ์สูง มีความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด 2 ค่า คือ ความยาวคลื่นของแสงกระตุ้นที่สารตัวอย่าง และความยาวคลื่นเมื่อคืนสู่สภาพปกติ ข้อดีคือ มีความไว ความจำเพาะเจาะจงและสะดวกในการปรับระดับแสงพื้นฐาน (background) ให้เข้าใกล้ศูนย์ เหมาะในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและสารในเมทริกซ์ซับซ้อน

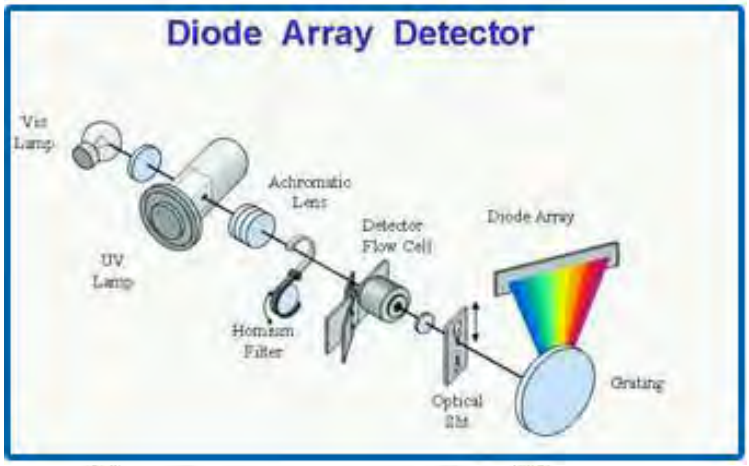
2) เครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต-วิซิเบิล

สารประกอบส่วนมากดูดกลืนรังสีในช่วงนี้ ความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสาร หาได้จากเครื่องตรวจวัดชนิดไดโอดอาเรย์ (diode array) ทำการบันทึกค่าสเปคตราสมบูรณ์ของสารมาตรฐานที่จะศึกษาให้สามารถเลือกค่าความยาวคลื่นที่ให้การดูดกลืนสูงสุดได้สะดวก แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

2.1) เครื่องตรวจวัดอัตราไวโอเลต-วิซิเบิลชนิด fixed wavelength สามารถติดตามความยาวคลื่นได้เพียงค่าเดียวเท่านั้น

2.2) เครื่องตรวจวัด visible wavelength และ photodiode array มีข้อดีกว่าชนิดแรก สามารถติดตามค่าการดูดกลืนแสงได้มากกว่าหนึ่งค่า ระบบการเดินทางของแสงเป็นแบบย้อนแสง

รีเวิรส์ ออพทิก (Reverse optics) คือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสงซึ่งผ่านไปยัง โฟร์เซลล์ (flow cell) ก่อนจะผ่านไปยังโมโนโครเมเตอร์ (monochromator) คือ สลิต (slit) และ เกรตติง (grating) เมื่อแสงตกกกระทบลงบน เกรตติง (grating) แสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ แล้วจึงไปตกกระทบบนแผงของ ไดโอด อาร์เรย์ (Diode array) ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรมโดยสามารถเก็บข้อมูล spectrum ของพีกต่าง ๆ ในโครมาโทแกรมได้ด้วย ตัวอย่างที่เหมาะกับตัวตรวจวัดนี้ ต้องเป็นตัวอย่างที่สามารถดูดกลืนแสงได้



รูปที่ 2-7 แสดงส่วนประกอบของ Diode Array Detector

8. เครื่องบันทึกข้อมูลและควบคุม (Data Collection and Control Device)

เป็นเครื่องมือส่วนที่แสดงผลการวิเคราะห์โดยรายงานผลเป็นโครมาโทแกรม ในโครมาโทแกรมหนึ่ง ประกอบด้วยสัญญาณจากการวัดสารละลายตัวชะซึ่งเป็นเส้นตรงสม่ำเสมอเรียกว่า baseline กับสัญญาณที่ได้จากการวัดสารละลายตัวอย่างซึ่งมีลักษณะเป็นยอดแหลมเรียกว่า พีก (peak) สารแต่ละชนิดให้พีกที่เวลาต่างกันเรียกว่า รีเทนชันไทม์ (retention time, t_r) ความสูงของพีกที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณสารในตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นด้วย

การเตรียมสารตัวอย่าง (Sample Preparation)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่มีความเข้มข้นต่ำมากต้องมีการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างให้สามารถตรวจวัดด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ได้ ซึ่งเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างที่ใช้อาศัยแนวคิดของเทคนิค SALLE โดยมีการพัฒนามาจาก เทคนิค LLE ซึ่งมีหลักการดังนี้

2.2 เทคนิคการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid -liquid extraction, LLE)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารออกจากสารผสม โดยใช้หลักการ like dissolves like การสกัดสารผสมที่เป็นของเหลวหรือของผสมที่ละลายในตัวทำละลายชนิดหนึ่งด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง โดยสารที่มีสภาพขั้วเหมือนกันจะละลายกันได้ดี ในทางปฏิบัติสารตัวอย่างมักเป็นน้ำ และตัวทำละลายที่ใช้ต้องละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีกว่า ควรมีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่าย และไม่เป็นพิษ

$$A_{aq} \longleftrightarrow A_{org}$$

เมื่อ A คือ สารที่ต้องการสกัด (analyte)
aq คือ เฟสน้ำ (aqueous phase)
org คือ เฟสตัวทำละลายอินทรีย์ (organic phase)

การสกัดของเหลวด้วยของเหลวเกี่ยวข้องกับการกระจายของสารระหว่างตัวทำละลายสองชนิดซึ่งจะมีอัตราส่วนคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่ง ค่าคงที่นี้เรียกว่า “ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย” (distribution coefficient หรือ partition coefficient, K_d) เช่น ในการสกัดสาร A จากตัวทำละลายที่1ไปยังตัวทำละลายที่2 แสดงสมการได้ดังนี้

$$K_d = \frac{[A]_{org}\ (\text{g/L หรือ mg/mL})}{[A]_{aq}\ (\text{g/L หรือ mg/mL})}$$

ถ้าค่า K_d > 1 แสดงว่าสาร A ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้ดีกว่าในตัวทำละลายน้ำ
ถ้าค่า K_d < 1 แสดงว่าสาร A ละลายในตัวทำละลายน้ำ ได้ดีกว่าในตัวทำละลายอินทรีย์

การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ 2 จะต้องทำหลายครั้ง โดยใช้ตัวทำละลายทีละน้อย โดยแยกสารได้มากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายในปริมาณที่เท่ากันเพียงครั้งเดียว อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดเรียกว่า กรวยแยก (separatory funnel)

LLE เป็นเทคนิคการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก เพื่อให้สามารถสกัดสารออกมาได้หมดจึงทำให้สารที่สกัดได้มีความเข้มข้นต่ำในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นก่อนนำไปวิเคราะห์จึงมีขั้นตอนในการเพิ่มความเข้มข้นของสาร วิธีที่ใช้อาจเป็นการระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจน หรือการใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) เพื่อให้สารมีความเข้มข้นมากพอใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ข้อเสียของวิธี LLE

- ใช้เวลาในการสกัดนานและต้องวิเคราะห์หลายครั้ง
- การสกัดตัวอย่างทำได้ไม่สมบูรณ์
- ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มากส่งผลให้ต้องมีการทิ้งและกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากนอกจากนี้ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดมีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม
- การเกิดอีมัลชั่นในการเขย่า โดยการสลายของอีมัลชั่นอาจใช้เวลานานหรือมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก นอกจากนี้สารบางส่วนอาจเข้าไปอยู่ในอีมัลชั่นทำให้มีประสิทธิภาพในการสกัดลดลง

2.3 เทคนิค QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)

QuEChERS มาจากอักษรหน้าคำในภาษาอังกฤษว่า quick, easy, cheap, effective, rugged and safe เป็นเทคนิคในการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ที่ รวดเร็ว ง่าย ถูก มีประสิทธิภาพ ทนทานและปลอดภัย มีขั้นตอนการสกัดและการทำความสะอาดสารตัวอย่าง (extraction and clean up) นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช-สัตว์ที่ตกค้าง และสารประเภทอื่นที่มีเมทริกซ์

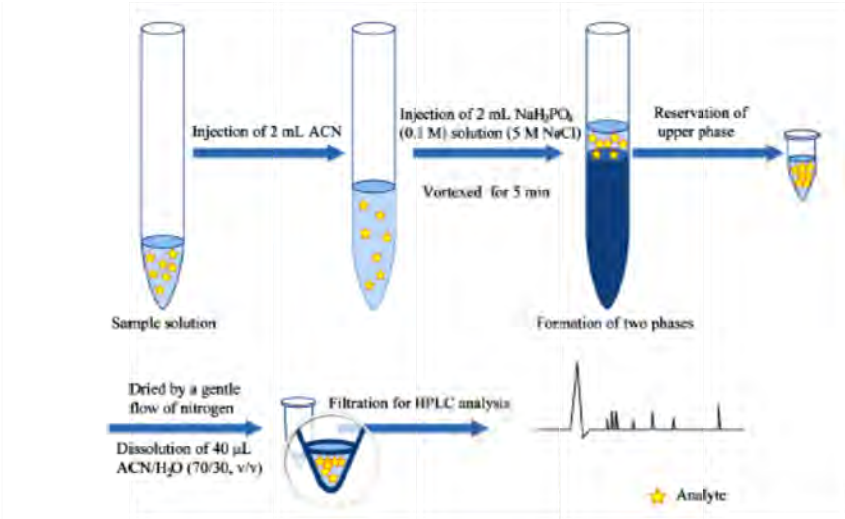
เริ่มจากสกัดสารตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ที่มีเกลือผสมอยู่ (extraction) จะเกิดการแยกชั้นของสารสกัดออกจากสารตัวอย่างโดยง่าย จากนั้นจึงแยกสารละลายสกัดออกมาทำความสะอาดสารสกัดอีกครั้ง โดยใช้ตัวดูดจับที่เหมาะสมเพื่อกำจัดเมทริกซ์ที่หลงเหลือให้หมดไปไม่ให้เข้ามารบกวน โดยวิธีการทำความสะอาดสารสกัดดังกล่าว อาศัยเทคนิคที่ชื่อว่า เทคนิคการสกัดด้วยการกระจายตัวดูดซับของแข็ง (d-SPE) เรียกว่า clean up โดยขั้นตอนของเทคนิค QuEChERS แสดงได้ดังรูปที่ 2-10

รูปที่ 2-8 แผนภาพแสดงขั้นตอนในเทคนิค QuEChERS

ที่มา : http://www.missioncouver.com/yy_zy.asp?newsid=231

2.4 เทคนิค salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE)

เทคนิค salting-out เป็นการเติมอิเล็กโทรไลต์ ให้ชั้นน้ำเพื่อเพิ่มอัตราส่วนการกระจายในสารละลายแต่ละส่วน การที่สารละลายทั้งสองชนิดรวมกันน้อยลงนั้น เกิดจากแรงกระทำระหว่างโมเลกุลอ่อนลง เช่น พันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลสารอินทรีย์หรือพวกไม่เป็นอิเล็กโทรไลต์ กับ น้ำ ทำให้เสียระบบได้ง่าย [1] วิธีการทดลองนี้เผยแพร่เป็นครั้งแรกในปี 1973 โดย Markovich และ Christian เป็นงานวิจัยเกี่ยวกับการแยกระหว่างชั้นน้ำและอะซีโตนในการสกัดคีเลตโลหะ โดยทั่วไปวิธีนี้ใช้สารละลายมีพิษน้อยในปริมาณน้อย รวมถึงใช้เกลือมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย เปรียบเทียบกับการสกัดที่ใช้ของเหลวโดยทั่วไป ข้อดีของวิธี SALLE คือ ใช้สารละลายอินทรีย์ไม่มีขั้วจำนวนน้อย รวมถึงไม่ต้องใช้อุปกรณ์การสกัดที่ยุ่งยากเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด อีกทั้งไม่ต้องมีการระเหยและละลายซ้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่มากพอในการตรวจวัด [2] ซึ่งวิธีในการทดลองเป็นดังภาพที่แสดง รูปที่ 2-6



รูปที่ 2-9 ขั้นตอนการทดลองการทำ salting-out assisted liquid-liquid extraction

ที่มา : Gupta, M.; Jain, Archana.; Verma, K.K. Salt-assisted liquid–liquid microextraction with water-miscible organic solvents for the determination of carbonyl compounds by high-performance liquid chromatography. *Talanta*, **2009**, *80*, 526-531.

จากหลักการที่ได้กล่าวไว้ในงานวิจัยก่อนหน้าทำให้สามารถนำมาเป็นหลักการที่อธิบายได้เพิ่มเติมดังนี้ ในวิธีการสกัดแบบ SALLE นั้นจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายน้ำได้เพื่อให้ตัวทำละลายได้มีโอกาสในการทำละลายกับสารตัวอย่างได้มากขึ้น อีกทั้งยังมีโอกาสทำละลายได้กับสารตัวอย่างที่มีขั้วมากซึ่งถ้าใช้การสกัดแบบ LLE นั้นอาจจะไม่สามารถทำละลายสารตัวอย่าง จากนั้นในการทดลองจะมีใส่เกลือเพื่อทำให้เกิด salting-out โดยเกลือที่ใช้จะเป็นเกลือที่สามารถละลายน้ำได้ เกลือจะมีการดึงให้น้ำไปทำละลายตัวมันด้วยแรงพันธะไอออนิก ซึ่งเมื่อน้ำทำละลายเกลือแล้ว ก็จะเกิดความอิ่มตัวไม่สามารถทำละลายสารตัวอย่างได้อีกก็จะเกิดการผลักให้สารตัวอย่างขึ้นไปอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้ อีกทั้งในการใส่เกลือจะทำให้เกิดการแยกเฟสระหว่างชั้นน้ำกับชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้เพราะเกลือจะไปทำให้พันธะระหว่างน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มีแรงในการจับกันน้อยลงจึงทำให้เกิดการแยกชั้นได้ คือการเกิด phase induced ซึ่งเทคนิค SALLE นั้นน่าจะมีการพัฒนาได้ในอนาคตต่อไป

2.4.1 ตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อการสกัดด้วยเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่

1) ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด

การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ ส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์จะไม่ละลายน้ำ ซึ่งหลายชนิดมีความแตกต่างกันในเรื่องสภาพขั้วและการละลายน้ำ ในการทดลองนี้ต้องใช้ตัวทำละลายที่สามารถละลายน้ำได้และสามารถละลายสารตัวอย่างได้ รวมถึงต้องมีสภาพขั้วเหมาะสมเพียงพอที่จะทำให้เกิดการแยกชั้นเมื่อทำการสกัดด้วย อีกทั้งยังควรมีการระเหยต่ำ เพื่อป้องกันสารที่ต้องการวิเคราะห์ระเหยจากตัวทำละลายอินทรีย์ เพราะจะทำให้ปริมาณสารที่ตรวจวัดได้เกิดความผิดพลาด

2) ชนิดของเกลือที่ใช้ในการสกัด

การหาชนิดเกลือที่มีความเหมาะสมในการทำให้เกิดการแยกชั้นนั้นสำคัญมาก ต้องคัดเลือกเกลือที่เพิ่ม อิเล็กโทรไลต์ ให้ชั้นน้ำเพื่อให้มีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของสารอินทรีย์และน้ำลดลง รวมถึงต้องเลือกชนิดเกลือที่ไม่ทำให้สารตัวอย่างเกิดการตกตะกอนหรือทำปฏิกิริยาอื่น ๆ กับสารตัวอย่างอีกด้วย

3) ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัด

ปริมาตรของตัวทำละลายนั้นส่งผลถึงความเข้มข้นของสารละลายที่ถูกสกัด ในทางทฤษฎียิ่งใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อน้ำตัวอย่างมากเท่าขึ้น ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในตัวทำละลายอินทรีย์จะเพิ่มขึ้น ทำให้ sensitivity ที่ใช้ในการตรวจวัดดีขึ้นด้วย แต่ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดถ้ามีปริมาตรน้อยเกินไปก็จะทำให้ไม่เกิดการแยกชั้น หรือไม่สามารถพาสารตัวอย่างทั้งหมดขึ้นไปอยู่ในชั้นบน ซึ่งเป็นชั้นสารละลายอินทรีย์ได้

4) ปริมาณเกลือที่ใช้ในการสกัด

ปริมาณเกลือที่เพิ่มขึ้นเป็นการเพิ่ม electrolyte ในชั้นน้ำให้เพิ่มมากขึ้น การแยกชั้นระหว่างชั้นน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้น รวมถึงสารตัวอย่างสามารถขึ้นไปอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้นอีกด้วย

5) เวลาที่ใช้ในการสกัด

เวลาในการสกัดมีความสำคัญ โดยส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัด เนื่องจากเกี่ยวข้องกับกระบวนการเข้าสู่สมดุลของการสกัด โดยที่สภาวะสมดุลจะสกัดสารได้มากสุด เพราะค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (distribution coefficient, K_d) ของสารระหว่าง 3 เฟสจะมีค่าสูงสุด ดังนั้นควรหาเวลาที่เหมาะสมในการเข้าสู่สมดุลของการสกัด เพื่อทำให้สามารถสกัดสารได้มากที่สุด

2.5 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ (Method validation)

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ (Method validation) [18] คือ กระบวนการประเมินวิธีการวิเคราะห์เพื่อยืนยันว่าวิธีการวิเคราะห์นั้น ๆ เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้ตามจุดประสงค์ โดยเป็นการประเมินค่าต่าง ๆ จากการวิเคราะห์

ขั้นตอนและขอบเขตของกระบวนการตรวจประเมินวิธีการวิเคราะห์ได้ถูกกำหนดไว้ โดยองค์กรนานาชาติหลายแห่ง เช่น International Organization for Standardization (ISO), International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH), United States Environmental Protection Agency (EPA), United States Pharmacopeia (USP) เป็นต้น
การศึกษาค่าตัวแปรที่สำคัญ (Key parameter) ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี แบ่งได้ดังนี้

2.5.1 Selectivity หมายถึง ความจำเพาะเจาะจงที่สามารถวัดค่าสิ่งที่ต้องการวัดและ matrix ได้และสามารถอ่านค่าสิ่งที่ต้องการวัดได้ถูกต้องและแม่นยำด้วย เช่น ในการวัดสารละลายตัวหนึ่ง ในสารละลายตัวอย่างนั้นอาจมีสาร a สาร b และสาร c อยู่ สิ่งที่เราต้องการหาคือสาร c แต่เครื่องมือของเราไม่ได้อ่านเพียงค่า c อย่างเดียวเครื่องมือจะอ่านค่าของสารทุกตัวที่สามารถอ่านได้แต่จะรับรอง เฉพาะค่า c เท่านั้นที่ให้ผลถูกต้องและแม่นยำ

2.5.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ค่าสัญญาณของเครื่องมือวัดที่แปรสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ ดังนี้

1) System linearity หมายถึง การทดสอบโดยใช้สารมาตรฐานวัดหาค่าโดยแสดงผลทดสอบเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

2) Method linearity หมายถึง การทดสอบโดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spike sample) โดยแสดงความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง

2.5.3 LOD (limit of detection) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบได้โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของ SD ของ blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ blank

2.5.4 LOQ (limit of quantitation) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบและอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สามารถรายงานค่าได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของ SD ของ blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ blank

2.5.5 Accuracy หมายถึง ค่าที่ได้จากการวัดมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อยเพียงใด โดยทั่วไปจะมีความสัมพันธ์กับค่าความเบี่ยงเบน (bias) คือจะแปรผกผันกับค่าความเบี่ยงเบน (bias) โดยส่วนใหญ่จะดูจากค่า %recovery คือการเติมความเข้มข้นน้อย ๆ ของสารมาตรฐานที่รู้ค่าที่แน่นอน ลงไปในตัวอย่างเพื่อดูค่าคืนกลับของสารมาตรฐานนั้น ๆ

2.5.6 Precision หมายถึง การวัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งแล้วดูว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันหรือไม่ ซึ่งการวัดที่ได้ค่าใกล้เคียงกันไม่ได้หมายความว่าค่าที่วัดได้จะเป็นค่าที่ถูกต้องเสมอไป แบ่งเป็น

1) Repeatability หมายถึง การทดสอบซ้ำ ๆ ภายใต้สภาวะคงที่ ซึ่งการทดสอบจะต้องทำโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน ตัวอย่างเดียวกัน ภาวะแวดล้อมเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน และภายใต้เวลาใกล้เคียงกัน

2) Reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำซึ่งอาจมีความแตกต่างกัน ดังนี้

2.1) Intra-lab reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำโดยอาจจะขยายเวลาในการทดสอบมากขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงผู้ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือ วันที่ทำการทดสอบต่างกัน แต่ห้องปฏิบัติการที่ใช้ทดสอบเป็นห้องปฏิบัติการเดียวกัน

2.2) Inter-lab reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำโดยดูค่าความแปรปรวนที่มีผลต่อความแม่นยำของวิธี เมื่อมีการเปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือ แต่ไม่ได้ทำการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 High performance liquid chromatography (HPLC) ประกอบด้วย
- ระบบไล่ฟองอากาศชนิดสูญญากาศ Agilent 1260 Infinity Series Vacuum Degasser (Agilent Technologies, Germany)
- เครื่องสูบฉีดของเหลว Agilent 1260 infinity Series Quat Pump (Agilent Technologies, Germany)
- เครื่องฉีดสารตัวอย่าง Agilent 1200 Series Autosample (Agilent Technologies, Germany)
- คอลัมน์ Symmetry C18 (3.9mm × 100 mm I.D 3.5 µm particle size)
- เครื่องตรวจวัดชนิดไดโอดแอร์เรย์ 1200 Series Diode Array Detector (Agilent Technologies, Germany)

3.1.2 เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (Model XS, Mettler-Teledo, Inc.,OH., U.S.A.)

3.1.3 ชุดกรองสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (TR-2120, Denver Instrument Company, Gottingen, Germany)

3.1.4 ขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.5 บีกเกอร์ขนาด 25, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.6 ไมโครปิเปต ขนาด 2-20, 50-200 และ 200-1000 ไมโครลิตร (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

3.1.7 ปิเปตแบบปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร (Glasfirn, Germany)

3.1.8 ขวดทรงกระบอกฝาเกลียวพร้อมฝา และ silicone/TPE septum ขนาด 20 มิลลิลิตร

3.1.9 แผ่นกรองเมมเบรนชนิด NYLON ความพรุน 0.2 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์-กลาง 47 มิลลิเมตร (Whatman International Ltd, Maidstone, England)

3.1.10 ชุดกรองสารตัวอย่าง ชนิดเมมเบรน NYLON ความพรุน 0.2 ไมโครเมตร เส้น-ผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร (Chrom Tech, Inc)

3.1.11 ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร (Agilent Technologies, CA., U.S.A.)

3.1.12 หลอดหยด

3.1.13 แท่งแก้วคน

3.1.14 ช้อนตักสาร

3.1.15 ถุงมือยาง

3.1.16 กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 3 มิลลิลิตร (Nipro Thailand Corporation, Ayutthaya, Thailand)

3.1.17 หลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด PP/PE ขนาด 15 มิลลิลิตร (Hycon Plastics Inc.) สำหรับใช้ทำการสกัด

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารละลายมาตรฐาน

- Tetracycline (TC) ≥ 95.0 % (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- Oxytetracycline (OTC) ≥ 95.0 % (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- Chlotetracycline (CTC) ≥ 80.0 % (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- Gemfibrozil (GFZ) ≥ 80.0 % (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- Napoxin (NP) ≥ 80.0 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japan)

3.2.2 ตัวทำละลาย

- เมทานอล (HPLC solvent for analysis), Baker Analyzed, U.S.A.
- อะซิโตไนไตรล์ (HPLC solvent for analysis), Baker Analyzed, U.S.A.
- น้ำบริสุทธ์ (Milli-Q) ผ่านระบบการทำน้ำให้บริสุทธิ์ที่มีความต้านทาน 18.2 MΩ.cm Milli-Q Gradient Millipak Express 40 Filter Unit, 0.22 µm, non-sterile.

3.2.3 Formic acid เข้มข้น (Formic acid analytical reagent grade), Fisher Chemicals, Leicestershire UK.

3.2.4 เกลือ

- Sodium Chloride (NaCl), Carlo Erba reagent, Italy.
- Sodium Sulfate (Na_2SO_4), KANTO chemical co., INC, Tokyo, Japan.
- Magnesium Sulphate anhydrous QP ($MgSO_4$), Panreac Quimica S.A.U. Barcelona, Spain.

- Ammonium Sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) Carlo Erba reagents, Italy.

3.3 การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการทดลอง

3.3.1 สารละลายเฟสเคลื่อนที่

1) สารละลาย กรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 0.1% ในน้ำบริสุทธิ์ (พีเอช 2.5)

ละลาย กรดฟอร์มิก เข้มข้น ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ในน้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตร ปรับพีเอชด้วยกระดาษ universal indicator ให้สารละลายมีพีเอชอยู่ในช่วง 2-3 แล้วนำไปกรองด้วยชุดเครื่องกรองเฟสเคลื่อนที่ผ่านแผ่นกรองเมมเบรนไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ความพรุน 0.45 ไมโครเมตร

2) อะซิโตไนไตรล์

อะซิโตไนไตรล์บริสุทธ์

3.3.2 สารละลายมาตรฐาน TC, OTC, NP, GFZ และ CTC

1) สารละลายมาตรฐาน TC, OTC, NP, GFZ และ CTC ในเมทานอล ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่งสารมาตรฐาน TC, OTC, NP, GFZ และ CTC หนักประมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดกำหนดปริมาตร ให้มีปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร

2) สารละลายมาตรฐานผสม (Mix standard stock solution) ของสารกลุ่ม tetracycline (TC, OTC และ CTC) NP และ GFZ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรในเมทานอล

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน TC, OTC, CTC, NP และ GFZ ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรสารละ 2 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้ว ให้มีปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร

3) สารละลายมาตรฐานผสม (Mix standard stock solution) ของสารกลุ่ม tetracycline (TC, OTC และ CTC) NP และ GFZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอะซี-โตไนไตรล์

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมในข้อ 2) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และใส่ขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยอะซีโตรไนไตรล์

4) สารละลายมาตรฐานผสมของสาร 5 ชนิด (TC, OTC, CTC, NP และ GFZ) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานผสมในข้อ 2) และ 3) และปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ให้ มีปริมาตรรวมเป็น 1 มิลลิลิตร ใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งคำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง TC, OTC, CTC, NP และ GFZ (Mix standard stock solution) (โมล/ลิตร)

C_2 คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเตรียม (โมล/ลิตร)

V_1 คือปริมาตรของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง TC, OTC, CTC, NP และ GFZ (Mix standard stock solution) (ลิตร)

V_2 คือปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเตรียม (ลิตร)

3.3.3 สารละลายที่ใช้ในการสกัด

สารละลายผสมของสารทั้ง 5 ชนิดในน้ำบริสุทธิ์

ปิเปตสารละลายผสมในข้อ 4) ตามปริมาตรที่จะให้ความเข้มข้นเริ่มต้นตามที่ต้องการสกัด ใส่ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์

3.4 ขั้นตอนการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำ เพื่อวิเคราะห์สารทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Naproxen และ Gemfibrozil ซึ่งอาศัยแนวความคิดจากเทคนิค LLE และ salting-out assisted LLE มาประยุกต์ใช้ เป็นวิธีการเตรียมสารตัวอย่างแบบใหม่ และวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิค HPLC โดยแบ่งแผนการศึกษาออกเป็น 3 ขั้นตอนหลักคือ

1) หาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC

2) หาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างน้ำ

3) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น

รายละเอียดของการทดลองเป็นดังนี้คือ

3.4.1 การหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง ชนิด

โดยเริ่มต้นจากการใช้ภาวะของเครื่องมือดังนี้คือ

คอลัมน์ : Eclipse Plus C18 4.6 x 100 mm, 3.5 µm

เฟสเคลื่อนที่ : A = 0.1% formic acid pH 2-3, B = อะซิโตไนไตรล์

อัตราการไหล : 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : ไดโอดแอเรย์ ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

ปริมาตรการฉีด : 10 ไมโครลิตร

และศึกษาตัวแปรการแยกคือ

1) ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ โดยเลือกใช้

1.1 A = น้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q), B = เมทานอล

1.2 A = 0.1% formic acid pH 2-3, B = เมทานอล

1.3 A = 0.1% formic acid pH 2-3, B = อะซิโตไนไตรล์

2) อัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

ทำการแปรเปลี่ยนอัตราส่วนการผสม %B ที่ 10, 20 และ 30% ตามลำดับ ทำการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยก ค่าการแยก และค่าการตอบสนองสัญญาณที่ดีที่สุดในการแยกสารละลายมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด

3) สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (Calibration curve) และหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสารทั้ง 5 ชนิด (Linearity)

การสร้างกราฟและหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสารทั้ง 5 ชนิด ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นจากการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ นั่นคือ นำสารละลายมาตรฐานผสมมาทำการวิเคราะห์ อาศัยการละลายด้วยตัวทำละลายคือ อะซิโตไนไตรล์ ได้สารละลายมาตรฐานในกลุ่ม Tetracycline มีความเข้มข้น 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐาน Naproxen และ Gemfibrozil ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองหาช่วงความ

เป็นเส้นตรง 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้ง มีการเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่เสมอเพื่อสามารถเลือกค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม ตรวจสอบได้แน่นอนไปใช้ยืนยันความใช้ได้ของวิธีการเตรียมสารตัวอย่าง

3.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างน้ำ

1) ขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่าง

วิธีการเตรียมสารตัวอย่าง มีการทดลองการสกัดตัวอย่างทำดังนี้คือ

1.1 ทำโดยใช้ตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของสาร TC, OTC, NP, GFZ และ CTC เป็น 0.25, 1, 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์พลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร

1.2 เติมตัวทำละลาย 0.5% กรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ 2.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนทริฟิวส์

1.3 เติมเกลือ Na_2SO_4 ปริมาณ 1.00 กรัม

1.4 เขย่าด้วยเครื่อง Vertex 5 นาที

1.5 ตั้งรอให้เกิดการแยกชั้น

1.6 แยกสารละลายชั้นอะซิโตไนไตรล์ออกมา 1.00 มิลลิลิตร โดยการดูดออกด้วยไมโครปิเปต

1.7 กรองสารละลายผ่านตัวกรองเมมเบรนไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ความพรุน 0.2 ไมโครเมตร บรรจุสารละลายที่ผ่านการกรองนี้ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

1.8 นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC

ตัวแปรที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดนี้ ได้แก่ ชนิดและปริมาณของเกลือที่ใช้ในการแยกชั้น เวลาในการเขย่าในช่วงเวลาการสกัด ชนิดและปริมาณของตัวทำละลายที่ทำให้เกิดการแยกชั้น และความเป็นกรด-เบสของน้ำตัวอย่าง

2) ชนิดของตัวทำละลาย

ทำการทดลองตามข้อ 1) แต่ปรับเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายในข้อ 1.2 เป็น เมทานอล, อะซิโตไนไตรล์ ตามลำดับ โดยทำทั้งสิ้น 2 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

3) ปริมาตรของตัวทำละลาย

ทำการทดลองตามข้อ 1) แต่ปรับเปลี่ยนปริมาตรของตัวทำละลายในข้อ 1.2 เป็น 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทำทั้งสิ้น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

4) ชนิดของเกลือ

ทำการทดลองตามข้อ 1) แต่ปรับเปลี่ยนชนิดเกลือ $CaSO_4$, $MgSO_4$, Na_2SO_4 และ $(NH_4)_2SO_4$ ตามลำดับ โดยทำทั้งสิ้น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

5) ปริมาณของเกลือ

ทำการทดลองตามข้อ 1) แต่ปรับเปลี่ยนปริมาณของเกลือ ในข้อ 1.3 เป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัมตามลำดับโดยทำทั้งสิ้น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

6) เวลาในการเขย่าเพื่อสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากน้ำตัวอย่าง

ทำการทดลองตามข้อ 1) แต่ปรับเปลี่ยนเวลาในการเขย่าเพื่อสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากน้ำตัวอย่างในข้อ 2) เป็น 5, 10, 20, และ 30 นาที ตามลำดับโดยทำทั้งสิ้น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

7) ความเป็นกรดของน้ำตัวอย่าง

ทำการทดลองตามข้อ 1) - 6) แต่ปรับเปลี่ยนความเป็นกรดของชั้นอะซีโตไนไตรล์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 0.1 %, 0.5 %, 1 % ของ กรดฟอร์มิกตามลำดับ โดยทำทั้งสิ้น 3 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

3.4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1) ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการสร้างกราฟ

1.1) เตรียมสารกลุ่ม tetracycline ความเข้มข้น 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สาร Naproxen และ Gemifibrozil ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นในช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสารทั้ง 5 ชนิด (linearity) และใช้ตัวทำละลายเป็นตัวทำละลายที่ได้จากภาวะการสกัด โดยใช้น้ำตัวอย่างเป็นน้ำที่ไม่มีสารที่ต้องการสกัดอยู่ ทำการสกัดและฉีดซ้ำ 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้ง เตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่เสมอ

1.2) วิเคราะห์ด้วย HPLC ตามข้อ 3.4.1

1.3) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีกและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ได้ จากการสกัด

2) ความจำเพาะในการวิเคราะห์ (Selectivity)

2.1) ศึกษาจากเวลารีเทนชั่นของสาร (retention time) ที่ได้จากการสกัดสารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และสาร Gemifibrozil ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตัวอย่างเป็นสารที่ต้องการวิเคราะห์ในน้ำบริสุทธิ์ ในน้ำปราศจากไอออน และในน้ำประปา โดยใช้สภาวะการสกัดตามที่ระบุในหน้า 30 ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้ง ทำการสกัดและเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่เสมอ

2.2) วิเคราะห์ด้วย HPLC ตามข้อ 3.4.1

2.3) บันทึกค่าเวลารีเทนชั่น (retention time) เพื่อพิจารณาค่าความจำเพาะในการวิเคราะห์ (selectivity)

3) ความแม่นในการวิเคราะห์ (Accuracy)

3.1) ศึกษาจากร้อยละการได้คืนกลับของสาร (%recovery) ที่ได้จากการสกัดสารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และสาร Gemifibrozil ความเข้มข้น 0.25, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสกัด 3 ช่วงความเข้มข้น และใช้สภาวะการสกัด ตามที่ระบุในหน้า 30 ทำการสกัดซ้ำ 6 ครั้ง ทั้ง 3 ช่วงความเข้มข้น และทำซ้ำ 3 วัน โดยในแต่ละครั้ง ทำการสกัดและเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่เสมอ

3.2) วิเคราะห์ด้วย HPLC ตามข้อ 3.4.1

3.3) บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีกคำนวณหาร้อยละการได้คืนกลับของสาร (%recovery)

4) ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (Precision)

4.1) ศึกษาจากร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ที่ได้จากการสกัดสารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และ สาร Gemifibrozil ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้สภาวะการสกัด ตามที่ระบุในข้อ 3.4.2 ทำการสกัดซ้ำ 6 ครั้ง และทำซ้ำ 3 วัน โดยในแต่ละครั้งทำการสกัดและเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่เสมอ

4.2) วิเคราะห์ด้วย HPLC ตามข้อ 3.4.1

4.3) บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีกคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

5) ประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้น (Preconcentration)

5.1) ทำการสกัดสารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และ สาร Gemifibrozil ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้สภาวะการสกัด ตามที่ระบุในหน้า 18 ทำการสกัดซ้ำ 10 ครั้ง โดยในแต่ละครั้ง ทำการสกัดและเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่เสมอ

5.2) วิเคราะห์ด้วย HPLC ตามข้อ 3.4.1

5.3) บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีก คำนวณค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้น

6) ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีการวิเคราะห์ (Limit of Detection, LOD)

6.1) ทำการสกัดสารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และสาร Gemifibrozil ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้สภาวะการสกัด ตามที่ระบุในหน้า 18 ทำการสกัดซ้ำ 10 ครั้ง โดยในแต่ละครั้ง ทำการสกัดและเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่เสมอ

6.2) วิเคราะห์ด้วย HPLC ตามข้อ 3.4.1

6.3) หาขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์โดยการหาความเข้มข้นของสารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และ สาร Gemifibrozil ที่ทำให้ อัตราส่วน signal ต่อ noise เท่ากับ 3

7) ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

7.1) ทำการสกัดสารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และสาร Gemifibrozil ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้สภาวะการสกัด ตามที่ระบุในหน้า 18 ทำการสกัดซ้ำ 10 ครั้ง โดยในแต่ละครั้ง ทำการสกัดและเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่เสมอ

7.2) วิเคราะห์ด้วย HPLC ตามข้อ 3.4.1

7.3) หาขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์โดยการหาความเข้มข้นของสารกลุ่ม Tetracycline สาร Naproxen และ สาร Gemifibrozil ที่ทำให้ อัตราส่วน signal ต่อ noise เท่ากับ 10

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC ในการแยกสารมาตรฐาน Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Naproxen และ Gemfibrozil

4.1.1 เลือกชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม

การศึกษาหาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยใช้การทดลองเป็นน้ำ และเมทานอล พบว่าสารกลุ่ม Tetracycline ไม่ให้พีก จึงเห็นพีกของ Naproxin และ Gemfibrozil เพียง 2 พีกเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงค่า pK_a ของสาร(ดังที่ได้ให้ข้อมูลไว้ในตารางที่ 1-2) กลุ่ม Tetracycline จะเห็นว่ามีค่า pK_a ประมาณ 3.3 ทำให้เมื่อเฟสเคลื่อนที่มีค่า pH สูงกว่า pK_a ของสารกลุ่มดังกล่าว สารกลุ่มนี้จะเกิดการแตกตัวเป็นไอออนและสามารถให้โปรตอนได้ นอกจากนั้นการที่สารกลุ่ม Tetracycline มีค่า K_{ow} (Octanol-water distribution constant) ต่ำ (ดังที่ได้ให้ข้อมูลไว้ในตารางที่1-2) นั่นคือชอบละลายในน้ำมากกว่าในสารละลายอินทรีย์ จึงเคลื่อนที่ออกมาพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่ ที่มีอัตราส่วนของน้ำสูงกว่าเมทานอลได้เร็ว และออกจากคอลัมน์ไปก่อนโดยไม่เกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่ในคอลัมน์ทำให้ไม่ปรากฏพีกของสารกลุ่มนี้บนโครมาโท-แกรม ดังนั้นจึงต้องเพิ่มความเป็นกรดให้กับเฟสเคลื่อนที่ เพื่อทำให้ไม่เกิดการแตกตัวเป็นไอออนของสารกลุ่ม Tetracycline ในการทดลองจึงเปลี่ยนเป็น 0.1% ของกรดฟอร์มิก ในน้ำ และเมทานอล ผลการทดลองที่ได้คือ มีพีกที่ปรากฏบนโครมาโทแกรม 4 พีก ซึ่งมี 1 พีก ที่มีลักษณะเกิดการแยกของพีก จึงคาดว่าน่ามีการรวมตัวกันของพีก Tetracycline และ Oxytetracycline ทั้งนี้เนื่องจากว่าสภาพความมีขั้วของสารทั้งสองใกล้เคียงกันมาก จึงออกมาในเวลาใกล้เคียงกัน จากการที่สารสองชนิดนี้มีสภาพขั้วใกล้เคียงกันและไม่สามารถแยกพีกทั้งสองออกจากกันได้ จึงได้ทำการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่จาก 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำ และเมทานอล ไปเป็น 0.1% ของกรดฟอร์มิก

ในน้ำและอะซีโตไนไทรล์ เพื่อทำการปรับเปลี่ยนสภาพขั้วให้มีความแตกต่างกันมากขึ้น ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ทั้งสอง ผลการทดลองคือสามารถแยกสารทั้ง 5 ชนิดออกจากกันได้และปรากฏทั้ง 5 พีก บนโครมาโทแกรม ดังนั้นจึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำและอะซีโตไนไทรล์

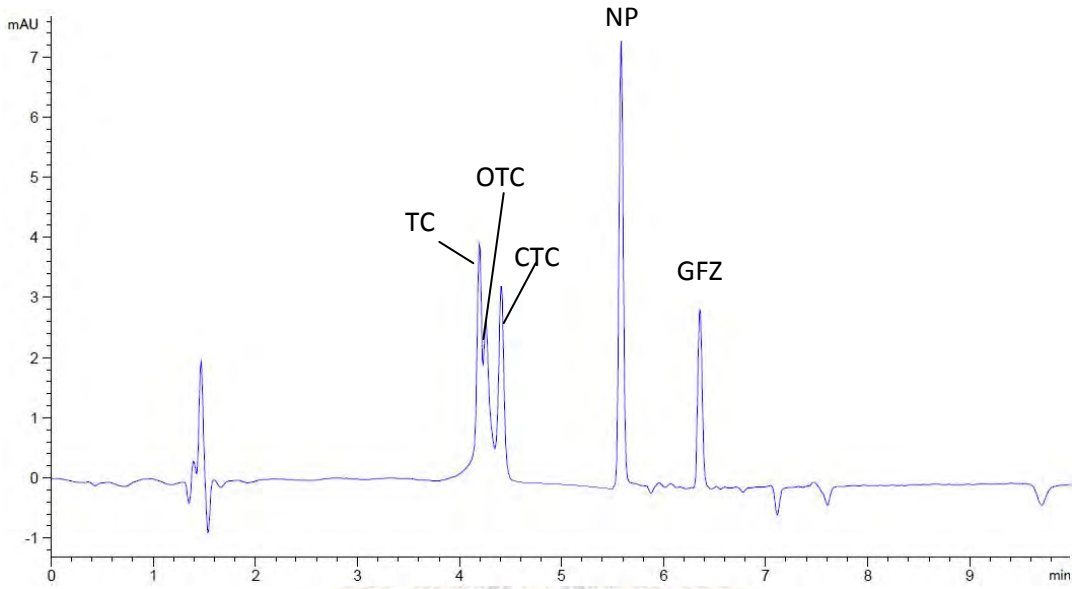
4.1.2 หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำและอะซีโตไนไทรล์ เมื่อทดลองปรับ 0.1% ของกรดฟอร์มิก ในน้ำ และอะซีโตไนไทรล์ ในอัตราส่วนเริ่มต้น 90:10 (%v/v) %B (อะซีโตไนไทรล์) คงที่ที่ 0 ถึงนาทีที่ 1 = 10% นาทีที่ 1 ถึง นาทีที่ 4 %B = 100% จากนั้นให้คงไว้ จนกระทั่งนาทีที่ 10 พบว่าพีกที่ได้ออกมาค่อนข้างช้าและ 3 พีก แรกมีการรวมกัน ดังแสดงในรูปที่ 4-1

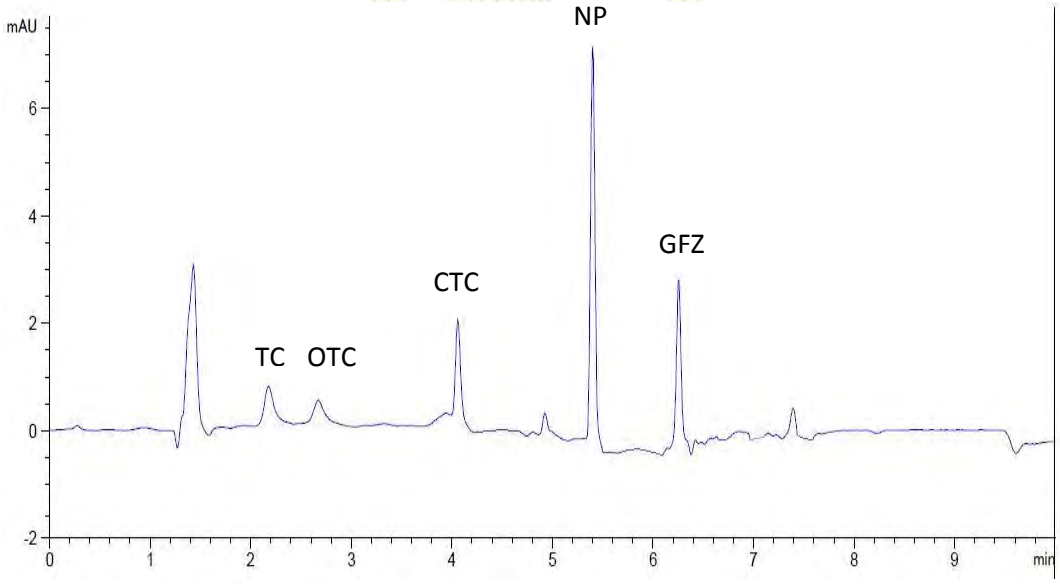
อัตราส่วนเริ่มต้น 80:20 (%v/v) %B (อะซีโตไนไทรล์) คงที่ที่ 0 ถึงนาทีที่ 1 = 20% นาทีที่ 1 ถึง นาทีที่ 4 %B = 100% จากนั้นให้คงไว้ จนกระทั่งนาทีที่ 10 พบว่าพีกที่ได้สามารถแยกกันได้ทั้ง 5 พีกและมีลักษณะพีกที่เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 4-2

อัตราส่วนเริ่มต้น 70:30 (%v/v) %B (อะซีโตไนไทรล์) คงที่ที่ 0 ถึงนาทีที่ 1 = 30% นาทีที่ 1 ถึง นาทีที่ 4 %B = 100% จากนั้นให้คงไว้ จนกระทั่งนาทีที่ 10 พบว่าพีกที่ได้ออกมาเร็วเกินไปทำให้มีการรวมกันระหว่างพีกของสารกับพีกของตัวทำละลาย ดังแสดงในรูปที่ 4-3

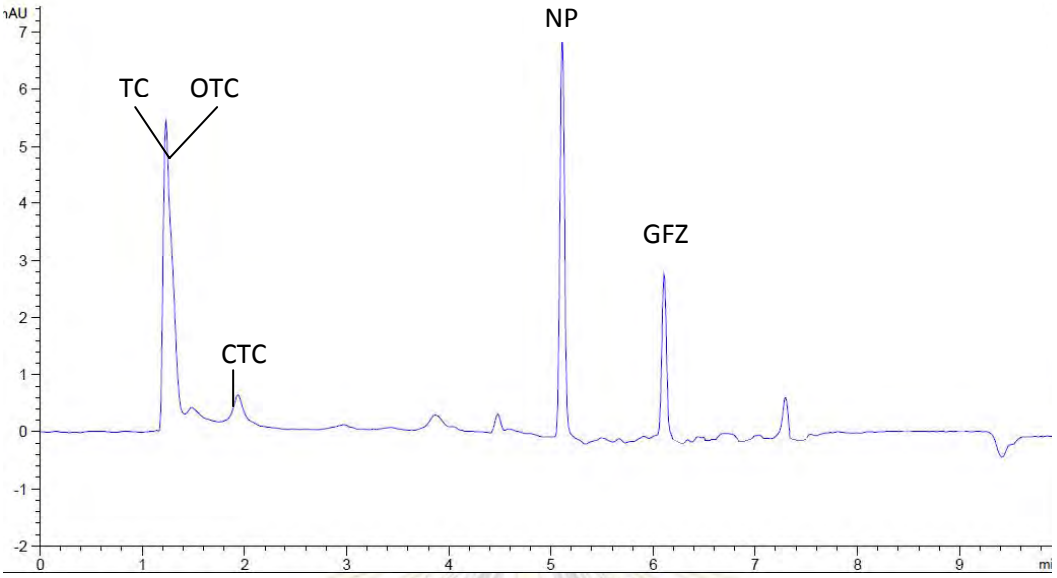
จากการทดลองทั้งหมดนี้จะพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำ และอะซีโตไนไทรล์ ในอัตราส่วนเริ่มต้น 80:20 (%v/v) %B คงที่ที่ 0 ถึงนาทีที่ 1 (อะซีโตไนไทรล์) = 20% นาทีที่ 1 ถึง นาทีที่ 4 %B = 100% จากนั้นให้คงไว้จนกระทั่งนาทีที่ 10 พีกที่ได้มีการแยกกันอย่างชัดเจนของสารทั้ง 5 ชนิด และมีลำดับการแยกดังนี้ Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Naproxen และ Gemfibrozil ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 4-2 และใช้เวลาในการวิเคราะห์สารทั้ง 5 ชนิด เท่ากับ 10 นาที



รูปที่ 4-1 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 5 ชนิดที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนเริ่มต้น 90:10 (%v/v) ของ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำ และอะซีโตไนไทรล์

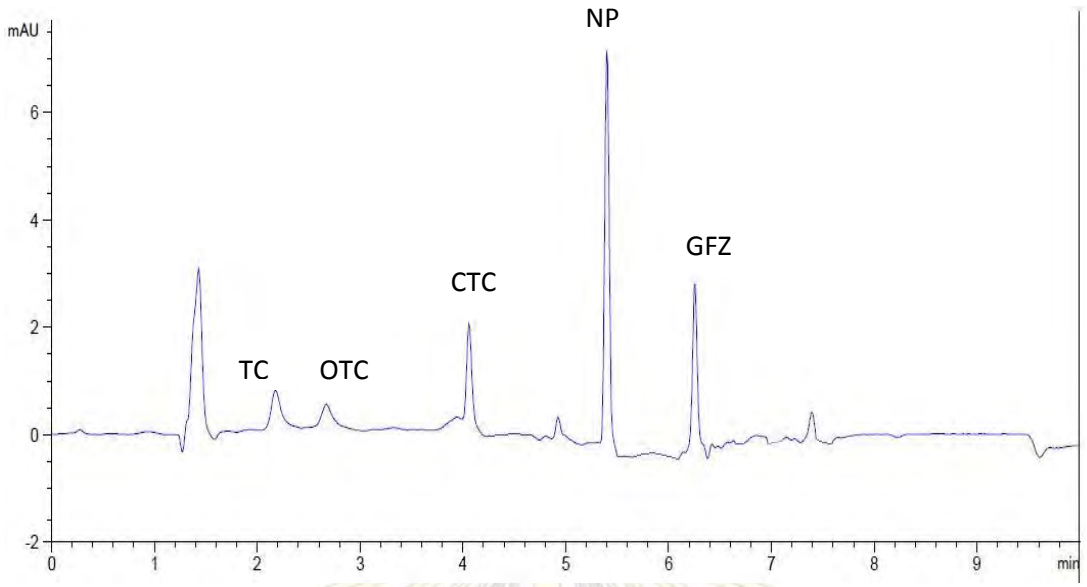


รูปที่ 4-2 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 5 ชนิดที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนเริ่มต้น 80:20 (%v/v) ของ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำ และอะซีโตไนไทรล์



รูปที่ 4-3 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 5 ชนิดที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนเริ่มต้น 70:30 (%v/v) ของ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำ และอะซีโตไนไทรล์

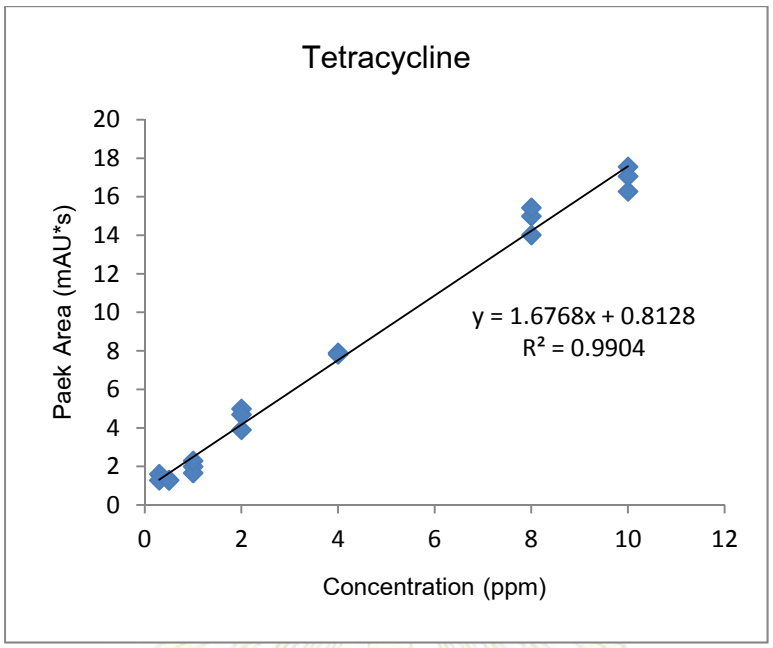
จากลำดับการแยกดังกล่าวพิจารณาได้จากค่า log K_{ow} (ดังที่ได้ให้ข้อมูลไว้ในตารางที่ 1-2) จากข้อมูลนี้สารที่มีค่า log K_{ow} ต่ำ จะเป็นสารที่ชอบละลายในน้ำมากกว่าในสารอินทรีย์ หรือเป็นสารที่มีขั้วมาก ซึ่งสารกลุ่มนี้จะเกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่ได้น้อยกว่า จึงเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์มาพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ส่วนสารที่มีค่า log K_{ow} สูง หรือมีความเป็นขั้วน้อย ก็จะเกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่ในคอลัมน์ได้ดี และเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ช้ากว่าในส่วนของการทดลองนี้ จะแสดงค่า log K_{ow} ของสารทั้ง 5 ชนิด ในตารางที่ 1-2 โดยจะพบว่าสารทั้ง 5 ชนิดมีค่า log K_{ow} จากต่ำไปสูงคือ TC, OTC, CTC, NP และ GFZ ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากว่าสารที่มีค่า log K_{ow} ต่ำกว่าแสดงว่าชอบน้ำมากกว่า มีขั้วมากกว่า ทำให้ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าส่วนสารที่ออกมาช้ากว่าแสดงว่ามีความเป็นขั้วที่น้อยกว่า



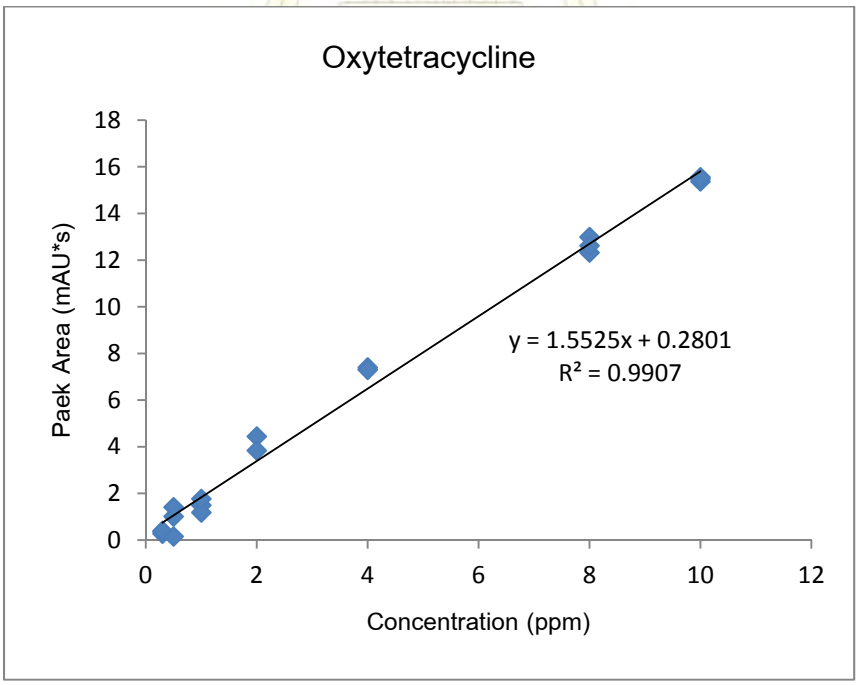
รูปที่ 4-4 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 5 ชนิดที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนเริ่มต้น 80:20 (%v/v) ของ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำ และอะซีโตไนไทรล์

4.1.3 สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) และหาช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) ของการตรวจวัดสารทั้ง 5 ชนิด

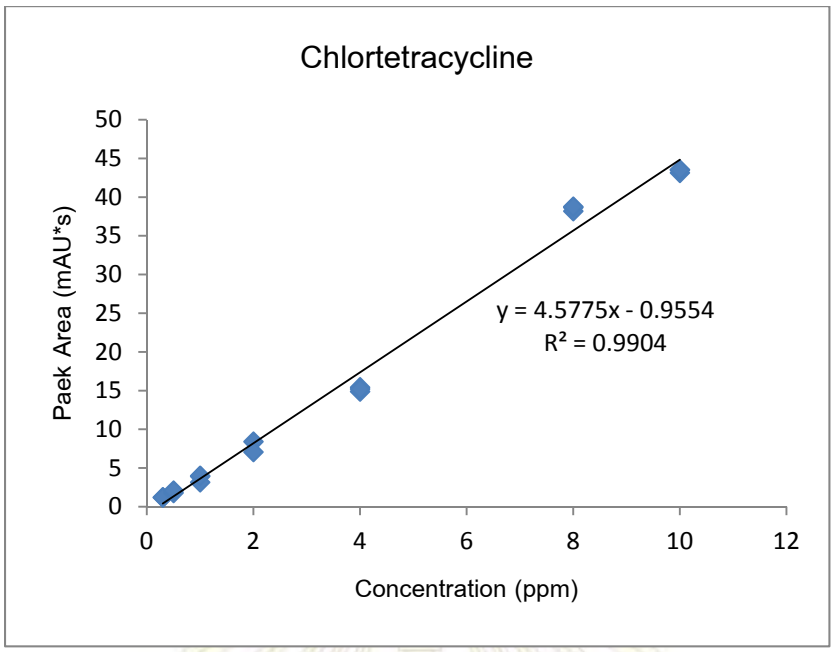
ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรง พบว่าสาร Tetracycline, Oxytetracycline และ Chlortetracycline มีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.30-10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน Naproxen และ Gemfibrozil มีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.10-10.00 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยสารทั้ง 5 ชนิดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.9900 ดังแสดงในรูปที่ 4-5 ถึง 4-9



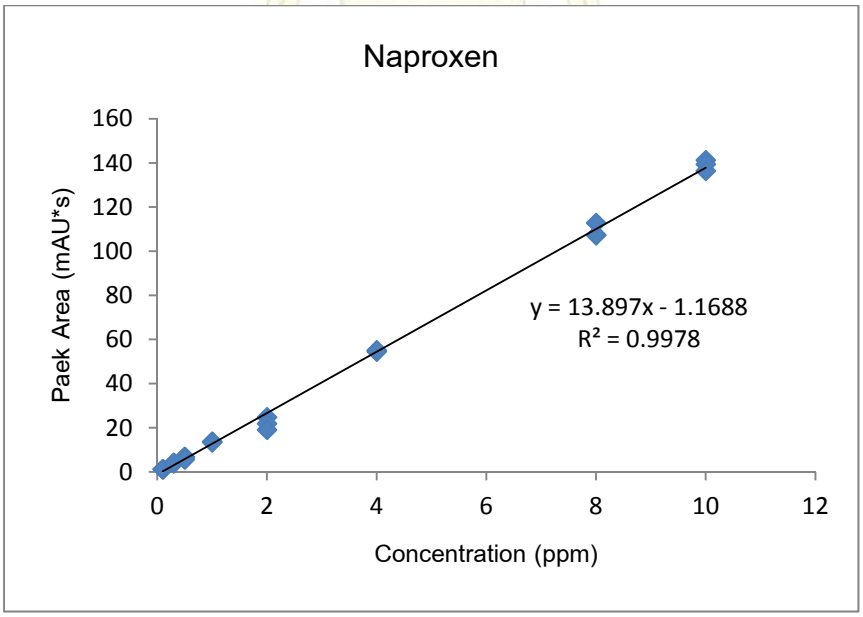
รูปที่ 4-5 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Tetracycline กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3)



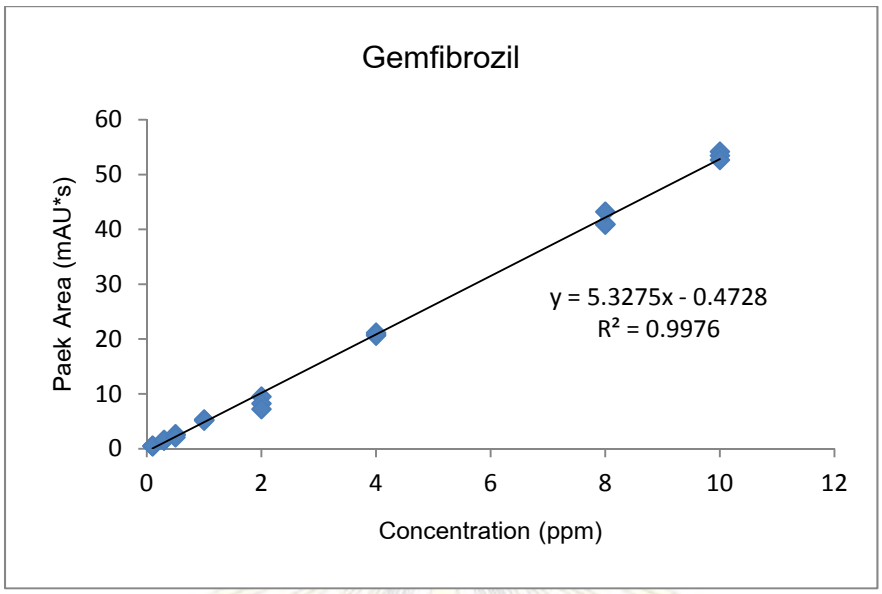
รูปที่ 4-6 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Oxytetracycline กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3)



รูปที่ 4-7 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Chlortetracycline กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3)



รูปที่ 4-8 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Naproxen กับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3)



รูปที่ 4-9 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของGemfibrozilกับความเข้มข้นที่ยังไม่ผ่านการสกัด (n=3)

4.1.4 ประเมินความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาได้จากข้อ 4.1.1 ถึงข้อ 4.1.3 ในการแยกสารละลายมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด

ตารางที่ 4-1 แสดงสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์สารแล้ว

ตัวแปร	ภาวะการทดลองที่ใช้
คอลัมน์	Eclipse C18 4.6 x 100 mm, 3.5 µm
เฟสเคลื่อนที่	0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ pH 2-3 : อะซิโตไนไตรล์
อัตราส่วนเริ่มต้น	80 : 20
	นาทีที่ 1 คงที่ %B = 20% นาทีที่ 1 – 4 เพิ่มจาก %B = 20% ไปถึง %B = 100%
เวลาที่ใช้ในการแยก	10 นาที
อุณหภูมิคอลัมน์	30 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจจับ	Diode array ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร
ปริมาตรการฉีด	10 ไมโครลิตร

ผลการประเมินความสามารถของวิธีการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน แสดงได้ตังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 แสดงค่า retention time ของสารทั้ง 5 ชนิด ตามลำดับการแยก

Compound	retention time (min)	RSD ของ t_r
Tetracycline	2.145 ± 0.008	0.363
Oxytetracycline	2.621 ± 0.010	0.398
Chlortetracycline	4.046 ± 0.006	0.136
Naproxen	5.400 ± 0.004	0.075
Gemfibrozil	6.259 ± 0.003	0.051

4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธี salting-out assisted liquid-liquid extraction

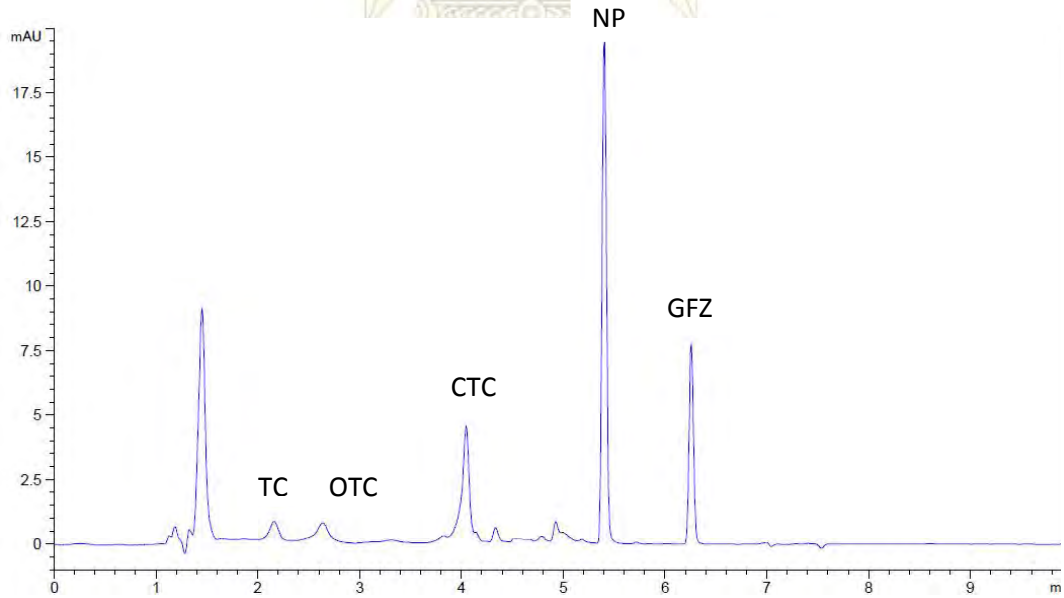
เมื่อได้สภาวะของเครื่องมือที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารทั้ง 5 ชนิดแล้ว จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารด้วยเทคนิคที่ได้ประยุกต์ขึ้นใหม่ เพื่อให้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ ในการเพิ่มความเข้มข้นของสาร และสามารถตรวจวิเคราะห์สารความเข้มข้นต่ำที่ตกค้างในน้ำตัวอย่างได้ โดยสภาวะที่ทำการศึกษามีดังนี้

4.2.1 ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด

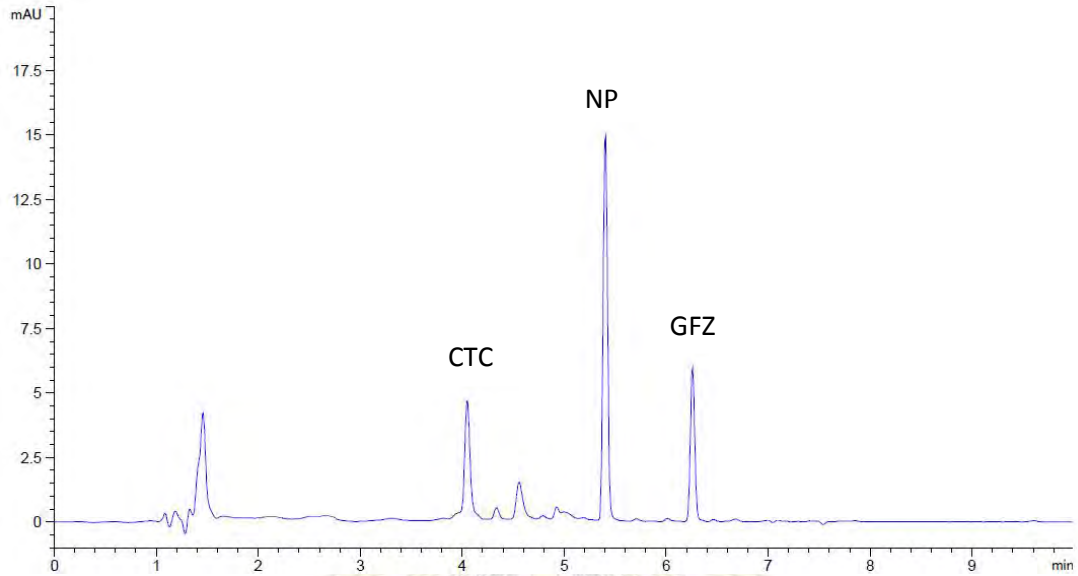
ในการศึกษานี้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดนั้นมี 2 ชนิดคือ เมทานอล และ อะซิโตไนไตรล์ จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายไม่ทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างชั้นน้ำกับชั้นสารละลายอินทรีย์ไม่ว่าจะเพิ่มปริมาณเกลือขึ้นก็ตาม แต่เมื่อทำการทดลองใช้อะซิโตไนไตรล์ที่มีขั้วน้อยกว่าเมทานอล เป็นตัวทำละลายพบว่าทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างชั้นน้ำกับชั้นสารละลายอินทรีย์ทั้งนี้จึงเลือกใช้ อะซิโตไนไตรล์ เป็นตัวทำละลายในการทดลองนี้

4.2.2 ชนิดของเกลือที่ใช้ในการสกัด

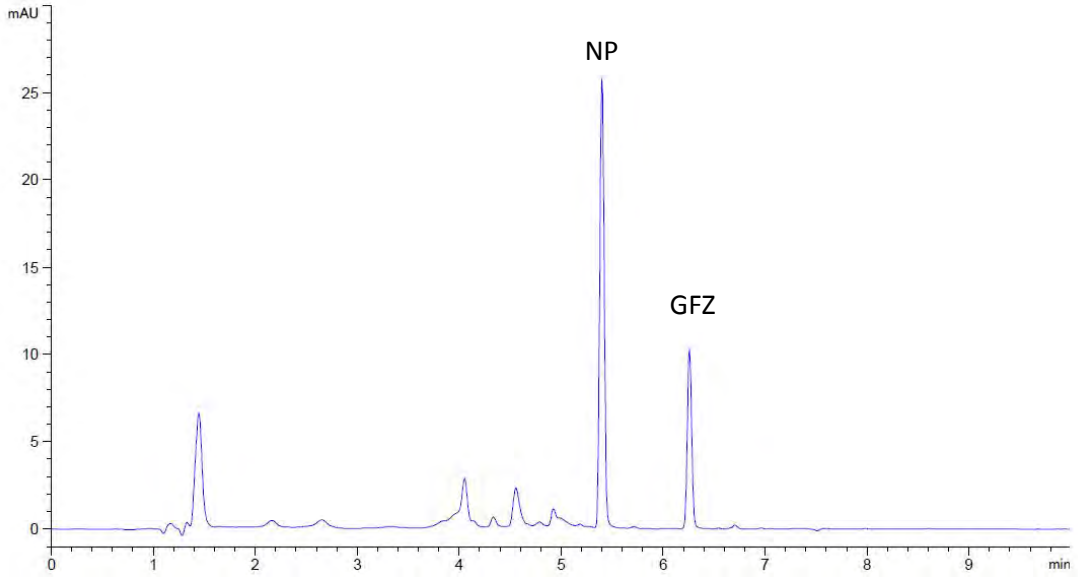
ในการศึกษานี้เกลือที่สนใจนำมาใช้ในการสกัดมี 4 ชนิด คือ Na_2SO_4 , $MgSO_4$, $CaSO_4$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้าได้มีการทดลองใช้จึงได้นำมาใช้ในการศึกษานี้ ในการศึกษาเบื้องต้นเป็นการสังเกตการแยกชั้นระหว่างชั้นน้ำกับชั้นสารละลายอินทรีย์ จากผลการทดลองพบว่า เกลือ $CaSO_4$ ไม่ทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างชั้นทั้งสอง แต่ว่าเกลืออีก 3 ชนิด คือ Na_2SO_4, $MgSO_4$ และ $(NH_4)_2SO_4$ ทำให้เกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจาก $CaSO_4$ มีค่า K_{sp} ต่ำทำให้มีการละลายในน้ำน้อยและส่งผลทำให้ค่า Ionicity ของชั้นตัวทำละลายกับน้ำมีค่าไม่สูงพอที่จะทำให้เกิดการแยกชั้น จากนั้นจึงได้มีการทดลองโดยฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะพบว่า มีเกลือเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ให้พีกของสารครบทั้ง 5 ชนิดคือ เกลือ Na_2SO_4 เนื่องจากว่าเกลือ $MgSO_4$ มีแนวโน้มทำให้สารตัวอย่างตกตะกอน และเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ จะเพิ่มการละลายของสารตัวอย่างในชั้นน้ำ ทำให้สารตัวอย่างสูญหายในช่วงของการสกัด จึงเลือกเกลือ Na_2SO_4 ไปทำการศึกษาต่อ ทั้งนี้เกลือชนิดนี้มีข้อดีคือ ราคาถูกกว่าเกลือชนิดอื่น สามารถหาได้ง่าย และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 4-10 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานผ่านการสกัดโดยใช้เกลือของ Na_2SO_4



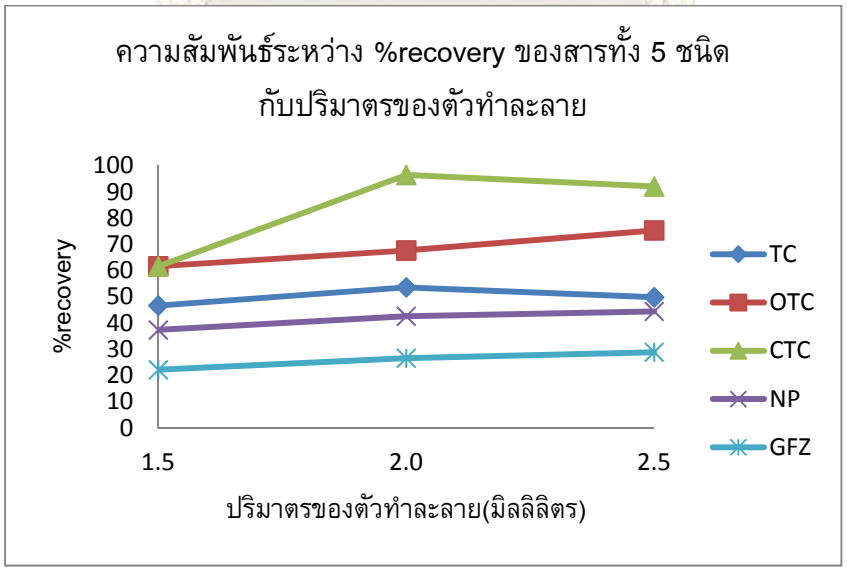
รูปที่ 4-11 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานผ่านการสกัดโดยใช้เกลือของ $MgSO_4$



รูปที่ 4-12 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานผ่านการสกัดโดยใช้เกลือของ $(NH_4)_2SO_4$

4.2.3 ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัด

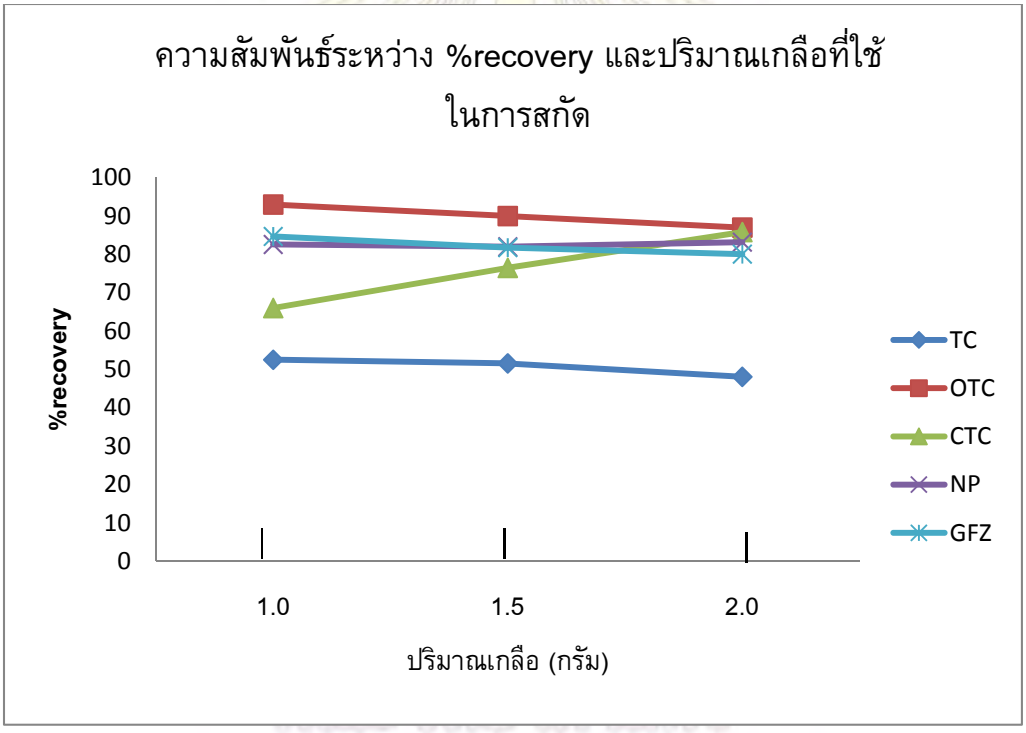
ในการศึกษานี้จะศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัด ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้คือ อะซีโตไนไตรล์ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมีความสำคัญมากต่อการสกัด เพราะว่าปริมาตรที่ใช้จะส่งผลต่อความเข้มข้นของสารละลายที่ถูกสกัด ในทางทฤษฎียิ่งใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อน้ำตัวอย่างมากเท่าขึ้นความเข้มข้นของสารตัวอย่างในตัวทำละลายอินทรีย์ก็จะเพิ่มขึ้น ทำให้ sensitivity ที่ใช้ในการตรวจวัดดีขึ้นด้วย แต่ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดถ้ามีปริมาตรน้อยเกินไป อาจทำให้ไม่เกิดการแยกชั้นหรือไม่สามารถพาสารตัวอย่างทั้งหมดขึ้นไปอยู่ในชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของอะซีโตไนไตรล์ได้ ในการศึกษานี้ได้ศึกษาปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัดที่ 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 มิลลิลิตร ผลการทดลองที่ได้คือที่ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ไม่ทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ จึงพิจารณาปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัดคือ 1.50, 2.00, 2.50 มิลลิลิตร เมื่อพิจารณากราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery ของสารตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด กับปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัด ดังภาพที่แสดงพบว่า ที่ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตรให้ %recovery น้อยที่สุด ทั้งนี้เพราะปริมาตรของสารละลายอินทรีย์ที่ใช้นั้นไม่เพียงพอต่อการพาสารตัวอย่างทั้งหมดขึ้นมาอยู่ในชั้นของตัวทำละลายที่ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร พบว่าสารตัวอย่างส่วนใหญ่มี %recovery สูงที่สุด จึงเลือกใช้ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัดนี้ในการทำการสกัดต่อไป



รูปที่ 4-13 ความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery ของสารตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด กับปริมาตรของตัวทำละลาย

4.2.4 ปริมาณเกลือที่ใช้ในการสกัด

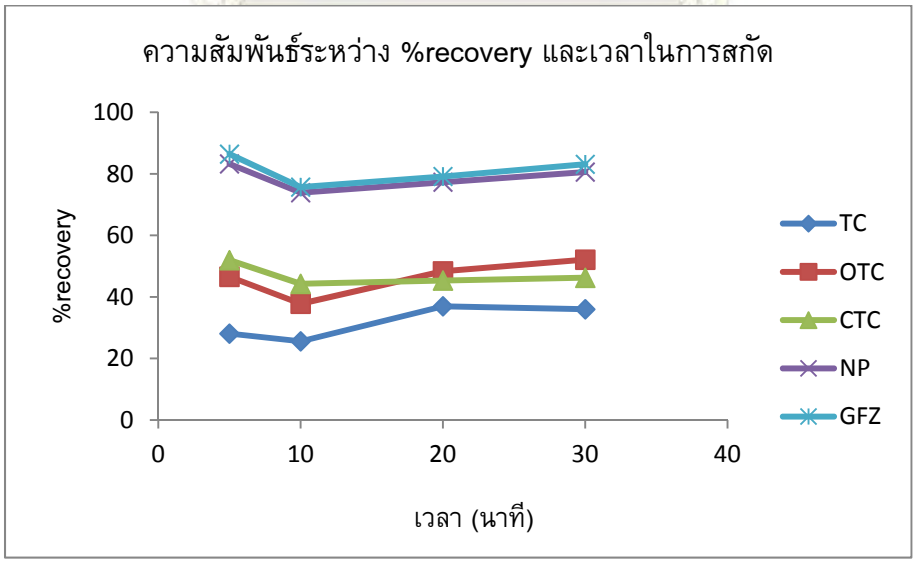
ในการศึกษานี้จะศึกษาปริมาณเกลือที่ใช้ในการสกัด ซึ่งเกลือที่ใช้คือ Na_2SO_4 โดยที่ปริมาณเกลือที่ใช้ในการสกัดจะส่งผลต่อการแยกชั้น ระหว่างชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายได้น้ำได้ และจะทำการศึกษาว่าปริมาณเกลืออาจจะส่งผลต่อ %recovery ในการศึกษานี้จะศึกษาปริมาณเกลือที่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัม ผลการทดลองพบว่าเกลือปริมาณ 0.5 กรัม ไม่ทำให้เกิดการแยกชั้นทั้งนี้เป็นเพราะเกลือไม่สามารถดูดน้ำได้ในปริมาณที่มากพอที่จะทำให้เกิดการแยกชั้น ส่วนปริมาณเกลือที่ 1.0, 1.5, 2.0 กรัม นั้นทำให้เกิดการแยกชั้น แต่เนื่องจากว่าการที่เพิ่มปริมาณเกลือไม่ส่งผลต่อ %recovery ดังภาพที่แสดง ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ปริมาณเกลือที่ใช้สกัด ที่ 1.0 กรัม



รูปที่ 4-14 ความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery ของสารตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด และปริมาณเกลือที่ใช้ในการสกัด

4.2.5 เวลาที่ใช้ในการสกัด

เวลาที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่างจากชั้นน้ำไปยังชั้นตัวทำละลายหรือเวลาในการเขย่าระหว่างชั้นน้ำกับชั้นตัวทำละลายก็มีความสำคัญ เนื่องจากหากใช้เวลาในการเขย่าไม่เพียงพอจะทำให้สารตัวอย่างไม่ขึ้นไปบนชั้นของตัวทำละลาย ทำให้สามารถสกัดสารตัวอย่างได้น้อยกว่าที่มีอยู่จริง หรือถ้าหากใช้เวลาในการเขย่ามากเกินไปอาจทำให้เกิดการสูญเสียสารตัวอย่างได้โดยไม่ขึ้นไปอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ การศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัดเป็น 5, 10, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า หากใช้เวลาชะสาร 5 นาที จะให้ค่า %recovery สูงกว่าที่เวลา 10 นาที เนื่องจากสารตัวอย่างจะสามารถขึ้นไปอยู่ในชั้นตัวทำละลายได้มากที่สุด เพราะถูกรบกวนน้อยกว่าที่เวลา 10 นาที จึงทำให้ %recovery ที่ได้ในเวลา 10 นาทีได้น้อยลง ทั้งนี้เป็นเพราะอาจจะสูญเสียสารตัวอย่างไปในการเขย่า แต่เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 20 และ 30 นาที พบว่ามี % recovery เพิ่มขึ้นได้ไม่มากเท่าที่เวลา 5 นาที ทั้งนี้เป็นเพราะเมื่อเพิ่มเวลาในการเขย่าสารตัวอย่างในชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายได้สัมผัสกันมากขึ้นมีเวลาที่จะทำให้สารตัวอย่างละลายในชั้นตัวทำละลายได้มากขึ้น และอยู่ในสมดุลของการละลายได้มากกว่าดังแสดงในรูปที่ 4-11 แต่เนื่องจากการทดลองจะเห็นได้ว่าที่เวลา 5 นาที จะให้ %recovery สูงที่สุด เพราะเข้าสู่สมดุลเร็วที่สุดและประหยัดเวลาในการสกัดได้มากที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้เวลาในการเขย่าเพื่อสกัดที่เวลา 5 นาที



รูปที่ 4-15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery ของสารตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด และเวลาในการสกัด

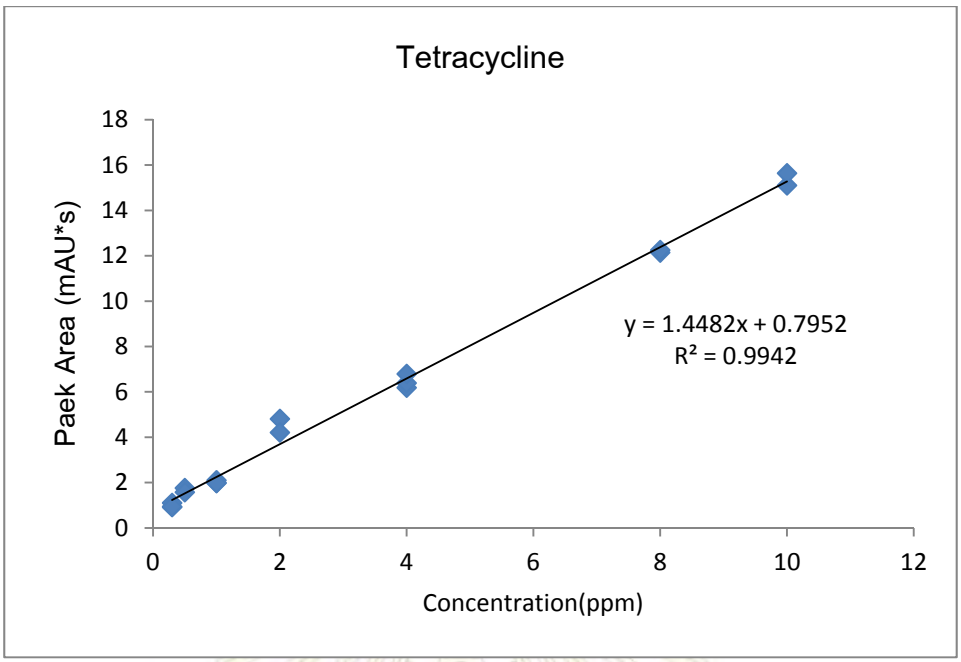
4.2.6 ปริมาณกรดในชั้นตัวทำละลาย

ในการศึกษานี้จะใช้ในการศึกษาการใส่กรดลงไปในชั้นตัวทำละลายหรือ ชั้นอะซีโตไน-ไตรล์ โดยกรดที่ใช้คือ กรดฟอร์มิก ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อดูลักษณะของพีกที่ให้เบสไลน์เรียบที่สุดและรูปร่างของพีกที่ดีที่สุด ในการทดลองคือการใส่ 0.05 % (v/v), 0.1 % (v/v), 0.5 % (v/v) และ 1 % (v/v) ของกรดฟอร์มิกในชั้นอะซีโตไนไตรล์ ผลการทดลองพบว่าจะไม่ส่งผลต่อพีกของ Naproxin และ Gemfibrozil แต่ส่งผลต่ออีก 3 ชนิดที่เหลือ ซึ่ง 0.05 % (v/v) และ 0.1 % ของกรดฟอร์มิกในชั้นอะซีโตไนไตรล์ ทำให้เบสไลน์ของ Chlortetracycline ยกตัวขึ้น แต่ที่ 0.1 % ของกรดฟอร์มิกในชั้นอะซีโตไนไตรล์จะยกน้อยกว่า ส่วนที่ 1 % (v/v) ของกรดฟอร์มิกในชั้นอะซีโตไนไตรล์ทำให้เบสไลน์ของ Tetracycline และ Oxytetracycline ยกขึ้น แต่เบสไลน์ของ Chlortetracycline ค่อนข้างเรียบที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ 0.5 % (v/v) ของกรดฟอร์มิกในชั้นอะซีโตไนไตรล์ ที่จะทำให้เบสไลน์ของสารทั้ง 3 ชนิดมีเบสไลน์ที่เหมาะสม

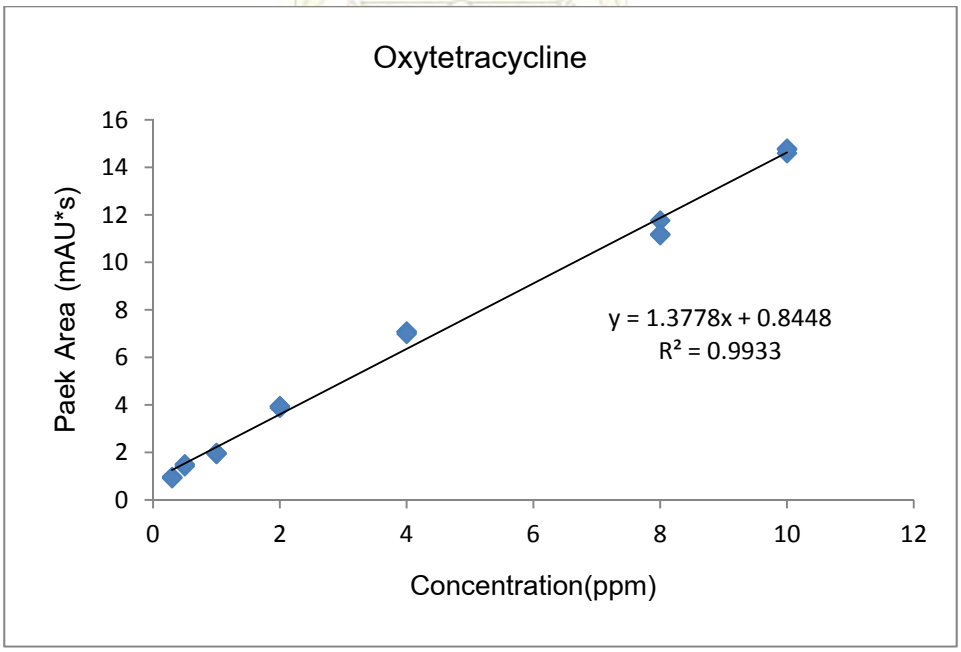
4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

4.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) ของวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve)

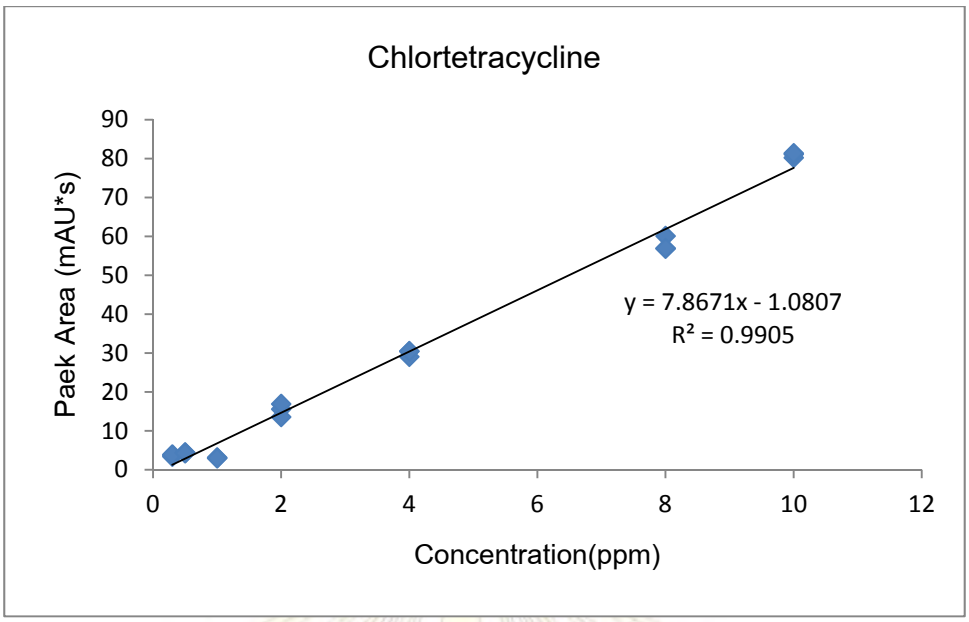
ช่วงความเป็นเส้นตรงสามารถหาได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ตัวทำละลายที่ผ่านการสกัดกับพื้นที่ใต้กราฟ กราฟที่ได้มีลักษณะเป็นกราฟเส้นตรง โดยกลุ่ม Tetracycline มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.3 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สาร Naproxen และ Gemfibrozil มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.1 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารทั้ง 5 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.9900 ดังแสดงในรูปที่ 4-16 ถึง 4-20



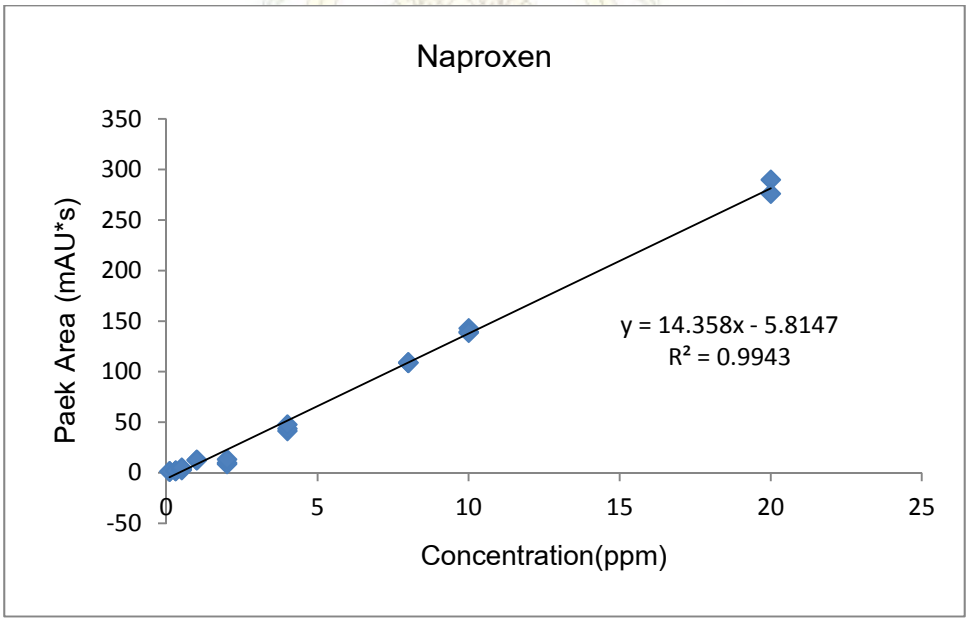
รูปที่ 4-16 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Tetracycline กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3)



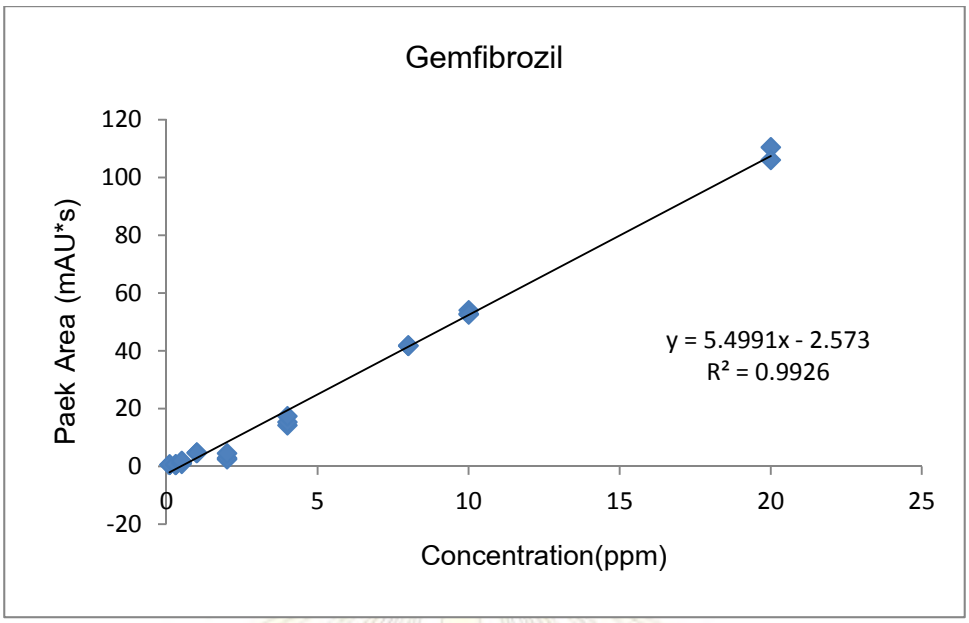
รูปที่ 4-17 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Oxytetracycline กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3)



รูปที่ 4-18 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Chlortetracycline กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3)



รูปที่ 4-19 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Naproxen กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3)



รูปที่ 4-20 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของ Gemfibrozil กับความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลายผ่านการสกัด (n=3)

4.3.2 ความจำเพาะของสาร (selectivity)

ความจำเพาะของสารระบุถึงวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบวิธีในการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้โดยที่ไม่มีผลจากน้ำตัวอย่างมารบกวน โดยพิจารณาค่าเวลารีเทนชั่นของสารตัวอย่างแต่ละชนิด ซึ่งใช้ชนิดของน้ำตัวอย่างที่แตกต่างกันคือ น้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q) น้ำปราศจากไอออน และน้ำประปา ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง 4-3

ตารางที่ 4-3 แสดงความจำเพาะของสารที่น้ำตัวอย่างแตกต่างกัน

สารตัวอย่าง (n=3)	t_r ของสารในน้ำตัวอย่าง		
	น้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q)	น้ำปราศจากไอออน	น้ำประปา
TC	2.194 ± 0.008	2.178 ± 0.003	2.179 ± 0.009
OTC	2.661 ± 0.011	2.651 ± 0.007	2.661 ± 0.002
CTC	4.046 ± 0.006	4.046 ± 0.011	4.057 ± 0.010
NP	5.400 ± 0.004	5.398 ± 0.020	5.396 ± 0.002
GFZ	6.259 ± 0.003	6.269 ± 0.023	6.255 ± 0.002

4.3.3 ความแม่นในการวิเคราะห์ (Accuracy)

ความแม่นของการวิเคราะห์จะระบุถึงความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับค่าจริง หรือจากค่าที่ยอมรับได้ ในการศึกษาความแม่นจะพิจารณาจากค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของสารหลังผ่านการสกัดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นของ Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Naproxen และ Gemfibrozil ใน 3 ช่วงความเข้มข้น คือ 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยทำการสกัดซ้ำ 6 ครั้ง ค่าที่ได้จะคำนวณเป็น %recovery ซึ่งจะใช้ในการบอกความแม่นของวิธีการ สารกลุ่ม Tetracycline จะให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 64.6-114.0% สาร Naproxen จะให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 67.0-86.3% และสาร Gemfibrozil จะให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 61.2-87.2 % ตามเกณฑ์ ที่ AOAC กำหนดไว้ คือ 80.0%-110% จึงถือได้ว่าการสกัดสารกลุ่ม PPCPs ทั้ง 5 ชนิด ด้วยเทคนิคการเตรียมตัวอย่างน้ำที่ได้ประยุกต์ขึ้นใหม่นี้ ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC มีความแม่นสูง สามารถนำวิธีการนี้มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารได้ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 แสดงความแม่นในการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของสารในน้ำตัวอย่าง	สารตัวอย่าง	%Recovery(n=6)			ช่วงการยอมรับ (AOAC)
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	
1 ppm	1. TC	75.1	86.7	75.0	80.0-110%
	2. OTC	114	104	100	
	3. CTC	86.9	85.2	99.7	
	4. NP	67.0	74.4	67.0	
	5. GFZ	68.3	68.0	63.6	
4 ppm	1. TC	72.2	88.8	64.6	
	2. OTC	95.7	112	81.8	
	3. CTC	70.5	60.4	70.0	
	4. NP	86.3	67.9	83.2	
	5. GFZ	87.2	61.2	83.7	

4.3.4 ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (Precision)

การศึกษาความเที่ยงในการวิเคราะห์ เป็นการศึกษาเพื่อตรวจดูความเที่ยงของเทคนิคและเครื่องมือที่มีต่อการตรวจวิเคราะห์ในแต่ละครั้งว่าให้ผลการวิเคราะห์เท่ากันหรือใกล้เคียงกันหรือไม่ เมื่อทำการทดลองหลายครั้ง แสดงถึงความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ การศึกษาความเที่ยงจะพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) ของพื้นที่ใต้พีกของสารแต่ละชนิดหลังผ่านการสกัดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นของ Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Naproxen และ Gemfibrozil ในช่วงความเข้มข้น คือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยทำการสกัดซ้ำ 6 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เกินค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงสูงสอดคล้องกับข้อกำหนดของ AOAC โดยในการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้จากสมการของ Horwitz ดังนี้

$$\text{Limit of } C \text{ \%RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของสารโดยที่หน่วยความเข้มข้นเป็น mg/L (ppm) จะเท่ากับ 10^{-6}

จากสมการดังกล่าว จะได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้ของการสกัดในความเข้มข้นของสารในน้ำตัวอย่างที่ 1 ppm จะเท่ากับ 11 โดยผลของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์แสดงไว้ในตารางที่ 4-5 ซึ่งไม่เกินตามที่มาตรฐานกำหนด

โดยต้องมีการใช้หลักการทางสถิติ ANOVA:Single Factor ที่ความเชื่อมั่นที่ 95% ดังแสดงใน ตารางที่ ข-1 (ภาคผนวก ข.) ค่า RSD ระหว่างวันของสารตัวอย่างทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P-value < 0.05) ดังนั้นจึงต้องมีการคำนวณโดยใช้ สมการ

$$SD_{interday} = \sqrt{SD^2_{within} + SD^2_{between}}$$

$$SD^2_{between} = \frac{\text{between group MS} - \text{within group MS}}{n}$$

$$SD^2_{within} = \text{within group MS}$$

ซึ่งแสดงผลไว้ใน ตารางที่ ข-2 (ภาคผนวก ข.)

ตารางที่ 4-5 แสดงความเที่ยงในการวิเคราะห์

สารตัวอย่าง	%RSD สำหรับ recovery (n=6)			p-value (α=0.05)	interday precision %RSD(n=6)	ช่วงการยอมรับ (AOAC)
	interday					
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3			
1. TC	9.3	8.1	4.3	0.0052	11	11
2. OTC	5.7	7.5	1.3	0.0020	8.7	
3. CTC	6.9	1.2	4.6	0.0001	9.8	
4. NP	3.5	6.4	4.7	0.0033	7.7	
5. GFZ	8.1	7.2	6.8	0.0001	15	

4.4.5 ประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration)

เทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างแบบใหม่อาศัยแนวความคิดจาก SALLE ค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถในการสกัดที่ภาวะต่าง ๆ ในการเลือกความเข้มข้น 2 ช่วงความเข้มข้น คือ 1 ppm และ 4 ppm พบว่า ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 ค่าประสิทธิภาพการเพิ่มความเข้มข้น (preconcentrate) ของสารทั้ง 5 ชนิดด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบใหม่ ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

สารตัวอย่าง	Preconcentration (เท่า)	
	น้ำตัวอย่าง 1 ppm	น้ำตัวอย่าง 4 ppm
TC	1.7	1.8
OTC	2.1	2.3
CTC	1.7	1.2
NP	1.5	1.4
GFZ	1.4	1.2

4.3.6 ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีการวิเคราะห์ (Limit of detection, LOD)

ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ให้ความสูงของสัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (Noise) ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4-7 จะเห็นว่าค่า LOD ที่ได้มีค่าต่ำโดยจะสามารถทำการวิเคราะห์ช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่ามิลลิกรัมต่อลิตรได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการทำการวิเคราะห์และเหมาะที่จะทำการพัฒนาต่อไป

ตารางที่ 4-7 แสดงค่า LOD และ LOQ

สารตัวอย่าง	LOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	LOQ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
TC	0.3	0.9
OTC	0.3	1.0
CTC	0.1	0.2
NP	0.0	0.1
GFZ	0.2	0.5

4.3.7 ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ คำนวณได้จากความสูงของสัญญาณที่ได้รับต่อสัญญาณรบกวน (S/N) เท่ากับ 10 ดังแสดงผลในตารางที่ 4-7 โดยค่า LOQ ที่สามารถวิเคราะห์ได้อยู่ในระดับต่ำกว่ามิลลิกรัมต่อลิตรได้ ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถบอกปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์สารกลุ่ม PPCPs ซึ่งสารที่สนใจในการศึกษานี้คือ สารกลุ่ม Tetracycline (Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline) สาร Naproxen และสาร Gemfibrozil โดยใช้เทคนิค salting-out assisted liquid-liquid extraction เป็นเทคนิคในการเตรียมสารตัวอย่าง แล้วจึงทำการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโท-กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high liquid performance chromatography; HPLC) โดยสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

5.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกด้วยเทคนิค HPLC

แสดงดังตารางที่ 5-1

ตารางที่ 5-1 ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่ม Tetracycline, สาร Naproxen และ สาร Gemfibrozil โดยเทคนิค HPLC

ตัวแปร	ภาวะการทดลองที่ใช้
คอลัมน์	Eclipse C18 4.6 x 100 mm, 3.5 µm
เฟสเคลื่อนที่	0.1% กรดฟอร์มิก ในน้ำ pH 2-3 : อะซิโตไนไตรล์
อัตราส่วนเริ่มต้น	80 : 20 นาทีที่ 1 คงที่ %B = 20% นาทีที่ 1-4 เพิ่มจาก %B = 20% ไปถึง %B = 100%
เวลาที่ใช้ในการแยก	10 นาที
อุณหภูมิคอลัมน์	30 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจจับ	Diode array ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร
ปริมาตรการฉีด	10 ไมโครลิตร
ลำดับการแยก	1. Tetracycline 2. Oxytetracycline 3. Chlortetracycline 4. Naproxin 5. Gemfibrozil

5.2 ภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างแบบใหม่

แสดงดังตารางที่ 5-2

ตารางที่ 5-2 ภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างแบบใหม่

ตัวแปรที่ศึกษา	ภาวะที่เหมาะสม
ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด	อะซิโตไนไตรล์
ชนิดของเกลือที่ใช้สกัด	Na_2SO_4
ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัด	2.50 มิลลิลิตร
ปริมาณเกลือที่ใช้ในการสกัด	1 กรัม
เวลาที่ใช้ในการสกัด	5 นาที
ปริมาณกรดในตัวทำละลาย	0.5 % กรดฟอร์มิกในตัวทำละลาย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

แสดงข้อมูลสรุปดังตารางที่ 5-3

ตารางที่ 5-3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ตัวแปรการตรวจสอบ	ค่าที่ได้จากการทดลอง		
	สารกลุ่ม Tetracycline	สาร Naproxen	สาร Gemfibrozil
ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ (Linearity)	0.3-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น (r^2)	มากกว่า 0.99 (n=3)	มากกว่า 0.99 (n=3)	มากกว่า 0.99 (n=3)
ความแม่นในการวิเคราะห์ (Accuracy)	%recovery = 65.0%-114%	%recovery = 67.0%-86.0%	%recovery = 61.0%-87.0 %
ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (Precision)	%RSD = 1.0-11	%RSD = 0.2-6.4	%RSD = 1.0-8.1
ประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration)	1.7-2.1 เท่า	1.4-1.5 เท่า	1.2-1.4 เท่า
ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีการวิเคราะห์ (LOD)	0.06-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ)	0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียมสารตัวอย่างแบบใหม่นี้อาศัยหลักการจากการใช้ Liquid-liquid extraction และหลักการ QuEChERS เป็นเทคนิคที่ง่ายในการเตรียมสารตัวอย่าง ใช้วิธีการเตรียมที่ไม่ยุ่งยากใช้สารเคมีในปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ที่มีราคาแพง และใช้ได้เพียงครั้งเดียว เช่น ตัวดูดจับต่าง ๆ ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการทำการทดลองได้ และเนื่องจากการทดลองนี้มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อยจึงส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงผู้ทดลองอีกด้วย จากข้อดีของวิธีการเตรียมสารตัวอย่างแบบไปดังที่กล่าวไปข้างต้น จะเห็นได้ว่าเทคนิคนี้เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีความน่าสนใจ ควรมีการศึกษาต่อไปอนาคต เพื่อพัฒนาการเตรียมสารตัวอย่างสารอื่น ๆ ให้มีความครอบคลุมกับสารทั้งหมดในกลุ่ม PPCPs ได้ โดยหวังที่จะให้ผลมีความน่าเชื่อถือเมื่อเทียบกับวิธีการที่ได้รับการยอมรับจากทั่วโลก และเพื่อทำให้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถนำมาใช้ในการเตรียมสารตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ จนนำไปสู่การวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

[1] Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.; Guwy, A. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK.*Water Res.,* **2008**, *42*, 3498-3518.

[2] Yoon, Yeomin.; Ryu, Jaena.; Oh, Jeill.; Choi, B.; Snyder S. Occurrence endocrine disruptors compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea) *Sci. Tolal. Environ.,* **2010,** *408*, 636-643.

[3] Gupta, M.; Jain, Archana.; Verma, K.K. Salt-assisted liquid–liquid microextraction with water-miscible organic solvents for the determination of carbonyl compounds by high-performance liquid chromatography. *Talanta*, **2009,** *80*, 526-531.

[4] Myasein, F.; Kim. E.; Zhang, J.; Wu, H.; El-Shourbagy, T. Rapid, simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid/liquid extraction, and ultrafast LC-MS/MS. *Anal. Chim. Acta.*, **2009**, *651*, 112-116.

[5] Tsai, W.H.; Huang, T.C.; Chen, H.H.; Wu, Y.W.; Huang, J.J.; Chuang H.Y. Determination of sulfonamides in swine muscle after salting-out assisted liquid extraction with acetonitrile coupled with back-extraction by a water/acetonitrile/dichloromethane ternary component system prior to high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*., **2009**, *1217*, 250-255.

[6] Noche,G.G.; Laespada, M.E.F.; Pavon, J.L.P.; Cordero, B.M.; Lorenzo, S.M. In situ aqueousderivatization and determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by salting-out-assisted liquid–liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*., **2011**, *1218*, 6240-6247.

[7] Song, S.; Ediage, E.N.; Wu, A.; Saeger, S.D. Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*., **2012**, *1292*, 111-120.

[8] Wen, Y.; Li, J.; Yang, F.; Zhang, W.; Li, W.; Liao, C.; Chen, L. Salting-out assisted liquid–liquid extraction with the aid of experimental design for determination of benzimidazole fungicides in high salinity samples by high-performance liquid chromatography. *Talanta*, **2013**, 119-126.

[9] Sánchez, M.D.N.; Santos, P.M.; Sappó, C.P.; Pavón, J.L.P.; Cordero, B.M. Microextraction by packed sorbent and salting-out-assisted liquid–liquid extraction for the determination of aromatic amines formed from azodyes in textiles. *Talanta*, **2013**, *119*, 375-384.

[10] Valente, I.M.; Goncalves, L.M.; Rodrigues, J.A. Another glimpse over the salting-out assisted liquid–liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. *J. Chromatogr. A*., **2013**, *1308*, 58-62.

[11] แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, *Principle and Techniques Instrumental Analysis*, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, **2534**

[12] วัชรี ชาตกิตติคุณวงศ์, โครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง, พิมพ์ครั้งที่ 2: สำนักพิมพ์รามคำแหง, **2544**

[13] Krstulovic, A.M., Brown, P.R., Wiley and sons, J., *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice, and Bio Medical Application*, **1982**.

[14] http://www.sec.psu.ac.th/web-board/?pid=view_replies&thread_id=212&forum_id=7 (accessed January 15, 2013)

[15.] ทรงสุดา พร้อมทอง, Sample injection in HPLC, องค์กรศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, **2555**

ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

ตารางที่ ก-1 ความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery ของสารทั้ง 5 ชนิดหลังผ่านการสกัด กับปริมาตรของ ตัวทำละลายที่ใช้ (มิลลิลิตร)

Compounds	ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ (มิลลิลิตร)		
	1.5	2.0	2.5
TC	47	54	50
OTC	62	68	75
CTC	62	96	92
NP	37	43	44
GFZ	22	27	29

ตารางที่ ก-2 ความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery ของสารทั้ง 5 ชนิดหลังผ่านการสกัดกับชนิดเกลือที่ใช้

Compounds	เกลือ Na_2SO_4
TC	47
OTC	62
CTC	62
NP	37
GFZ	22

ตารางที่ ก-3 ความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery ของสารทั้ง 5 ชนิดหลังผ่านการสกัดกับปริมาณเกลือที่ใช้ (กรัม)

Compounds	ปริมาณเกลือที่ใช้(กรัม)		
	1.0	1.5	2.0
TC	53	52	48
OTC	134	130	108
CTC	66	77	86
NP	83	82	83
GFZ	85	82	80

ตารางที่ ก-4 ความสัมพันธ์ระหว่าง %recovery ของสารทั้ง 5 ชนิดหลังผ่านการสกัดกับเวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)

Compounds	เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)			
	5	10	20	30
TC	28	26	37	36
OTC	47	38	48	52
CTC	52	44	45	46
NP	83	74	77	81
GFZ	86	76	79	83

ภาคผนวก ข.

ตารางที่ ข-1 ANOVA สำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่าง 5 ชนิด

ข-1.1

Tetracycline

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
DAY1	6	450.8117	75.13528	48.494
DAY2	6	520.3898	86.73164	48.86672
DAY3	6	449.8579	74.97632	10.24391
			78.94775	

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	545.3769	2	272.6884	7.60251	0.005249	3.68232
Within Groups	538.0232	15	35.86821			
Total	1083.4	17				

ข-1.2

Oxytetracycline

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
DAY1	6	685.0549	114.1758	41.77006
DAY2	6	624.0472	104.0079	60.00344
DAY3	6	597.7295	99.62159	1.751679
			105.9351	

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	668.9042	2	334.4521	9.691907	0.001986	3.68232
Within Groups	517.6259	15	34.50839			
Total	1186.53	17				

ข-1.3

Chlortetracycline

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
DAY1	6	521.1258	86.85431	36.34854
DAY2	6	510.9864	85.1644	1.067589
DAY3	6	598.2919	99.71531	20.81071
			90.57801	

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	759.9802	2	379.9901	19.57809	6.58E-05	3.68232
Within Groups	291.1342	15	19.40895			
Total	1051.114	17				

ข-1.4

Naproxen

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
DAY1	6	402.0988	67.01647	5.60792
DAY2	6	446.1662	74.36103	22.60373
DAY3	6	401.9765	66.99608	9.751867
			69.45786	

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	216.3712	2	108.1856	8.549175	0.003327	3.68232
Within Groups	189.8176	15	12.65451			
Total	406.1887	17				

ข-1.5

Gemfibrozil

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
DAY1	6	409.9357	68.32261	30.82788
DAY2	6	407.9114	67.98524	23.87865
DAY3	6	321.6495	53.60825	13.27004
			63.30537	

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	846.6487	2	423.3243	18.68251	8.47E-05	3.68232
Within Groups	339.8828	15	22.65886			
Total	1186.532	17				

ตารางที่ ข-2 สรุป ข้อมูล ANOVA สำหรับการคำนวณ intraday RSD

สารตัวอย่าง	within group MS	between group MS	$SD^2_{between}$	$SD_{interday}$	Average recovery	interday precision (%RSD)
TC	35.9	272.7	39.47	8.7	78.9	11.0
OTC	34.5	334.5	49.99	9.2	105.9	8.7
CTC	19.4	380.0	60.10	8.9	90.6	9.8
NP	12.7	108.2	15.92	5.3	69.5	7.7
GFZ	22.7	423.3	66.78	9.5	63.3	14.9

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว ศุภนาถ เห็นสว่าง เกิดเมื่อวันที่ 26 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาตอนปลาย สายสามัญ (แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) จากโรงเรียนพระมารดานิจจานุเคราะห์ เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2553 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี 58/628 หมู่บ้านแสงอรุณ หมู่ที่ 7 ซอย รามอินทรา 68 ถนนรามอินทรา แขวงคันนายาว เขตคันนายาว จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10230

นางสาว วิสุทธิพร สุรสิทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 25 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2534 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาตอนปลาย สายสามัญ (แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) จากโรงเรียนพระมารดานิจจานุเคราะห์ เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2553 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี 49/111 หมู่บ้านวังทอง ถ.เสรีไทย แขวงคลองกุ่ม เขตบึงกุ่ม จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10240

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย