



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การหาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลินในกุ่ม
โดยใช้เทคนิคไฮเปอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟี
ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลัสส์แอมเพอโรเมทรี
โดยใช้ขั้วไฟฟ้าเพชรที่โดปด้วยบอรอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พท
วท 15
013273

โดย

อรรรรณ ชัยลภากุล

มีนาคม 2549



รายงานผลการวิจัย

ทฤษฎีดวงกลมสมโภช

การหาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลินในกุ้งโดยใช้เทคนิคไฮเปอร์
ฟอร์แมนส์ลิกวิด โครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิค
ฟลัสแอมเพอโรเมทรีโดยใช้ขั้วไฟฟ้าเพชรที่โคปด้วยบอรอน

โดย

รศ.ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9 ธันวาคม 2549

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนรัชดาภิเษกสมโภช และขอขอบคุณทั้งผู้
บริหาร และเจ้าหน้าที่สำนักบริหารวิชาการ ที่ให้คำปรึกษา และความสะดวกมาโดยตลอด



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยทำการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของเทอร์ไซคลิน ออกซิเทอร์ไซคลิน คลอเทอร์ไซคลินและด็อกซิไซคลิน โดยใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ โดยใช้การตรวจวัดแบบไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่าขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิดให้ผลของไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ชัดเจน ได้ทำการศึกษาคิวแปรที่เหมาะสมของเทคนิค PAD เมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิดโดยใช้ระบบ HPLC สภาวะของระบบ HPLC คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 2.5 และอะซิ-โทไนไตรล์ ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตรและคอลัมน์ที่ใช้คือ C_{18} ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการศึกษาด้านเทคนิค HPLC-PAD สำหรับวิเคราะห์สารกลุ่มเทอร์ไซคลินโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิด พบว่าขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ต่ำกว่า ให้ช่วงการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงกว้างกว่า และให้ความไวสูงกว่าขั้วไฟฟ้าทองคิวแปร PAD ที่เหมาะสมเมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ได้แก่ ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัด 1.5 โวลต์เป็นเวลา 290 มิลลิวินาที ศักย์ไฟฟ้าที่ออกซิเดชัน 2 โวลต์ เป็นเวลา 200 มิลลิวินาที และศักย์ไฟฟ้ารีดักชัน 0.4 โวลต์ เป็นเวลา 200 มิลลิวินาที เทคนิค HPLC-PAD สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเทอร์ไซคลินในกึ่งได้ ความเข้มข้นในการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.1-100 พีพีเอ็ม ที่ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด 0.01-0.05 พีพีเอ็ม ค่าการคืนกลับอยู่ในช่วง 75.0 ถึง 98.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างกึ่งโดยผลที่ได้จากวิธีที่เสนอให้ค่าการคืนกลับสูงกว่ากับวิธีที่วัดตามมาตรฐานเอไอเอซี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

The oxidation of tetracyclines; i.e. tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and doxycycline was investigated at Au and anodized BDD electrodes using cyclic voltammetry. It was found that tetracyclines provided well-defined cyclic voltammogram at both electrodes. The PAD waveform parameters were optimized at both Au and anodized BDD electrodes by HPLC system. The HPLC conditions were carried out using the mobile phase of phosphate buffer (0.01M, pH 2.5) - acetonitrile (80:20; v/v) on a C_{18} column at a flow rate of 1.0 mL/min at room temperature. The analytical performance of the Au and anodized BDD electrodes was examined by HPLC-PAD. It was found that the anodized BDD electrode provided lower detection limit, wider linear range and higher sensitivity than the Au electrode. The optimal PAD waveform parameters at the anodized BDD were 1.5 V detection potential (E_{det}) for 290 ms (200 ms delay time and 90 ms integration time), 2.0 V oxidation potential (E_{oxd}) for 200 ms oxidation time (t_{oxd}) and 0.4 V reduction potential (E_{red}) for 200 ms reduction time (t_{red}). HPLC-PAD with the anodized BDD electrode has been successfully applied to determine tetracycline antibiotics in shrimps. The linear concentration range of tetracyclines was 0.1 to 100 ppm with the detection limit of 0.01-0.05 ppm. The recovery was in the range of 75.0 - 98.4% with RSD < 10%. The proposed method was applied to analyse tetracyclines in shrimp samples. The results from proposed method gave higher % recovery than those obtained by AOAC official method.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูปประกอบ	ix
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การทดลอง	4
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	4
2.2 สารเคมี	5
2.3 การทดลอง	
2.3.1 วิธีการทำความสะอาดขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชร	5
2.3.2 วิธีการทำความสะอาดขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอน	6
2.3.3 วิธีการทำความสะอาดขั้วไฟฟ้าแพลทินัม	6
2.3.4 การเตรียมขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชรที่แอนโนไดซ์	6
2.4 การเตรียมสารเคมี	7
2.5 การศึกษาโดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry	7
2.6 การศึกษาโดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry โดยใช้ขั้วทอง	7
2.7 การศึกษาโดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry โดยใช้ขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชร	8
2.8 การศึกษาโดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมทรีร่วมกับระบบ โฟลว์อินเจกชัน	8
2.9 การศึกษาโดยใช้เทคนิค HPLC	8
2.10 การเตรียมสารตัวอย่างกึ่ง	9
2.11 AOAC Official Method (995.09)	9

บทที่ 3 ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง	10
3.1 การศึกษาด้วยเทคนิคไซคลิก โวลแทมเมตรี	10
3.2 การศึกษาผลของพีเอช	12
3.3 การศึกษาชนิดของระบบตัวพา	13
3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมของ Pulse amperometric detection	17
3.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบ HPLC	25
3.6 กราฟมาตรฐานและช่วงความเข้มข้นที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง	28
3.7 ความสามารถต่ำสุดที่ตรวจวัดได้และความสารดต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ))	32
3.8 ค่าความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision)	33
3.9 การนำไปประยุกต์ใช้	38
3.9.1 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้า แอโนไดซ์ โบรอนโคปโคมอนด์	38
3.9.2 เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง HPLC-PAD และวิธีมาตรฐานของ AOAC	39
3.9.3 การหาปริมาณเตตราไฮคลินและสารอนุพันธ์ในสารตัวอย่างกุ้งที่มีจำหน่าย ในท้องตลาด	43
บทที่ 4 บทสรุป	45
เอกสารอ้างอิง	48

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ข้อมูลทางเคมีไฟฟ้าจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ได้จากไซคลิกโวลแทมเมตรีของ 1 มิลลิโมลาร์ OTC, TC, CTC และ DC ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอน โคปโคมอนด์ ที่ภาวะพีเอชต่างๆกัน	12
3.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดเตตราไซคลินและสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค PAD โดยใช้ขั้วไฟฟ้าทอง และขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอน โคปโคมอนด์	25
3.3 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกเตตราไซคลินและอนุพันธ์ด้วยเทคนิค HPLC	26
3.4 แสดงค่า retention time และค่า resolution ของสารในกลุ่มเตตราไซคลินทั้งสี่ชนิด ภายใต้ภาวะที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.2	28
3.5 ค่าพารามิเตอร์จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการแยกสารมาตรฐาน อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน กลอเตตราไซคลิน และค็อกซิโคลิน ด้วย HPLC และตามด้วยการตรวจวัดแบบพัลส์แอมเพอร์โรเมตรีที่ขั้วไฟฟ้าทอง ตามภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 3.2	31
3.6 ค่าพารามิเตอร์จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการแยกสารมาตรฐาน อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน กลอเตตราไซคลิน และค็อกซิโคลิน ด้วย HPLC และตามด้วยการตรวจวัดแบบพัลส์แอมเพอร์โรเมตรีที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอน โคปโคมอนด์ ตามภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 3.2 (n=3)	31
3.7 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้	

ตารางที่	หน้า
ของสารมาตรฐาน อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และค็อกซิไคลิน	32
3.8 ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนของ อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และค็อกซิไคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่งจากการทดลองวันที่หนึ่ง (n=3)	34
3.9 ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนของ อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และค็อกซิไคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่งจากการทดลองวันที่สอง (n=3)	35
3.10 ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนของ อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และค็อกซิไคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่งจากการทดลองวันที่สาม (n=3)	36
3.11 ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนของ อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และค็อกซิไคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่งจากการทดลองระหว่างวัน (inter-day precision, n=3)	37

ตารางที่	หน้า
3.12 ค่าความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจวัดปริมาณ อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และค็อกซิโคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่ง	38
3.13 ผลการวิเคราะห์สารเตตราไซคลินที่ได้จากการใช้วิธีที่ได้รับการพัฒนาร่วม กับตัวตรวจวัดชั่วไฟฟ้าทองและชั่วไฟฟ้าแอนโดซ์โบรอนโคปโดมอนด์	39
3.14 การเปรียบเทียบผลการทดลองจากเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนจากการเติม สารมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง จากวิธีการ HPLC-PAD method และ the AOAC Official method สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างกึ่งฟาร์ม (n=3)	41
3.15 การเปรียบเทียบผลการทดลองจากเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนจากการเติม สารมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง จากวิธีการ HPLC-PAD method และ the AOAC Official method สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างกึ่งทะเล (n=3)	42
3.16 การเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณของเตตรา ไซคลินในสาร ตัวอย่างกึ่งฟาร์มด้วยวิธีการต่างๆ	43
3.17 การเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณของเตตรา ไซคลินในสารตัวอย่างกึ่งทะเลด้วยวิธีการต่างๆ	44

สารบัญรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1.1 แสดง PAD waveform	2
3.1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายเตตราไซคลินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (เส้น b) ในสารละลายผสมของ 0.01 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 2.5) และ อะซิโตไนไทรล์ (อัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร) (เส้น a) ที่ (A) ขั้วไฟฟ้าทอง และ (B) ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที	11
3.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม ในระบบตัวพาต่างๆ a) 20 : 80 acetonitrile : 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5), b) 22 : 78 acetonitrile : 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5), c) 25 : 75 acetonitrile : 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5), d) 30 : 70 acetonitrile:0.1 M phosphate buffer (pH 2.5), and e) 35 : 65 acetonitrile : 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5)	14
3.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม ในระบบตัวพาต่างๆ a) 20 : 80 acetonitrile : 0.04 M Britton Robinson buffer (pH 2.5), b) 30 : 70 acetonitrile : 0.04 M Britton Robinson buffer (pH 2.5), and c) 35 : 65 acetonitrile : 0.04 M Britton Robinson buffer (pH 2.5).	15
3.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม ใน 20:80 acetonitrile : 0.01 M phosphoric acid (pH 2.5) ที่อัตราการไหลของตัวพาต่างๆ a) 0.8 mL min ⁻¹ b) 0.9 mL min ⁻¹ , and c) 1 mL min ⁻¹ .	16
3.5 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าทองเป็นฟังก์ชันของ (a) E_{det} , (b) t_{det} และ (c) I_{int} สำหรับสารละลาย ออกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน	

รูปที่	หน้า
และค็อกซีไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm	18
3.6 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ เป็นฟังก์ชันของ (a) E_{del} , (b) t_{del} และ (c) t_{int} สำหรับสารละลาย ออกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และค็อกซีไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm	19
3.7 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าทองเป็นฟังก์ชันของ E_{oxd} และ t_{oxd} สำหรับ สารละลาย (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) ค็อกซีไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm	21
3.8 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ เป็นฟังก์ชันของ E_{oxd} และ t_{oxd} สำหรับสารละลาย (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) ค็อกซีไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm	22
3.9 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าทอง เป็นฟังก์ชันของ E_{red} และ t_{red} สำหรับสารละลาย (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) ค็อกซีไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm	23
3.10 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์เป็นฟังก์ชัน ของ E_{red} และ t_{red} สำหรับสารละลาย (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) ค็อกซีไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm	24
3.11 (a) โครมาโทแกรมการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของเตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน ออกซิเตตราไซคลิน และค็อกซีไซคลิน ความเข้มข้น 10	

รูปที่

หน้า

- ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากการแยกผ่านคอลัมน์ HPLC และตรวจวัดด้วย
ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (b) โครมาโทแกรมที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน
เตตราไซคลินลงในสารตัวอย่างกึ่ง 27
- 3.12 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน
(c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) คีอกซิไซคลิน ที่ได้จากการแยกผ่านคอลัมน์
และตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าทอง 29
- 3.13 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน
(c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) คีอกซิไซคลิน ที่ได้จากการแยกผ่านคอลัมน์
และตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ 30
- 3.14 แสดงโครมาโทแกรมการแยกเตตราไซคลินและอนุพันธ์ในสารตัวอย่างกึ่งที่มีการฉีดสาร
มาตรฐานความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี HPLC-PAD33 39
- 3.15 แสดงโครมาโทแกรมการแยกเตตราไซคลินและอนุพันธ์ในสารตัวอย่างกึ่งที่มีการ
ฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี มาตรฐาน AOAC 40



บทที่ 1

บทนำ

ยาปฏิชีวนะ เช่น tetracycline ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากจุลินทรีย์หรือได้จากการสังเคราะห์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ ทั้งในคนและสัตว์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากความต้องการใช้ยาปฏิชีวนะมีมากขึ้นทำให้มีการนำยาที่ผลิตไม่ได้มาตรฐานมาจำหน่ายซึ่งนอกจากจะไม่สามารถรักษาโรคติดเชื้อได้แล้วยังอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ จึงได้มีผู้เสนอเทคนิคต่างๆ ในการตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ เทคนิคทางจุลชีววิทยา^{1,2,3} ซึ่งข้อเสียของเทคนิคดังกล่าวคือขั้นตอนการวิเคราะห์ซับซ้อนและสภาพไวของการวิเคราะห์ต่ำ เทคนิคทางเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเช่น เทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี^{4,5,6} ถึงแม้จะให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์สูงแต่มีข้อจำกัดคือผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญสูงและเครื่องมือมีราคาแพง ส่วนเทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมทรี เช่นยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมทรี^{7,8,9,10} และ ฟลูออเรสเซนส์^{11,12,13,14} ส่วนแล้วแต่อาศัยปฏิกิริยาระหว่างสารที่เป็นยาปฏิชีวนะกับสารเคมีชนิดอื่นๆ ซึ่งถ้าปฏิกิริยาเกิดไม่สมบูรณ์ก็จะส่งผลให้ผลการวิเคราะห์มีความผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคทางเคมีไฟฟ้ามาใช้วิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีสภาพไวสูงและมีความเลือกจำเพาะสูงเช่น โพลารอกราฟี แอมเพอโรเมทรีและโวลแทมเมทรี¹⁵

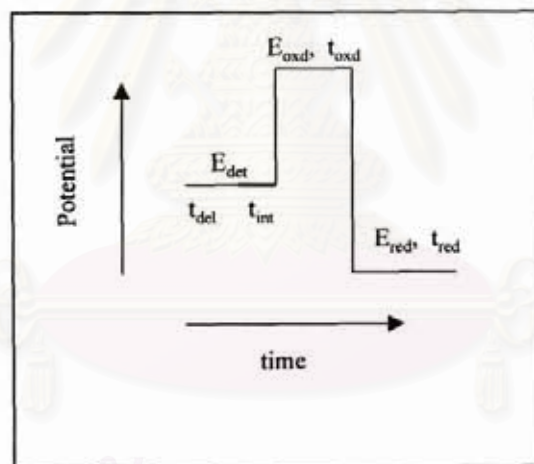
ถึงแม้แอมเพอโรเมทรี จะเป็นเทคนิคที่มีความไว แต่ก็มีข้อเสียคือผิวหน้าอิเล็กโทรดที่สกปรกง่าย โดยเฉพาะเมื่อใช้ขั้วทองเป็นขั้วทำงาน ในงานวิจัยนี้จะแก้ปัญหานี้ โดยการใช้ เทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมทรี^{16,17,18} ซึ่งมีขั้นตอนการทำความสะอาดพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งานในขณะที่ทำการวัด ทำให้สามารถลดขั้นตอนการขัดขั้วไฟฟ้าก่อนที่จะใช้งานครั้งต่อไปได้ ส่งผลให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีสภาพไวสูง เทคนิค PAD ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 1

ขั้นตอนที่ 1 สารที่สนใจถูกออกซิไดซ์ ด้วยศักย์ไฟฟ้าที่เรียกว่า detection potential (E_{det}) ด้วยช่วงระยะเวลา 2 ค่า คือ delay time (t_{del}) และ integration time (t_{int})

ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนที่สารปนเปื้อนต่าง ๆ ที่ติดที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรดจะถูกกำจัดออกไป ด้วยศักย์ไฟฟ้าที่เรียกว่า oxidation potential (E_{oxd}) ด้วยช่วงระยะเวลาที่เรียกว่า oxidation time (t_{oxd})

ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรดจะถูกรีดิวซ์ ด้วยศักย์ไฟฟ้าที่เรียกว่า reduction potential (E_{red}) ด้วยช่วงระยะเวลาที่เรียกว่า reduction time (t_{red})

จากการใช้วิธีนี้ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ในการทำซ้ำดี สภาพไวของการวิเคราะห์สูงขึ้นและขีดจำกัดการวิเคราะห์ที่ต่ำลง นอกจากนี้วิธีนี้ยังนำไปประยุกต์ใช้ได้กับเทคนิคโพลีอินเจกชันได้ ทำให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วขึ้นมาก สามารถวิเคราะห์สารเป็นจำนวนมากในระยะเวลาที่น้อย



รูปที่ 1 แสดง PAD waveform

ในปี 2003, Palaham et al.^{19,20} รายงานการใช้ วิธี pulsed amperometric detection (PAD) โดยใช้

ทองเป็นขั้วไฟฟ้าทำงานพบว่าสัญญาณของ tetracycline เกิดในตำแหน่งเดียวกับสัญญาณของขั้วไฟฟ้าทอง ถึงแม้จะใช้เทคนิค PAD ได้ผลการวิเคราะห์ในการทำซ้ำไม่ดีเท่าที่ควร ในงานวิจัยนี้จึงมีแนวความคิดที่จะใช้ขั้วไฟฟ้าโบรอนโคบอลต์มาเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน แทนขั้วไฟฟ้าทอง เนื่องจากขั้วไฟฟ้าโบรอนโค

โคมอนด์มีช่วงศักย์ไฟฟ้าทำงานกว้างมาก สัญญาณของ tetracycline ไม่เกิดในตำแหน่งเดียวกับสัญญาณของขั้วไฟฟ้าโบรอนโคบอลต์

ขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางโบรอน-โคบอลต์ มีคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าที่ดี และเด่นกว่าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนประเภทอื่น ๆ เช่น ขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนหลายประการ เช่น มีช่วงศักย์ไฟฟ้าใช้งานที่กว้าง เกิดการดูดซับที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าน้อย ให้กระแสพื้นหลังต่ำ และมีเสถียรภาพสูง^{21,22} สามารถนำมาใช้สำหรับศึกษาทางเคมีไฟฟ้าของสารประเภทต่าง ๆ จำนวนมาก เช่น กรดอินทรีย์ ยาชนิดต่าง ๆ^{23,24,25} เป็นต้น อย่างไรก็ตามสารประกอบบางชนิดยังคงให้ศักย์ไฟฟ้าที่สูงจึงจะเกิดปฏิกิริยาได้และถ้ายังคงให้ศักย์ไฟฟ้าที่สูงมาก ๆ กับขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางโบรอน-โคบอลต์ ก็จะทำลายผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าได้ จากเอกสารอ้างอิงพบว่า การแอดไดซ์ผิวของอิเล็กโทรดจะสามารถแก้ปัญหานี้ได้^{26,27,28} ดังนั้นการพัฒนาขั้วไฟฟ้าโดยการดัดแปลงผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะทำให้ได้ขั้วไฟฟ้าที่มีผิวหน้าที่มีประสิทธิภาพที่ดีเหมาะสมกับสารที่สนใจวิเคราะห์ ขั้วไฟฟ้าใช้งานมีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์มากขึ้น เช่น มีความจำเพาะ และมีความไวในการวิเคราะห์ที่สูง นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้นำระบบการแยก เช่น HPLC (High performance liquid Chromatography) ร่วมกับการใช้ขั้ว BDD เป็นขั้วทำงาน เพื่อให้สามารถตรวจสอบสารที่มีความซับซ้อนได้ เนื่องจากเป็นระบบของไหลจึงช่วยลดปัญหาการเกิดการดูดซับของสารประกอบบนผิวของอิเล็กโทรดด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Potentiostat PGSTAT 100

- Personal computer และ Printer พร้อม โปรแกรม AUTOLAB version 4.7
- Air pump (Water RDM Reagent Delivery Module)
- Flow cell (Thin – layer Flow cell)
- Injector ขนาด 20 μ L (Rheodyne Sample Injectors model 7125)
- ขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชร (Boron-doped diamond thin-film electrode)
- ขั้วไฟฟ้า GC (Glassy carbon electrode)
- ขั้วไฟฟ้าแพลทินัม (Pt electrode)
- ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์ / ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl electrode)
- เซลล์แก้วสามคอ (Three neck round-bottom cell)
- ขาดังพร้อมที่จับ
- ขวดวัดปริมาตรขนาด 25, 50, 100, 250, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- ซ้อนค้ำสารและแท่งแก้วคน
- ปิเปตขนาดต่างๆ และลูกยาง
- หลอดหยดสาร
- แผ่นสีกหลาด
- กระดาษทรายเบอร์ 0 และเบอร์ 1000

- ขวดน้ำกลั่น
- ปากคืบ

2.2 สารเคมี

- Tetracycline hydrochloride (Sigma)
- Oxytetracycline hydrochloride (Sigma)
- Chlortetracycline hydrochloride (Sigma)
- Doxycycline hydrochloride (Sigma)
- Potassium dihydrogen orthophosphate (BDH)
- Disodium hydrogen orthophosphate (BDH)
- Phosphoric acid (Merck)
- Diaminetetraacetic acid disodium salt (Fluka)
- Citric acid (J.T.Baker)
- Acetonitrile (HPLC Grade, Merck)
- Methanol (HPLC Grade, Merck))
- 2-Propanol (Analytical Grade, Merck)
- Oxalic acid dihydrate (Merck)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การทำความสะอาดขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชร

1. ขัดด้านซิลิคอน (Si) ด้วยกระดาษทรายละเอียด (เบอร์ 1000) แล้วฉีดล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเพื่อล้างเอาออกไซด์ของซิลิคอนออกจนสะอาด

- นำขั้วไฟฟ้าไป sonicate ในสารละลายผสมของเอทานอลกับน้ำกลั่นปราศจากไอออน ด้วยอัตราส่วน 1:1 ประมาณ 5 นาที
- ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนอีกครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู แล้วนำไปประกอบเข้ากับเซลล์เพื่อทำการทดลองต่อไป

2.3.2 วิธีการทำความสะอาดขั้วไฟฟ้า GC

- หยด alumina slurry ขนาด $1.0 \mu\text{m}$ ลงบนแผ่นสั๊กหลอด 1 หยด แล้วหยดน้ำกลั่นปราศจากไอออนตามลงไปอีก 1 หยด
- ขัดขั้วไฟฟ้า GC ตรงบริเวณที่มี alumina slurry โดยขัดเป็นรูปเลขแปด ประมาณ 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนสะอาด
- ทำเหมือนข้อ 1 แต่เปลี่ยนเป็น alumina slurry ขนาด $0.5 \mu\text{m}$ ขัดขั้วไฟฟ้าอีกครั้ง เหมือนกับข้อ 2 แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู
- ก่อนนำขั้วไฟฟ้า GC ไปใช้ต้องขัดลวดทองแดงที่ต่อกับขั้วไฟฟ้าด้วยกระดาษทรายเบอร์ 0 และเช็ดให้สะอาดด้วยกระดาษทิชชู

2.3.3 วิธีการทำความสะอาดขั้วไฟฟ้าแพลทินัม

- แช่ขั้วไฟฟ้าในกรดไนตริกเข้มข้นประมาณ 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนสะอาดแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู
- ก่อนนำขั้วไฟฟ้าแพลทินัมไปใช้ต้องขัดลวดทองแดงที่ต่อกับขั้วไฟฟ้าด้วยกระดาษทรายเบอร์ 0 และเช็ดให้สะอาดด้วยกระดาษทิชชู

2.3.4 การเตรียม ขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชรที่แอนโด้ซ์

นำขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชร (as-deposited BDD electrode) มาทำการแอนโด้ซ์ในสารละลาย $0.1 \text{ M KOH solution}$. ให้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0 ถึง 2 V เทียบกับ Ag/AgCl โดยใช้เทคนิค cyclic

voltammetry เป็นเวลา 30 นาที หลังจากทำการแอนโนไดซ์ ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนสะอาดแล้วจึงนำไปใช้

2.4 การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารละลาย Stock Standard

สารละลายของ stock standard (1000 $\mu\text{g/mL}$) ของ TC, OTC, CTC and DC ถูกเตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิด 50 mg ใน volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรโดยใช้สารละลายพา (mobile phase)

การเตรียมสารละลายพา

สารละลายพาประกอบด้วย ตัวทำละลาย acetonitrile และสารละลาย phosphate buffer ที่ pH 2.5 (0.01 M H_3PO_4 + 0.1 M Na_2HPO_4) สารละลายจะถูกกรองด้วย Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μ ก่อนใช้

2.5 การศึกษาโดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry

เตรียม 1 mM ของสารละลายมาตรฐาน OTC, TC, CTC และ DC standard solutions ในขวดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรโดยสารละลายพา แล้วนำสารละลายที่เตรียมได้มาศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของ TC, OTC, CTC and DC ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry โดยใช้ขั้วทองและ ขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชร

2.6 การศึกษาโดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry โดยใช้ ขั้วทอง

ขั้วทองแบบ disk ชนิดหมุน (0.07 cm^2) จะถูกใช้เป็นขั้วทำงาน ขั้ว Ag/AgCl เป็นขั้วอ้างอิง แท่งแพลทินัมเป็นขั้วช่วย อุปกรณ์สำหรับหมุนขั้วมีความเร็วรอบ 250 rpm อัตราเร็วในการสแกน 50 mV s^{-1}

2.7 การศึกษาโดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry โดยใช้ ขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชร

ขั้วไฟฟ้าฟิล์มบางของเพชร (พื้นที่ 0.07 cm^2) จะถูกใช้เป็นขั้วทำงาน ขั้ว Ag/AgCl เป็นขั้วอ้างอิง แท่งแพลทินัมเป็นขั้วช่วย อุปกรณ์สำหรับหมุนขั้วมีความเร็วรอบ 250 rpm อัตราเร็วในการสแกน 50 mV s^{-1}

หาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัด ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทำความสะดวกพื้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการกระตุ้นพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าและช่วงเวลาสำหรับแต่ละขั้นตอนของการป้อนศักย์ไฟฟ้าให้กับขั้วไฟฟ้าใช้งานในรูปแบบการป้อนศักย์ไฟฟ้าของ เทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมทรีที่ใช้สำหรับการตรวจวัดยาปฏิชีวนะ โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

2.8 การศึกษาโดยใช้เทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมทรีร่วมกับระบบโพลีอินเจกชัน

หาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัดทำปริมาณวิเคราะห์สาร tetracyclines แต่ละชนิด โดยใช้เทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมทรีร่วมกับระบบโพลีอินเจกชัน ปริมาตรที่ฉีดคือ $20 \mu\text{L}$

2.9 การศึกษาโดยเทคนิค HPLC

เทคนิค HPLC ประกอบด้วย C_{18} column และระบบของไหล (phosphate buffer (pH 2.5) และ acetonitrile) สำหรับแยกสาร tetracyclines 4 ชนิดคือ oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC) และ doxycycline (DC) ปริมาตรที่ฉีดคือ $20 \mu\text{L}$ โดยที่ตัวตรวจวัดคือ เทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมทรี การหาภาวะที่เหมาะสม จะศึกษาชนิดและความเข้มข้นของตัวพาทำการแยกสารมาตรฐาน tetracyclines หลังจากได้ภาวะที่เหมาะสม จะทำการศึกษาสารตัวอย่างจริง การเตรียมสารตัวอย่าง

2.10 การเตรียมตัวอย่างกึ่ง

นำกึ่งตัวอย่างมาปลอกเปลือก แกะส่วนที่คล้ายคลิบและหางออก แล้วนำตัวอย่างกึ่งบดด้วยเครื่องบด นำส่วนที่บดแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส จนถึงเวลาที่จะนำไปวิเคราะห์ การ

เตรียมตัวอย่างกึ่งที่บดแล้วสำหรับการวิเคราะห์ทำได้โดย ชั่งเนื้อกึ่งที่บดแล้วปริมาณ 5 กรัมใส่ใน หลอดเซนติฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ $\text{Na}_2\text{EDTA-MacIlvaine}$ pH 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันด้วยการเซนติฟิวจ์ที่ 366.5 รอบ เป็นเวลา 20 นาที นำส่วน สารละลายที่ได้ไปทำการสกัดด้วยตัวสกัดของแข็ง (solid phase extraction, SPE)

การเตรียม SPE ก่อนนำมาใช้งาน²⁹⁻³⁰ จะต้องทำการกระตุ้นผิวหน้าของวัสดุของแข็งที่บรรจุ ในคาร์tridge ด้วย สารละลายเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำมิลลิคิว อีก 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการเติมสารละลายตัวอย่างลงไป การชะสารตัวอย่างเริ่มด้วยการเติมน้ำมิลลิคิว 10 มิลลิลิตร เพื่อชะเอาสิ่งที่ไม่ต้องการออก แล้วทำการเติมสารละลายเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการชะเตตราไฮคลินออกมา เก็บส่วนสารละลายนี้ไปทำการทดลองต่อไป โดยการนำไปประเหยเอาสารละลายเมทานอลออกด้วยการผ่านก๊าซไนโตรเจน จนเหลือสารละลาย ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เหลือไปกรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน ท้ายสุดนำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตรฉีดเข้าระบบ HPLC

2.11 AOAC Official Method (995.09)

วิธีนี้ใช้สำหรับหาเตตราไฮคลิน คลอเตตราไฮคลิน และ ออกซีเตตราไฮคลิน คอลัมน์ที่ใช้ คือ C_{18} คอลัมน์และระบบสารละลายตัวพาใช้ oxalic acid (0.1 M) – methanol – acetonitrile (60:10:30; v/v) ปริมาตรที่ฉีดคือ 20 μL อัตราเร็วของระบบของไหล คือ 1.0 mL/min โดยใช้ตัว ตรวจวัด UV-Visible detector ที่ความยาวคลื่น 350 nm.

บทที่ 3

ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

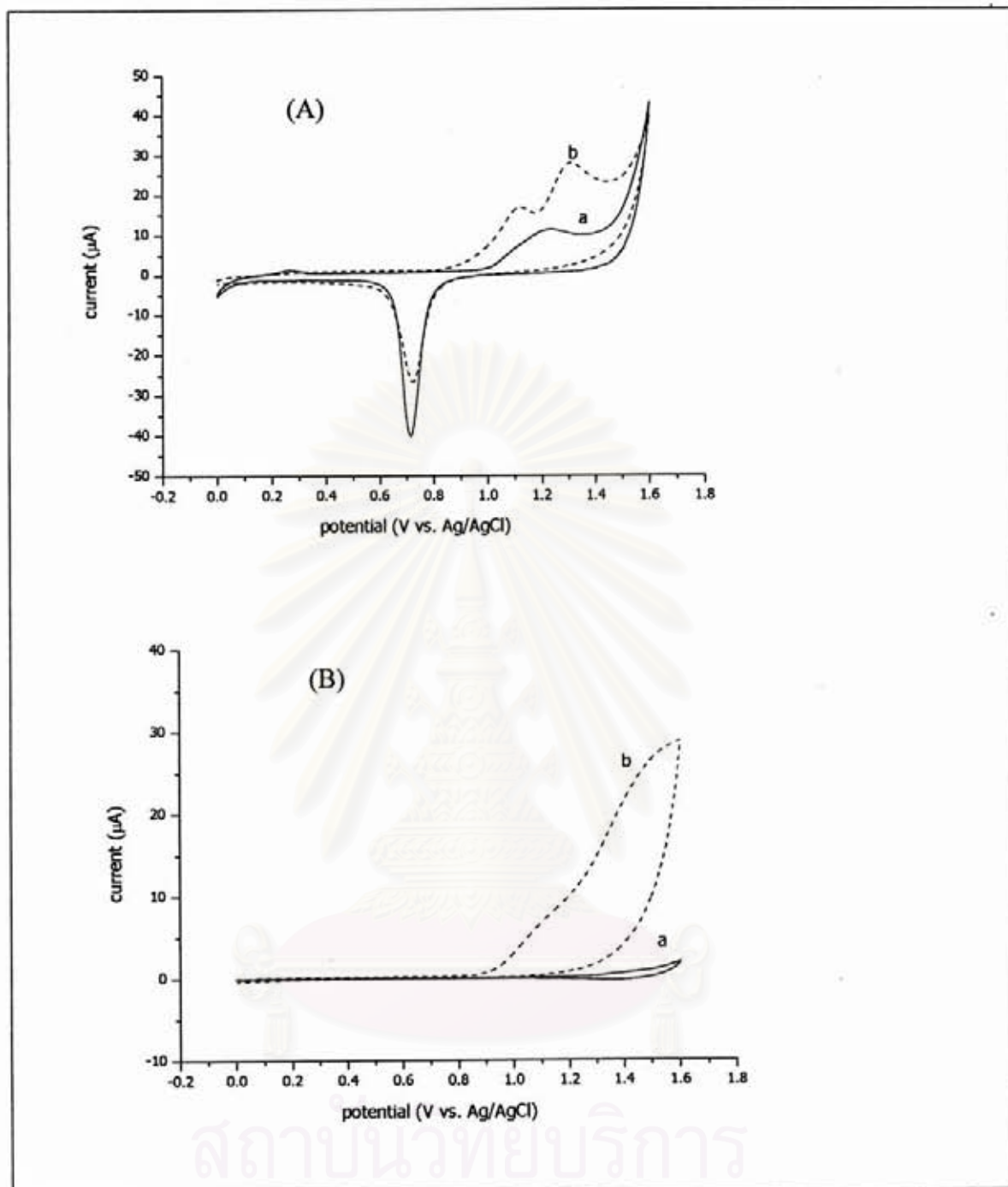
3.1 การศึกษาด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

รูปที่ 3.1A และ 3.1B แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายเตตราไซคลินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และสารละลายผสมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และอะซิโตนไนโตรล์ (อัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร) ที่ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ สำหรับยาปฏิชีวนะตัวอื่นๆ ที่อยู่ในตระกูลเดียวกับเตตราไซคลิน เช่น ออกซิเตตราไซคลิน คลอเตด้าไซคลิน และ คีออกซีไซคลิน ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับเตตราไซคลิน

ที่ขั้วไฟฟ้าทอง เตตราไซคลินให้สัญญาณออกซิเดชันในช่วงศักย์ไฟฟ้าประมาณ +1.0 โวลต์ ถึง +1.3 โวลต์ เมื่อเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ และมีสัญญาณรีดักชันเกิดขึ้นเมื่อทำการสแกนไปทางทิศทางตรงข้ามที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ +0.9 โวลต์ ถึง + 0.5 โวลต์ สัญญาณที่ได้นี้เกิดจากการเกิดออกไซด์ฟิล์มไปเคลือบที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทอง

ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ เตตราไซคลินให้สัญญาณออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +1.2 โวลต์ ถึง +1.6 โวลต์ เมื่อเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ แต่ไม่พบสัญญาณรีดักชันเมื่อทำการสแกนกลับในทิศทางตรงข้ามในช่วงที่ทำการศึกษา คือ +0.8 ถึง 0.0 โวลต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายเตตราไฮคลินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (เส้น b) ในสารละลายผสมของ 0.01 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 2.5) และอะซิโตนไทรล์ (อัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร) (เส้น a) ที่ (A) ขั้วไฟฟ้าทอง และ (B) ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

3.2 การศึกษาผลของพีเอช

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดแคโรทีนอยด์ สารละลายที่มีพีเอช ในช่วง 2-9 ได้ถูกนำมาศึกษาโดยใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ ดังแสดงผลในตารางที่ 1 พบว่าที่พีเอช 2 ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด และค่ากระแสไฟฟ้าจะลดลงเมื่อพีเอชของสารละลายสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากที่ภาวะเป็นกรดแคโรทีนอยด์จะมีประจุบวก และที่ผิวของขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์มีความเป็นขั้วลบ ดังนั้นจึงเกิดอันตรกิริยาคืออิเล็กโทรสแตติกได้ ทำให้ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมีมากกว่าที่ภาวะเป็นเบส อย่างไรก็ตามในระบบการแยกที่ใช้ HPLC วัสดุที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์จะไม่เสถียรเมื่อพีเอชน้อยกว่า 2 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกระบบบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2.5

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางเคมีไฟฟ้าจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ได้จากไซคลิกโวลแทมเมตรีของ 1 มิลลิโมลาร์ OTC, TC, CTC และ DC ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ที่ภาวะพีเอชต่างๆกัน

pH	OTC		TC		CTC		DC	
	E_p (V)	i_p (μ A)	E_p (V)	i_p (μ A)	E_p (V)	i_p (μ A)	E_p (V)	i_p (μ A)
2	1.65	170.20	1.69	161.80	1.54	242.90	1.51	191.30
2.5	1.65	146.60	1.72	130.80	1.57	178.40	1.49	161.50
3	1.61	130.20	1.66	127.80	1.55	173.30	1.47	156.40
3.5	1.60	138.70	1.65	132.50	1.48	154.80	1.43	152.30
4	1.58	142.60	1.60	128.30	1.46	158.70	1.41	155.70
4.5	1.59	138.60	1.60	137.90	1.47	154.10	1.41	149.40
5	1.57	140.80	1.58	137.70	1.46	151.60	1.42	149.00
6	1.58	165.90	1.60	151.60	1.49	178.40	1.37	159.80
7	1.56	163.70	1.56	156.10	1.48	193.50	1.29	169.80
8		-		-	1.38	235.80	1.26	187.60
9		-		-		-		-

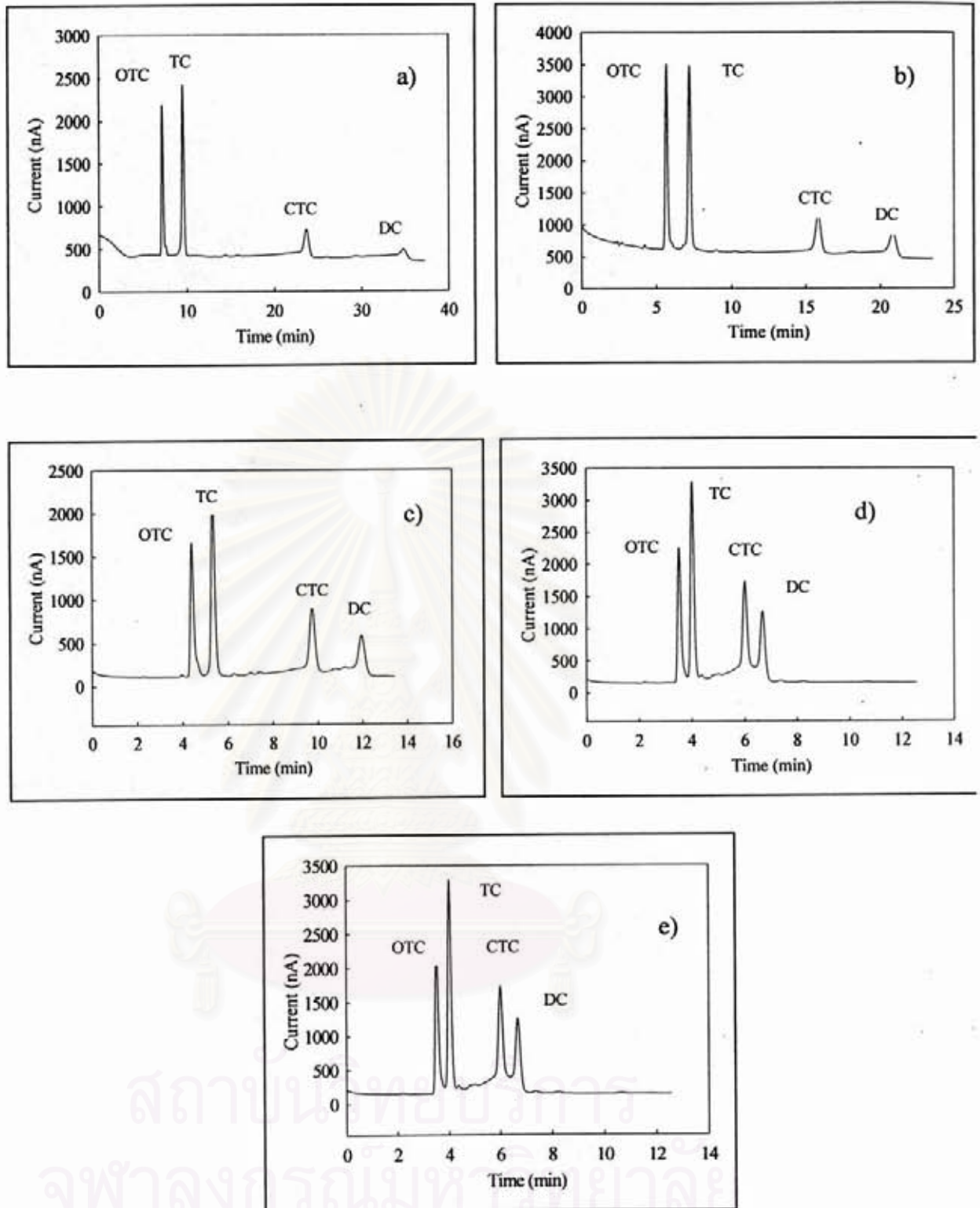
3.3 การศึกษาชนิดของระบบตัวพา

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ระบบบัฟเฟอร์ 3 ระบบ ได้แก่ โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พีเอช 2.5 , บิสเทินโรบินตันบัฟเฟอร์ และกรดฟอสฟอริก พีเอช 2.5 โดยมีเปอร์เซ็นต์ตัวพาต่างๆ กัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.2 และ 3.3 นอกจากนี้ได้ทำการทดลองใช้อัตราเร็วของตัวพาต่างๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.4

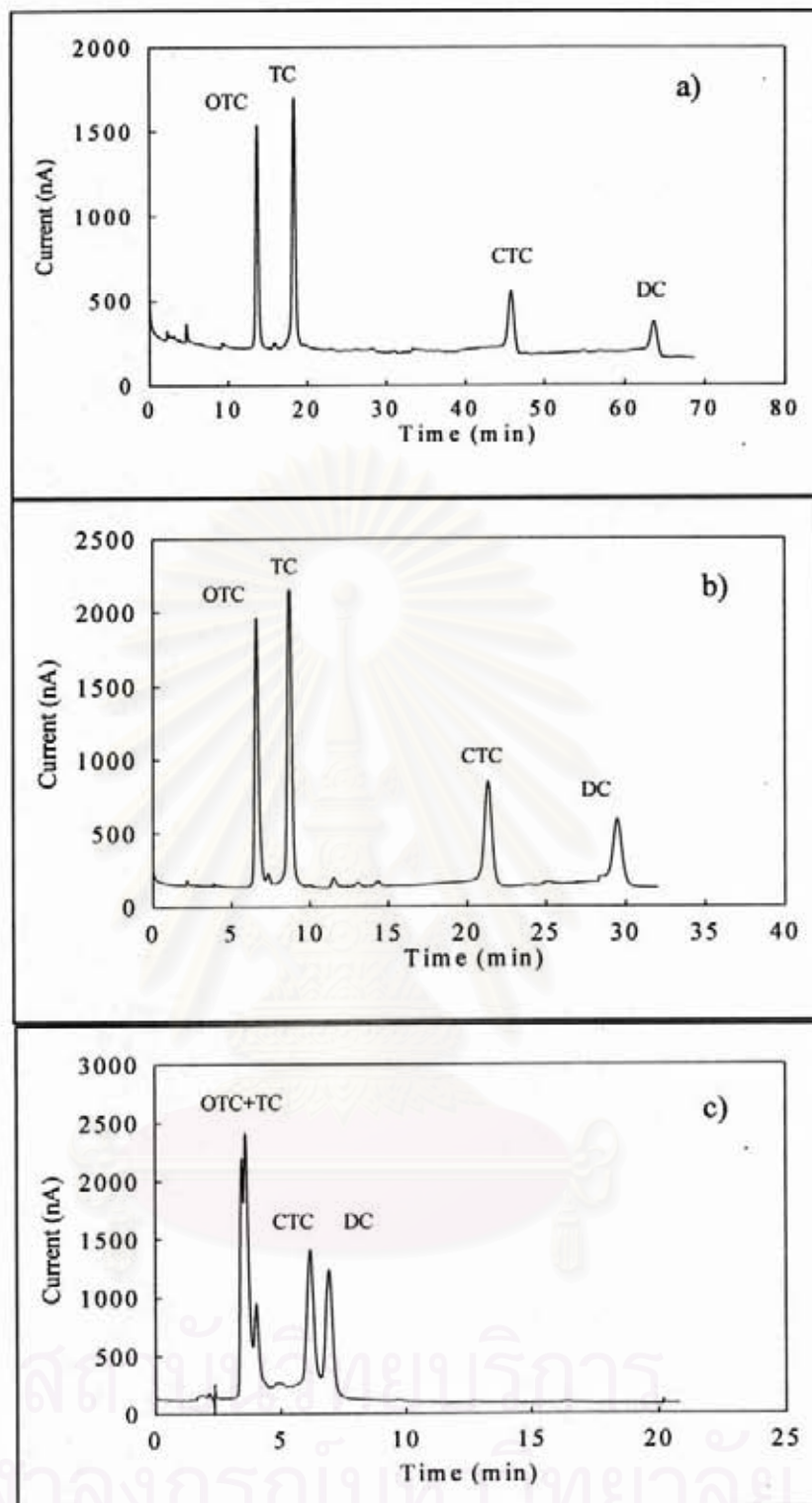
จากผลการทดลองพบว่า ระบบตัวพาที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พีเอช 2.5 และอะซิโตนไนโตรล์ (อัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร) และ อัตราเร็วของตัวพา 1 mL min^{-1} ให้ผลการแยกที่ดีในช่วงเวลาที่เหมาะสม ดังนั้นจึงเลือกใช้ภาวะนี้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป



สถาบันนงนิจบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม ในระบบตัวพาด่างๆ a) 20 : 80 acetonitrile : 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5), b) 22 : 78 acetonitrile : 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5), c) 25 : 75 acetonitrile : 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5), d) 30 : 70 acetonitrile:0.1 M phosphate buffer (pH 2.5), and e) 35 : 65 acetonitrile : 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5)

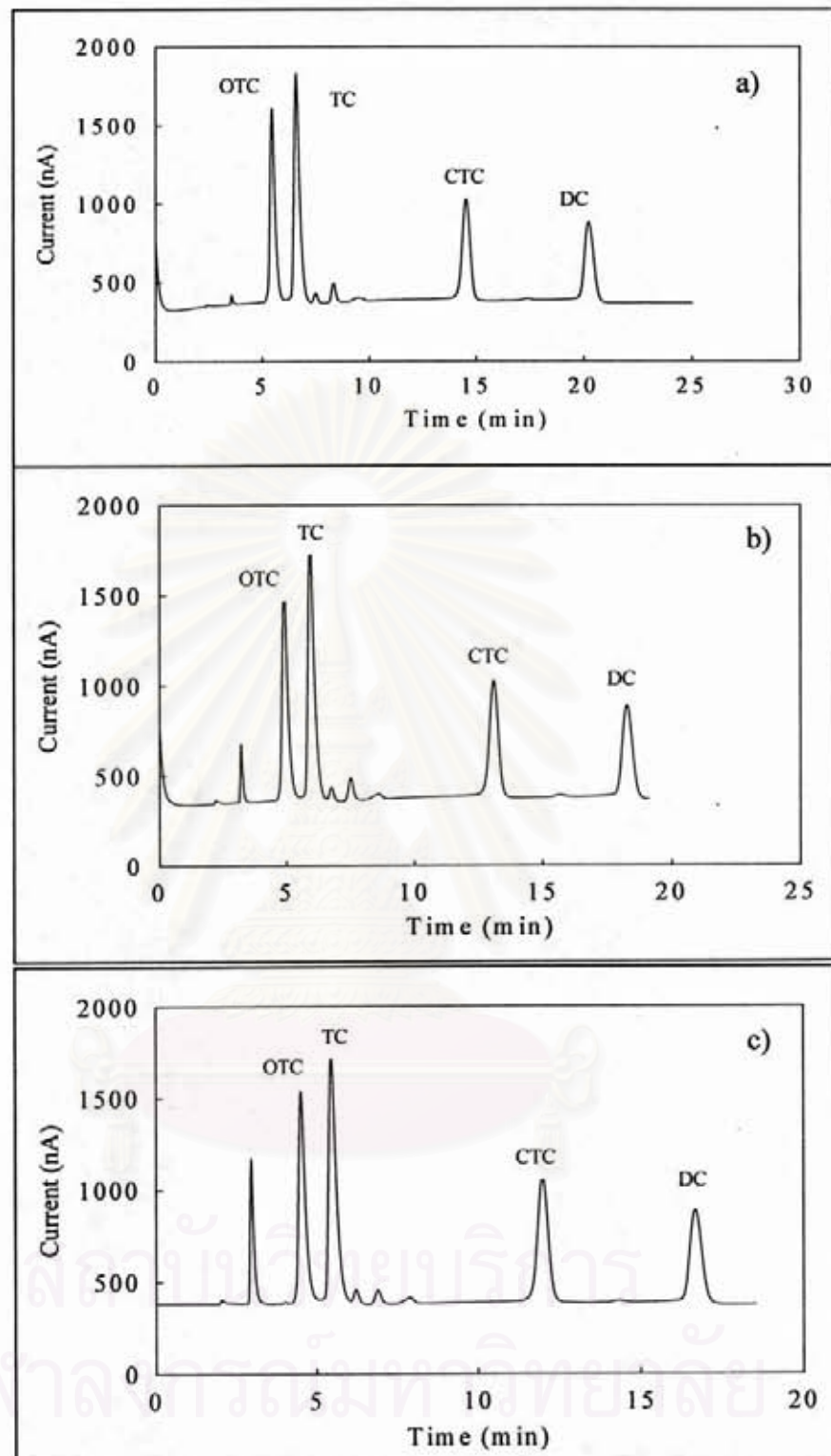


รูปที่ 3.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม

ในระบบตัวพาต่างๆ a) 20 : 80 acetonitrile : 0.04 M Britton Robinson buffer (pH 2.5), b) 30 : 70

acetonitrile : 0.04 M Britton Robinson buffer (pH 2.5), and c) 35 : 65 acetonitrile : 0.04 M Britton

Robinson buffer (pH 2.5).



รูปที่ 3.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม ใน 20:80 acetonitrile : 0.01 M phosphoric acid (pH 2.5) ที่อัตราการไหลของตัวพาต่างๆ a) 0.8 mL min⁻¹ b) 0.9 mL min⁻¹, and c) 1 mL min⁻¹.

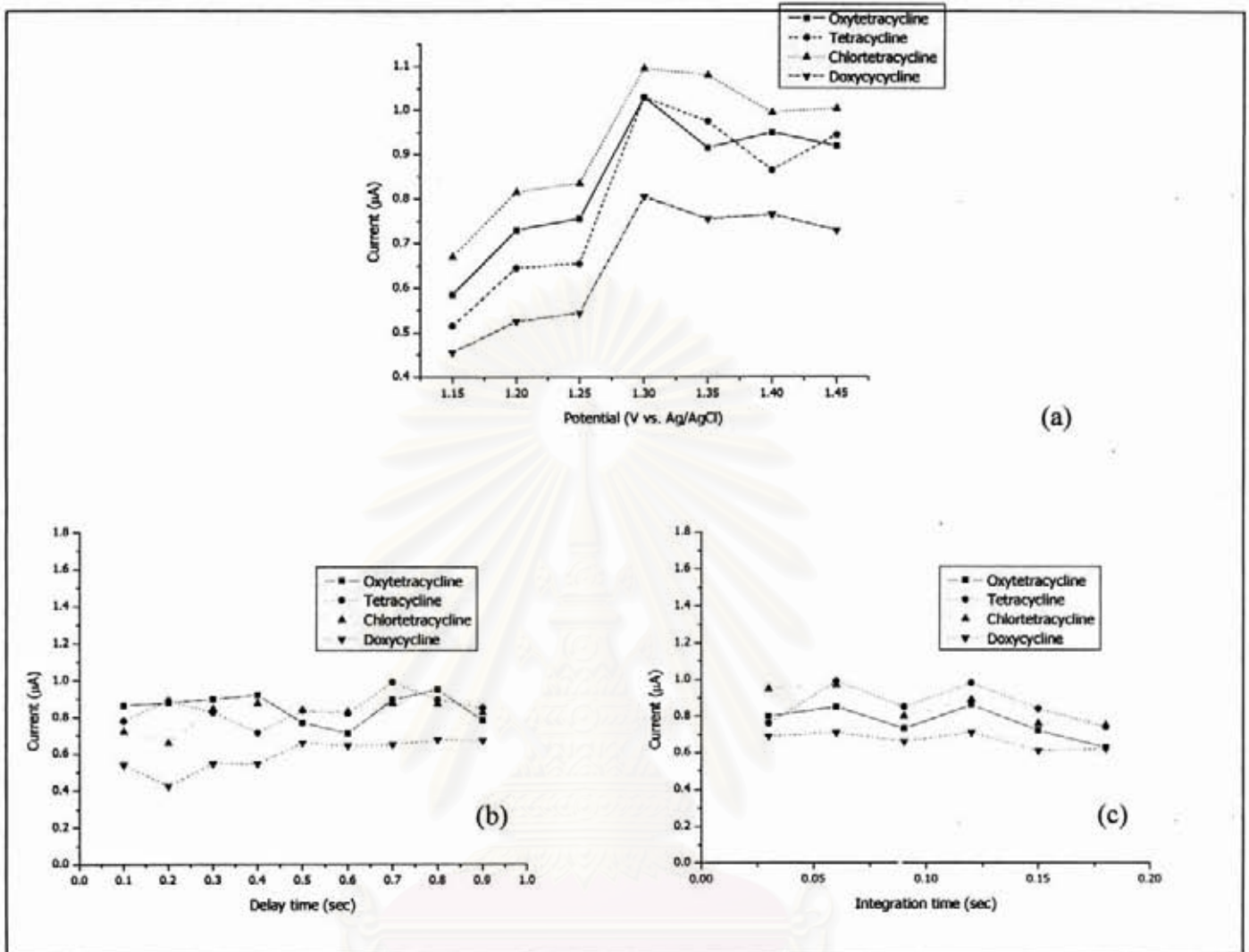
3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมของ Pulse amperometric detection

การทดลองในส่วนนี้ เป็นการหาภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดแคโรทีนอยด์ด้วยเทคนิค pulse amperometric detection โดยทำการทดสอบผลของสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5 ppm โดยใช้สภาวะเดียวกับการแยกด้วย HPLC พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องและทำการศึกษหาภาวะที่เหมาะสมได้แก่

- ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัด detection potential (E_{det})
- delay time (t_{del})
- integration time (t_{int})
- oxidation potential (E_{oxd})
- oxidation time (t_{oxd})
- reduction potential (E_{red})
- reduction time (t_{red})

ช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้สำหรับหาค่า E_{det} ที่เหมาะสมเลือกจากช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากไซคลิกโวลแทมโมแกรม (รูปที่ 3.1) ทำการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าในช่วง +1.0 ถึง +1.4 โวลต์ ในกรณีที่ใช้ขั้วไฟฟ้าทอง และช่วงศักย์ไฟฟ้า +1.25 ถึง +1.55 โวลต์ เมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าแอโนโดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ โดยทำการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าครั้งละ 500 มิลลิโวลต์

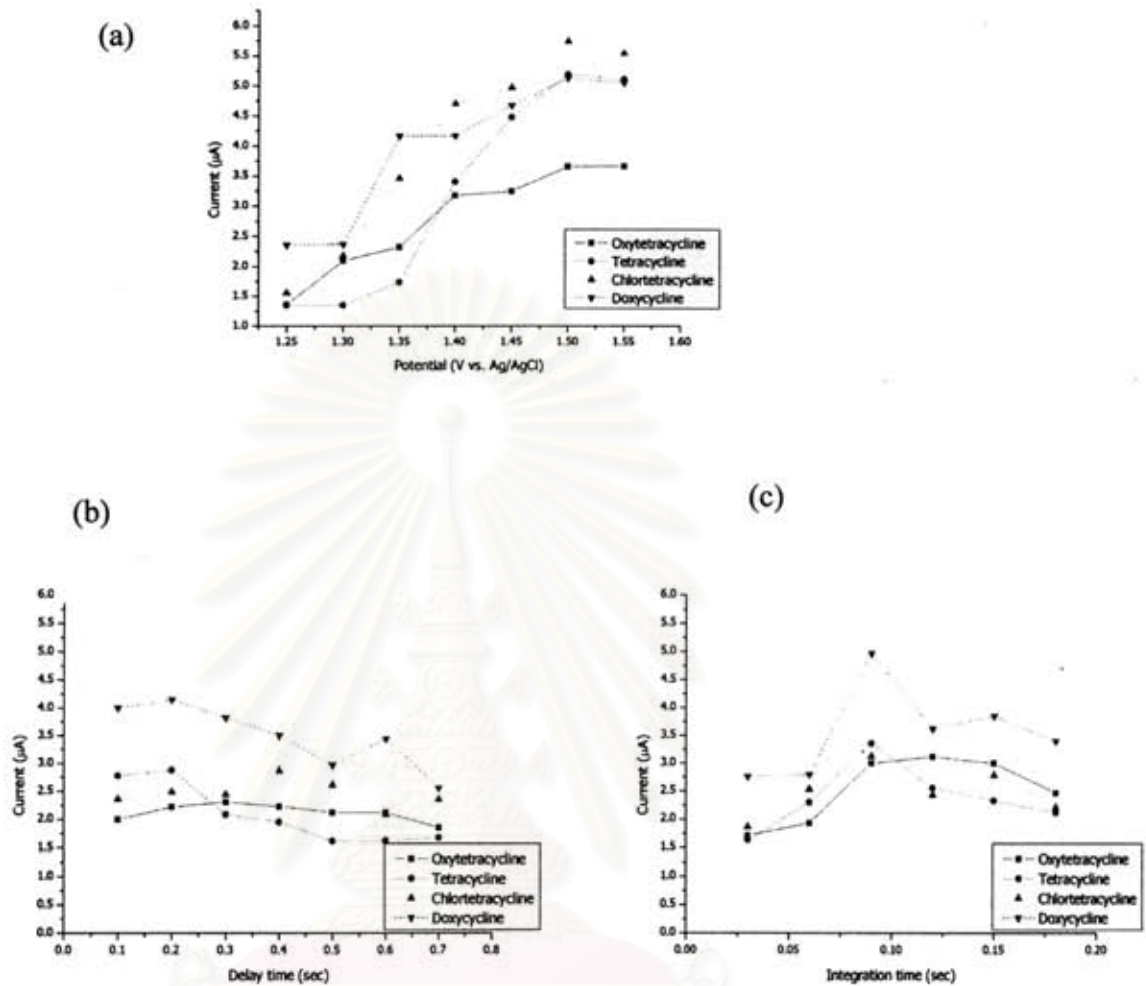
หลังจากนั้นทำการศึกษาค่า delay time (t_{del}) ที่เหมาะสมโดยทำการศึกษาในช่วงเวลาดังแต่ 100 ถึง 900 มิลลิวินาที โดยทำการเพิ่มเวลารั้งละ 100 มิลลิวินาที และทำการศึกษา integration time (t_{int}) ตั้งแต่ 30 ถึง 180 มิลลิวินาที โดยทำการเพิ่มเวลารั้งละ 30 มิลลิวินาที ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 3.5 สำหรับขั้วไฟฟ้าทอง และรูปที่ 3.6 ในกรณีที่ใช้ขั้วไฟฟ้าแอโนโดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ ตามลำดับ



รูปที่ 3.5 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าทองเป็นฟังก์ชันของ (a) E_{det} , (b) t_{del} และ (c) t_{int} .

สำหรับสารละลาย ออกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และดีออกซีไซคลิน ความ

เข้มข้น 5 ppm (n=2)



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.6 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์เป็นฟังก์ชันของ

(a) E_{det} , (b) t_{del} และ (c) t_{int} สำหรับสารละลาย ออกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน

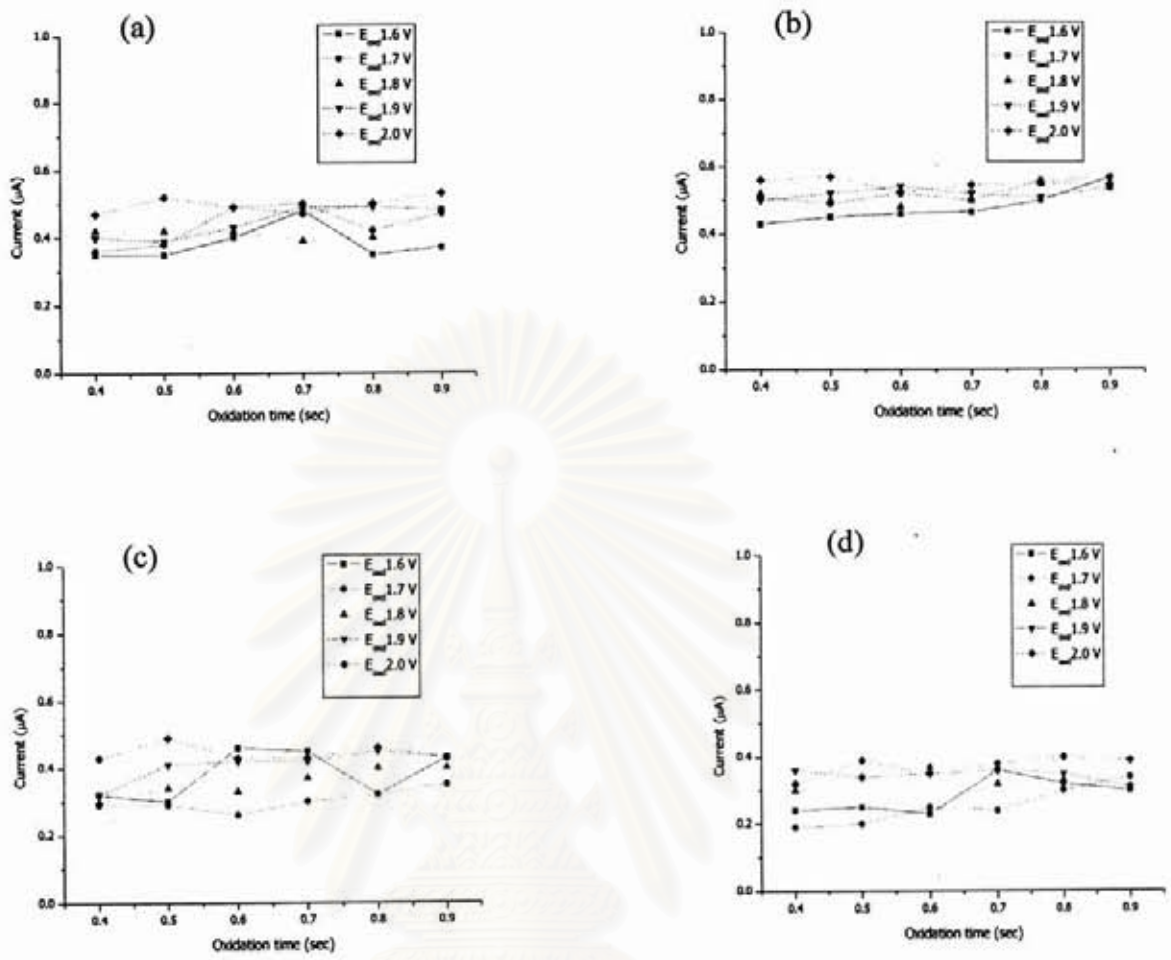
และดอกซิไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm ($n=2$)

เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ทำซ้ำได้ และสัญญาณมีค่าเท่ากัน จะต้องมีกระแสศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกที่เพียงพอแก่ขั้วไฟฟ้าเพื่อกำจัดปฏิกิริยาต่างๆที่ติดอยู่ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ดังนั้น จึงต้องทำการศึกษาค่า oxidation potential (E_{oxd}) ที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +1.70 ถึง +2.0 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ และทำการเพิ่มค่าศักย์ไฟฟ้าครั้งละ 100 มิลลิโวลต์ โดยทำการทดลองเหมือนกันทั้งที่ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแวนาเดียมไดออกไซด์โคบอลต์

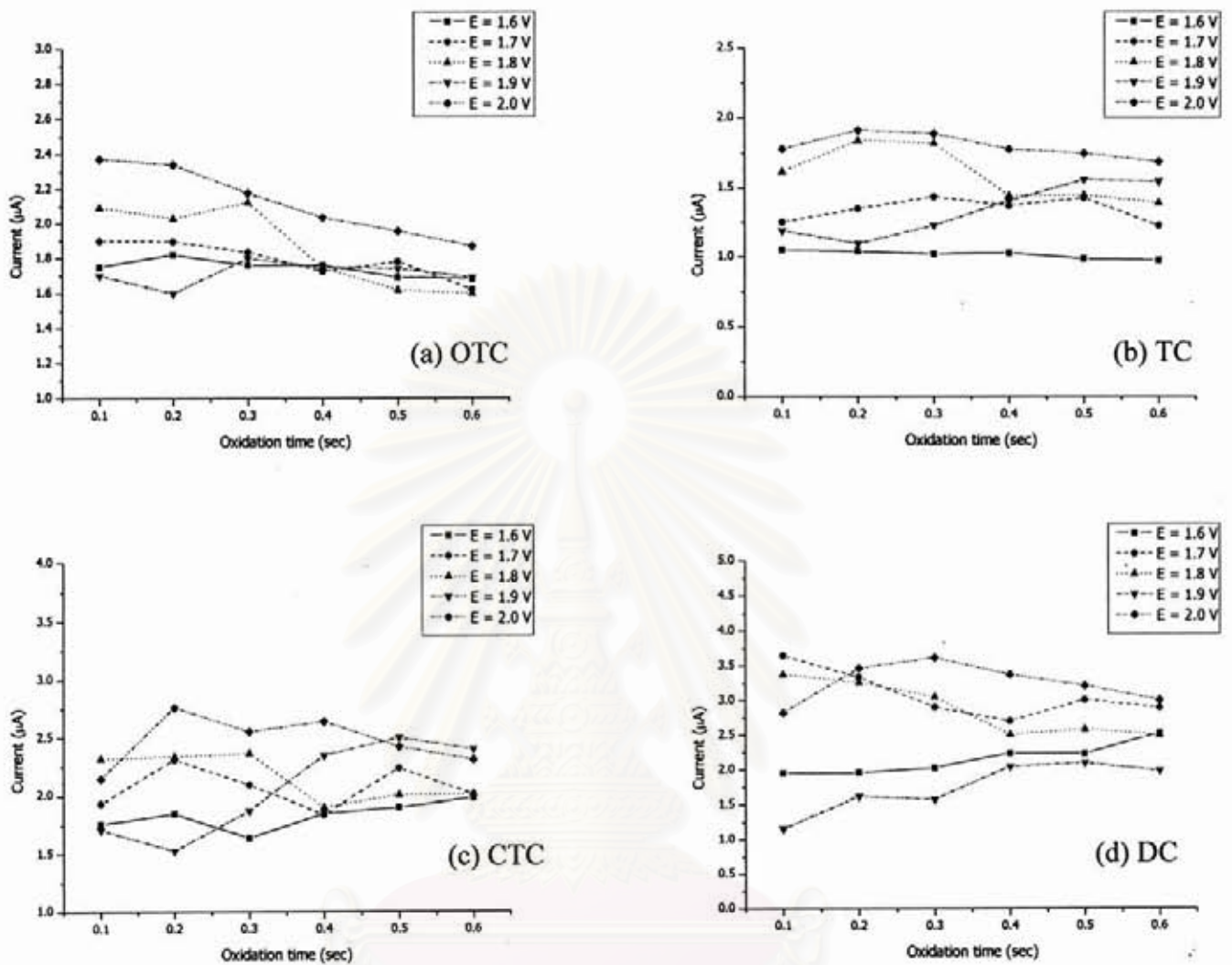
สำหรับการศึกษาค่า oxidation time (t_{oxd}) ทำได้โดยการเปลี่ยนเวลาในช่วงตั้งแต่ 100 ถึง 900 มิลลิวินาที ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 3.7 และ 3.8 สำหรับขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแวนาเดียมไดออกไซด์โคบอลต์ ตามลำดับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



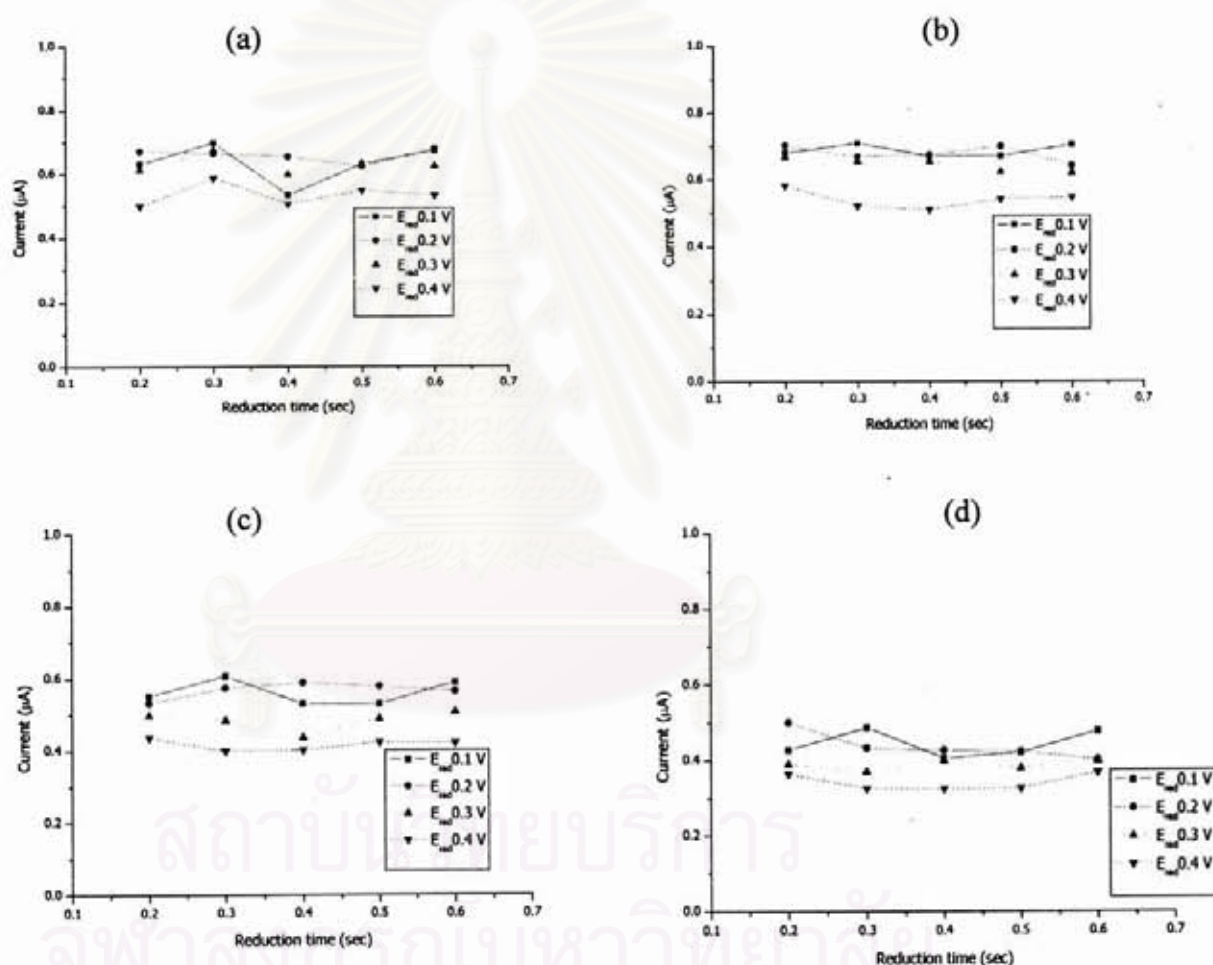
รูปที่ 3.7 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ชั่วไฟฟ้าทองเป็นฟังก์ชันของ E_{ox} และ t_{ox} สำหรับสารละลาย (a) ออกซิเดตราไซคลิน (b) เดตราไซคลิน (c) คลอเดตราไซคลิน และ (d) คีอิกไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm (n=2)



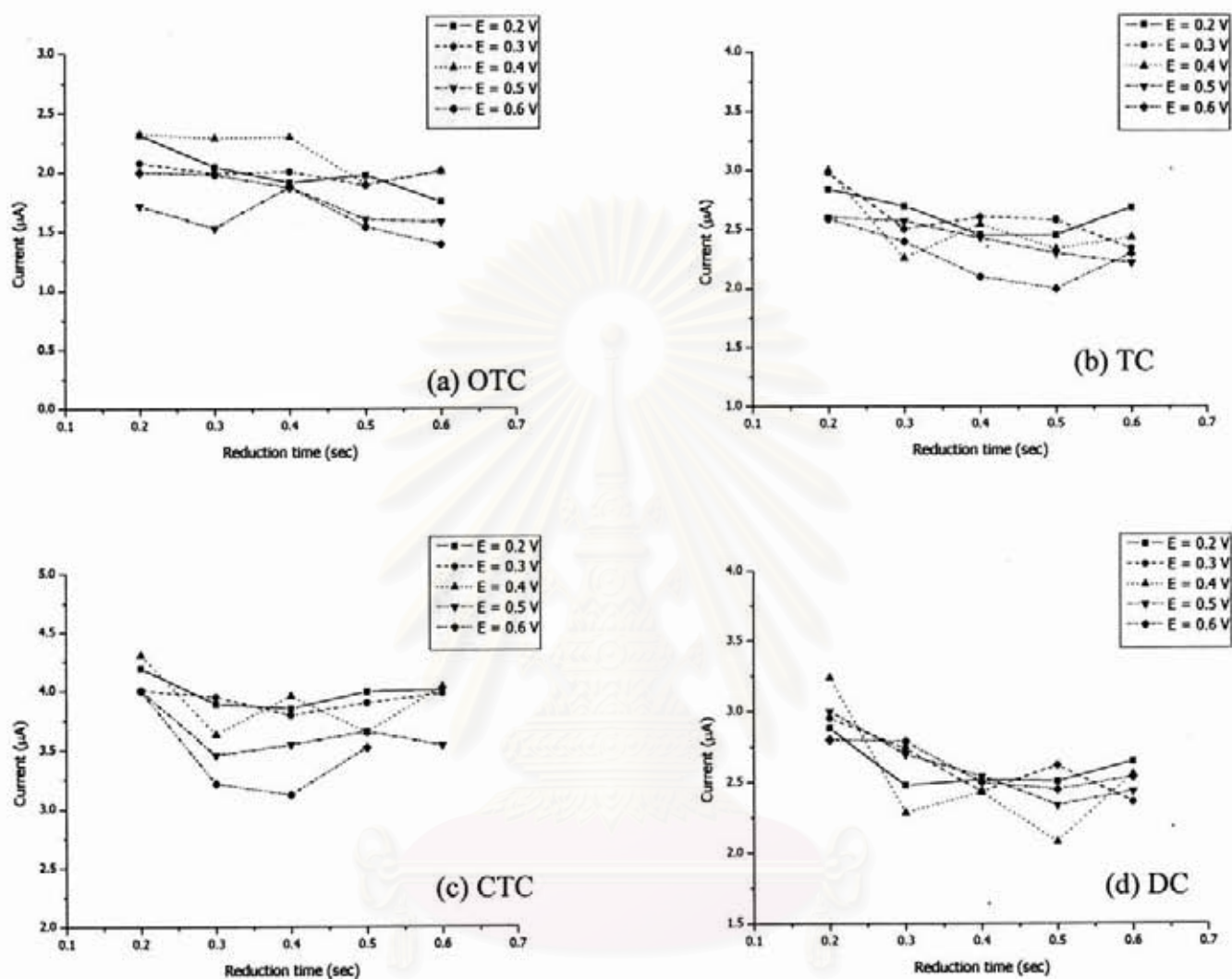
รูปที่ 3.8 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโอดไซโครโบรอนโคปโคมอนด์ เป็นฟังก์ชันของ E_{oxd} และ t_{oxd} สำหรับสารละลาย (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) กลอเตตราไซคลิน และ (d) คีอกซิไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm ($n=2$)

และจากผลการทดลองที่ได้พบว่า ในขณะที่ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าไปในทิศทางที่เป็นบวก จะทำให้เกิดฟิล์มของออกไซด์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำให้ประสิทธิภาพการใช้งานของขั้วไฟฟ้าลดลง

ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้ทำการศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับกำจัดฟิล์มออกไซด์ออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ในส่วนนี้ได้ทำการเปลี่ยนค่า reduction potential (E_{red}) ในช่วง +0.1 ถึง +0.4 โวลต์ และได้ทำการศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการให้ศักย์ไฟฟ้ารีดักชัน โดยศึกษาเวลาในช่วง 100 ถึง 600 มิลลิวินาที การเพิ่มศักย์ไฟฟ้าให้แก่ขั้วไฟฟ้าทำโดยเพิ่มศักย์ไฟฟ้าครั้งละ 100 มิลลิโวลต์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.9 และ 3.10 ตามลำดับ



รูปที่ 3.9 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าทอง เป็นฟังก์ชันของ E_{red} และ t_{red} สำหรับสารละลาย (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) กลอยเตตราไซคลิน และ (d) คีอิกซีไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm (n=2)



รูปที่ 3.10 สัญญาณที่ได้จาก HPLC-PAD ที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ เป็นฟังก์ชันของ E_{red} และ t_{red} สำหรับสารละลาย (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) คีอิกซิไซคลิน ความเข้มข้น 5 ppm ($n=2$)

ตารางที่ 3.2 สรุปผลการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดเตตราไซคลินและสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค pulse amperometric detection

ตารางที่ 3.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดเตตราไซคลินและสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค PAD โดยใช้ขั้วไฟฟ้าทอง และขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์

Parameter	Au	Anodized BDD
1. Detection step		
E_{det} (V vs. Ag/AgCl)	1.3	1.5
t_{det} (sec)	0.8	0.2
t_{int} (sec)	0.12	0.09
2. Oxidation step		
E_{oxd} (V vs. Ag/AgCl)	2.0	2.0
t_{oxd} (sec)	0.9	0.2
3. Reduction step		
E_{red} (V vs. Ag/AgCl)	0.1	0.4
t_{red} (sec)	0.3	0.2

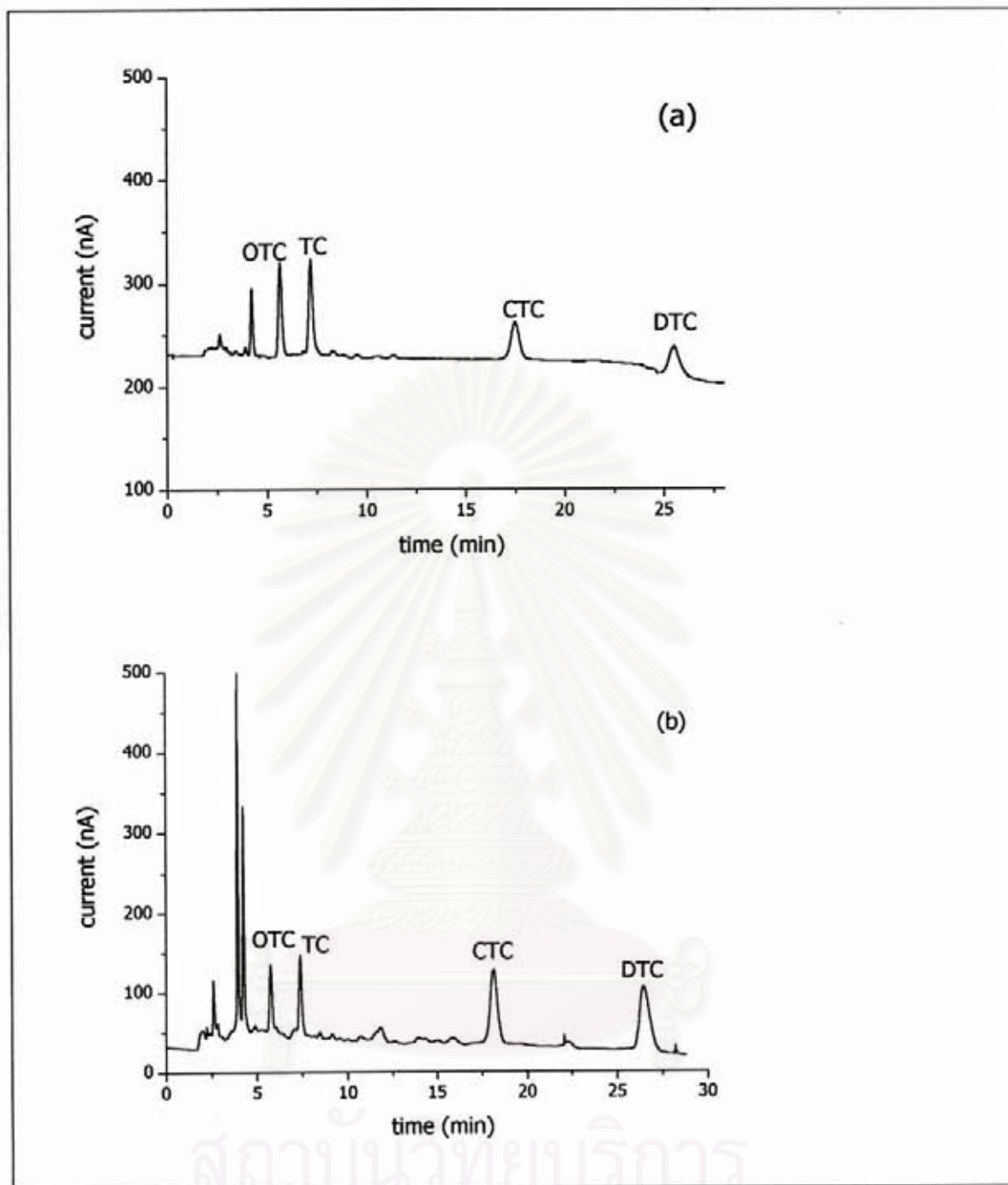
3.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบ HPLC

ตารางที่ 3.3 แสดงภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกเตตราไซคลินและอนุพันธ์ด้วยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย

ตารางที่ 3.3 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกเดร้าไซคลินและอนุพันธ์ด้วยเทคนิค HPLC

HPLC parameters	HPLC conditions
เฟสที่อยู่กับที่ (Stationary phase)	GL Science Inertsil-3 C ₁₈ , 5 μ m, 4.6 mm x 25 cm
เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)	Phosphate buffer (0.01M, pH 2.5) – acetonitrile (80:20, v/v)
อัตราการไหลของสารตัว	
พา (Flow rate)	1 mL/min
ปริมาตรสารที่ฉีด	
(Injection volume)	20 μ L
อุณหภูมิ (Temperature)	Room temperature
ตัวตรวจวัด (Detector)	Pulsed Amperometric Detection (PAD)

รูปที่ 3.11 (a) แสดงโครมาโทแกรมการแยกสารผสมของละลายมาตรฐานเดร้าไซคลินและอนุพันธ์ รูปที่ 3.11 (b) แสดงโครมาโทแกรมของการแยกสารในกลุ่มเดร้าไซคลินหลังจากที่ฉีดสารมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง



รูปที่ 3.11 (a) โครมาโทแกรมการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของเตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน ออกซิเตตราไซคลิน และดีออกซิไซคลิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ได้จากการแยกผ่านคอลัมน์ HPLC และตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (b) โครมาโทแกรมที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินลงในสารตัวอย่างกึ่ง

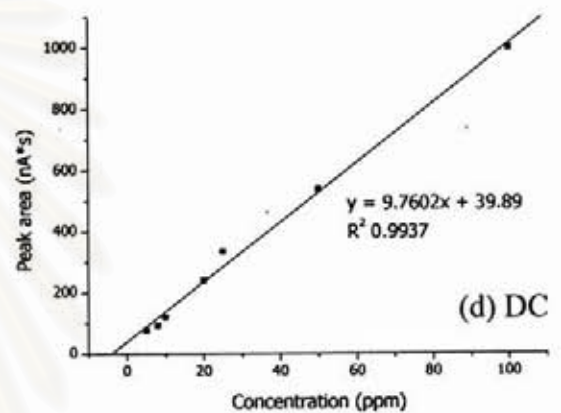
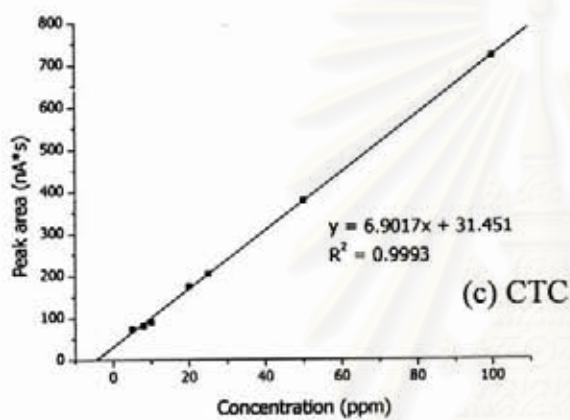
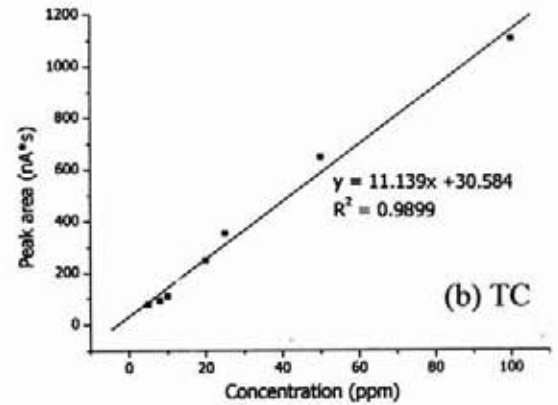
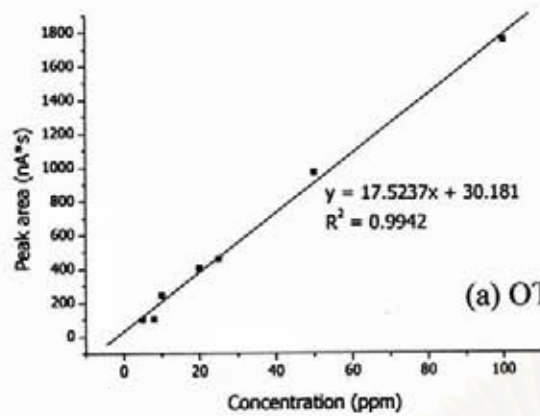
การแยกสารด้วยเทคนิค HPLC ความจำเพาะเจาะจงของภาวะที่ใช้สามารถหาได้จากค่า retention time และค่า resolution ระหว่างพีคสองพีค ดังแสดงในตารางที่ 3.4 จากผลการทดลอง สามารถสรุปได้ว่า สารทั้งสี่ชนิดสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยภาวะที่ใช้ สำหรับการวิเคราะห์เตตราไซคลินในสารตัวอย่างพบว่าสามารถทำได้ โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่เป็นองค์ประกอบในสารตัวอย่างจริง

ตารางที่ 3.4 แสดงค่า retention time และค่า resolution ของสารในกลุ่มเตตราไซคลินทั้งสี่ชนิด ภายใต้ภาวะที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.3

Compounds	Retention time (min)	Resolution
Oxytetracycline	5.6	-
Tetracycline	7.5	4.58
Chlortetracycline	17.5	10.19
Doxycycline	26.0	8.27

3.6 กราฟมาตรฐานและช่วงความเข้มข้นที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง

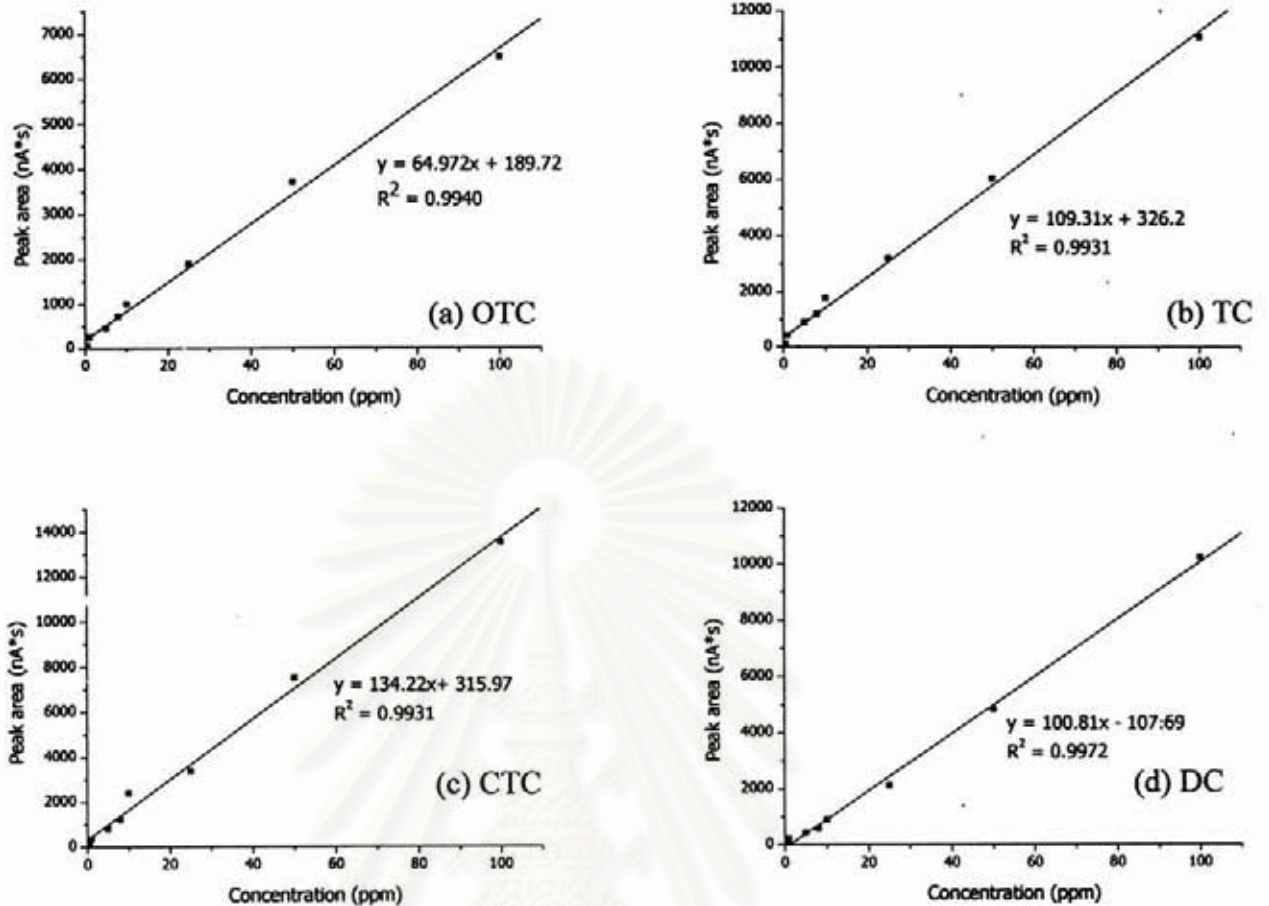
ในการทดลองได้ทำการศึกษาทำการวัดสัญญาณกระแสไฟฟ้าของเตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน ออกซิเตตราไซคลิน และดีออกซิไซคลิน ในช่วงความเข้มข้น 0.1- 100 ppm รูปที่ 3.12 และรูปที่ 3.13 แสดงกราฟมาตรฐานของ เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน ออกซิเตตราไซคลิน และดีออกซิไซคลิน ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา ที่วัดได้จากการใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอนโนโดสโบรอน โคปโคมอนด์ ตามลำดับ



รูปที่ 3.12 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) คีอักษิไซคลิน ที่ได้จากการแยกผ่านคอลัมน์ และตรวจวัดด้วยหัวไฟฟ้าทอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 3.13 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน (a) ออกซิเตตราไซคลิน (b) เตตราไซคลิน (c) คลอเตตราไซคลิน และ (d) คีอ็อกซีไซคลิน ที่ได้จากการแยกผ่านคอลัมน์ และตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าแอนโนโดซ์โบรอนโคปโคมอนด์

ตารางที่ 3.5 และตารางที่ 3.6 แสดงถึงค่าความชัน จุดตัดแกน และค่า correlation coefficient ที่ได้จากกราฟเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารที่สนใจแต่ละชนิด โดยที่ ตารางที่ 3.5 เป็นผลที่ได้จากขั้วไฟฟ้าทอง และตารางที่ 3.6 เป็นผลที่ได้จากการใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนโดซ์โบรอนโคปโคมอนด์

ตารางที่ 3.5 ค่าพารามิเตอร์จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการแยกสารมาตรฐาน อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และด็อกซิไซคลิน ด้วย HPLC และตามด้วยการตรวจวัดแบบพัลส์แอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าทอง ตามภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 3.2 (n=3)

Compounds	Slope (peak area units/ ppm)	Intercept	R ²
Oxytetracycline	17.52	30.18	0.9942
Tetracycline	11.14	30.58	0.9899
Chlortetracycline	6.90	31.45	0.9993
Doxycycline	9.76	39.89	0.9937

ตารางที่ 3.6 ค่าพารามิเตอร์จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการแยกสารมาตรฐาน อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และด็อกซิไซคลิน ด้วย HPLC และตามด้วยการตรวจวัดแบบพัลส์แอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ ตามภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 3.2 (n=3)

Compounds	Slope (peak area units/ ppm)	Intercept	R ²
Oxytetracycline	64.91	189.72	0.9940
Tetracycline	109.31	326.20	0.9960
Chlortetracycline	134.22	315.97	0.9931
Doxycycline	100.81	107.69	0.9972

จากผลการทดลองพบว่า การใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ สามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าการใช้ขั้วไฟฟ้าทอง คือเท่ากับ 0.05 ppm ในขณะที่การใช้ขั้วไฟฟ้าทองสามารถวัดได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 ppm

3.7 ความสามารถต่ำสุดที่ตรวจวัดได้และความสามารถต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ))

ในการทดลองทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-2.00 ppm ค่า LOD คือค่าความเข้มข้นที่ให้สัญญาณสูงกว่าค่าสัญญาณรบกวน 3 เท่า และค่า LOQ คือค่าความเข้มข้นที่ให้สัญญาณสูงกว่าค่าสัญญาณรบกวน 10 เท่า ตารางที่ 3.6 แสดงค่า LOD และค่า LOQ ที่ได้จากการทดลองของสารแต่ละชนิดทั้งกรณีที่ใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าเพชรที่ผ่านกระบวนการแอนโนไดซ์

ตารางที่ 3.7 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ของสารมาตรฐาน อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และด็อกซิไซคลิน

Compound	Au electrode		Anodized BDD electrode	
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Oxytetracycline	0.80	1.00	0.01	0.05
Tetracycline	0.80	1.00	0.01	0.05
Chlortetracycline	1.25	2.00	0.05	0.10
Doxycycline	1.25	2.00	0.05	0.10

จากผลการทดลองพบว่า ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอน โคปโคมอนด์ให้ค่าขีดความสามารถต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ต่ำกว่าการใช้ขั้วไฟฟ้าทอง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ขั้วไฟฟ้าเพชรที่ผ่านกระบวนการแอนโนไดซ์ เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานสำหรับตรวจวัดเตตราไซคลินและสารอนุพันธ์หลังจากที่แยกผ่านคอลัมน์ HPLC

3.8 ค่าความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

การหาค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลินที่ทราบความเข้มข้นลงในสารตัวอย่างกึ่ง โดยเลือกทำการทดลองที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตารางที่ 3.8 ถึงตารางที่ 3.10 แสดงค่าความเที่ยงที่ได้จากการทดลองภายในวันเดียวกัน ตารางที่ 3.11 แสดงค่าความเที่ยงที่ได้จากผลการทดลองระหว่างวัน

สำหรับค่าความแม่นยำของวิธีการทดลองหาได้จากการคำนวณหา % recovery จากการฉีดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างก่อนนำมาฉีดผ่านคอลัมน์ ค่า % recovery ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 75.0 ถึง 98.4 % และค่า % RSD น้อยกว่า 10% ซึ่งแสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้ให้ผลการทดลองที่มีความแม่นยำและความเที่ยงสูง³¹

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.8 ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนของ อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และดอกซิโคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่ง จากการทดลองวันหนึ่ง (n=3)

Compounds	% Recovery			Mean	SD	%RSD
	1	2	3			
Spiking 0.5 mg/kg						
OTC	72.5	74.3	75.5	74.1	1.5	2.0
TC	80.5	81.4	79.9	80.4	1.0	1.2
CTC	72.5	75.3	76.4	74.7	2.0	2.7
DC	80.5	74.9	81.5	79.0	3.6	4.5
Spiking 1 mg/kg						
OTC	79.4	80.3	81.4	80.4	1.0	1.2
TC	75.9	82.1	85.1	81.0	4.7	5.8
CTC	80.4	79.9	82.5	80.9	1.4	1.7
DC	78.9	89.3	85.4	84.5	5.3	6.2
Spiking 5 mg/kg						
OTC	85.9	90.7	92.4	89.7	3.4	3.8
TC	90.4	91.5	92.4	91.4	1.0	1.1
CTC	90.9	93.5	98.9	94.4	4.1	4.3
DC	92.1	93.1	95.5	93.6	1.7	1.9
Spiking 10 mg/kg						
OTC	92.5	100.7	97.5	96.5	4.1	4.3
TC	100.2	97.5	95.5	97.8	2.4	2.5
CTC	94.5	93.5	97.3	95.1	2.0	2.1
DC	99.7	96.5	95.5	97.2	2.2	2.3

ตารางที่ 3.9 ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนของ อ็อกซีเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และด็อกซิโคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่ง จากการทดลองวันที่สอง (n=3)

Compounds	% Recovery			Mean	SD	%RSD
	1	2	3			
Spiking 0.5 mg/kg						
OTC	77.5	73.5	75.2	75.4	2.0	2.7
TC	75.1	82.7	84.3	80.7	4.9	6.1
CTC	72.1	73.4	75.5	73.7	1.7	2.3
DC	73.5	72.5	77.1	74.4	2.4	3.3
Spiking 1 mg/kg						
OTC	80.4	79.5	85.3	81.7	3.1	3.81
TC	89.9	90.5	82.5	87.6	4.5	5.1
CTC	84.4	79.1	80.2	81.2	2.8	3.4
DC	80.5	82.4	85.4	82.8	2.5	3.0
Spiking 5 mg/kg						
OTC	89.3	89.9	92.1	90.4	1.5	1.6
TC	91.5	92.5	93.5	92.5	1.0	1.1
CTC	94.3	92.5	89.5	92.1	2.4	2.6
DC	85.9	92.5	93.5	90.6	4.1	4.6
Spiking 10 mg/kg						
OTC	92.5	100.7	97.5	96.9	4.1	4.3
TC	100.2	97.5	95.5	97.8	2.4	2.5
CTC	94.5	93.5	97.3	95.1	2.0	2.1
DC	99.7	96.5	95.5	97.2	2.2	2.3

ตารางที่ 3.10 ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนของ อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และดีออกซิโคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่ง จากการทดลองวันที่สาม (n=3)

Compounds	% Recovery			Mean	SD	%RSD
	1	2	3			
Spiking 0.5 mg/kg						
OTC	74.5	75.2	76.7	75.5	1.1	1.5
TC	80.5	76.4	77.4	78.1	2.1	2.7
CTC	82.5	84.1	72.3	79.6	6.4	8.0
DC	79.5	80.2	72.4	77.4	4.3	5.6
Spiking 1 mg/kg						
OTC	89.2	85.1	84.3	86.2	2.6	3.0
TC	85.3	82.1	89.5	85.6	3.7	4.3
CTC	90.1	85.4	87.3	87.6	2.4	2.7
DC	89.1	87.2	84.1	86.8	2.5	2.9
Spiking 5 mg/kg						
OTC	92.1	95.7	94.5	94.1	1.8	1.9
TC	90.9	93.2	94.1	92.7	1.7	1.8
CTC	92.4	93.5	99.5	95.1	3.8	4.0
DC	92.1	93.1	90.5	92.0	1.4	1.5
Spiking 10 mg/kg						
OTC	104.5	99.5	97.3	100.4	3.7	3.7
TC	100.4	98.3	97.2	98.6	1.6	1.6
CTC	95.2	101.7	94.7	97.2	3.9	4.0
DC	95.9	97.1	80.5	94.2	4.1	4.3

ตารางที่ 3.11 ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนของ อ็อกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และด็อกซิโคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่ง จากการทดลองระหว่างวัน (inter-day precision, n=3)

Compounds	% Recovery			Mean	SD	%RSD
	Day 1	Day 2	Day 3			
Spiking 0.5 mg/kg						
OTC	74.1	75.4	75.5	75.0	0.8	1.0
TC	80.4	80.7	78.1	79.7	1.4	1.8
CTC	74.4	73.7	79.6	76.0	3.2	4.2
DC	79.0	74.4	77.4	76.9	2.3	3.0
Spiking 1 mg/kg						
OTC	80.4	81.7	86.2	82.8	3.0	3.7
TC	81.0	87.6	85.6	84.8	3.5	4.0
CTC	80.9	81.2	87.6	83.2	3.8	4.6
DC	84.5	82.8	86.8	84.7	2.0	2.4
Spiking 5 mg/kg						
OTC	89.7	90.4	94.1	91.4	3.4	2.6
TC	91.4	92.5	92.7	92.2	0.7	0.8
CTC	94.4	92.1	95.1	93.9	1.6	1.7
DC	93.6	90.6	92.0	90.1	1.5	1.6
Spiking 10 mg/kg						
OTC	96.5	96.9	100.4	97.9	2.2	2.2
TC	97.8	97.8	98.6	98.1	0.5	0.5
CTC	95.1	95.1	97.2	95.8	1.2	1.3
DC	97.2	97.2	94.2	96.2	1.7	1.8

ตารางที่ 3.12 ค่าความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจวัดปริมาณ ออกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และดอกซิโคลินเมื่อทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 5.0 and 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกึ่ง

Compound	Mean of % Recovery			
	Spiking 0.5 mg/kg	Spiking 1.0 mg/kg	Spiking 5.0 mg/kg	Spiking 10 mg/kg
Oxytetracycline	75.0±0.8	82.8±3.0	91.4±2.4	97.9±2.2
Tetracycline	79.7±1.4	84.8±3.4	92.2±0.7	98.1±0.5
Chlortetracycline	76.0±3.2	83.2±3.8	93.9±1.6	95.8±1.2
Doxycycline	76.9±2.3	84.7±2.0	92.1±1.5	96.2±1.8

3.9 การนำไปประยุกต์ใช้

3.9.1 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์

ตารางที่ 3.13 แสดงผลการทดลองที่ได้จากการใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ เป็นตัวตรวจวัดเตตราไซคลินและอนุพันธ์ในสารตัวอย่างกึ่งหลังจากแยกผ่านคอลัมน์ จากผลการทดลองพบว่า ขั้วไฟฟ้าทองไม่สามารถตรวจวัดเตตราไซคลินและอนุพันธ์ในสารตัวอย่างกึ่งหลังจากแยกผ่านคอลัมน์ได้ แต่ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์สามารถตรวจวัด เตตราไซคลินและออกซิเตตราไซคลินได้

ตารางที่ 3.13 ผลการวิเคราะห์สารเตตราไซคลินที่ได้จากการใช้วิธีที่ได้รับการพัฒนาร่วมกับตัวตรวจวัดชีวไฟฟ้าทองและชีวไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์

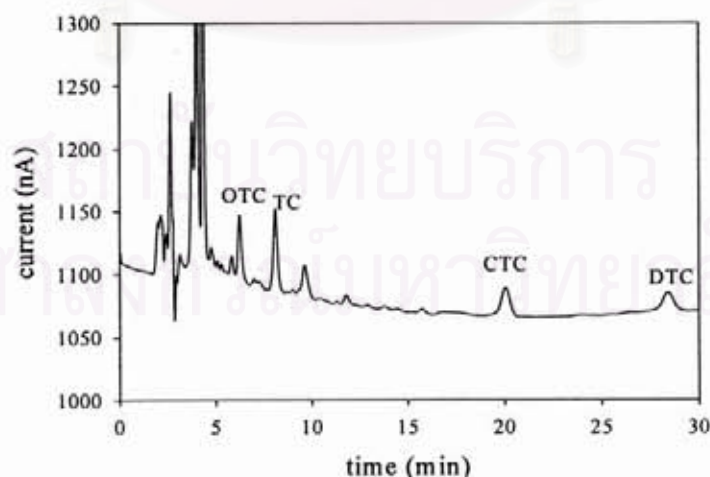
Compound	Concentration of TCs in shrimp (mg/kg)			
	Sample 1 [*]		Sample 2 [*]	
	Au	Anodized BDD	Au	Anodized BDD
Oxytetracycline	ND ^{**}	0.04	ND ^{**}	0.06
Tetracycline	ND ^{**}	0.06	ND ^{**}	ND ^{**}
Chlortetracycline	ND ^{**}	ND ^{**}	ND ^{**}	ND ^{**}
Doxycycline	ND ^{**}	ND ^{**}	ND ^{**}	ND ^{**}

^{*} Farming-shrimp

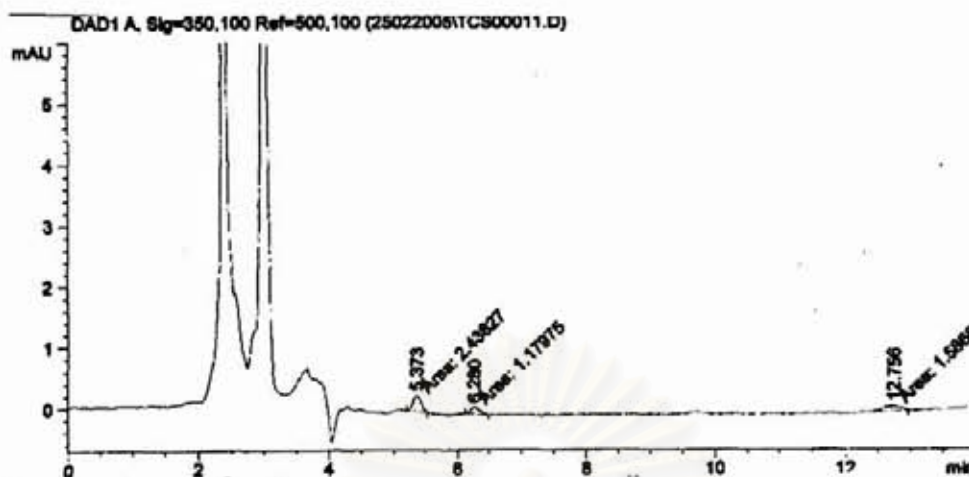
^{**} Not detectable

3.9.2 เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง HPLC-PAD และวิธีมาตรฐานของ AOAC

รูปที่ 3.141 และรูปที่ 3.15 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์เตตราไซคลินและอนุพันธ์ด้วยวิธี HPLC-PAD ที่เสนอและวิธีมาตรฐานของ AOAC ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า วิธี HPLC-PAD ให้สัญญาณของสารที่สนใจวิเคราะห์สูงกว่าวิธีมาตรฐานของ AOAC



รูปที่ 3.14 แสดงโครมาโทแกรมการแยกเตตราไซคลินและอนุพันธ์ในสารตัวอย่างกึ่งที่มีการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี HPLC-PAD



รูปที่ 3.15 แสดงโครมาโทแกรมการแยกเตตราไซคลินและอนุพันธ์ในสารตัวอย่างกุ้งที่มีการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC

ตารางที่ 3.14 และตารางที่ 3.15 แสดงค่า % recovery จากการฉีดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในสารตัวอย่างกุ้ง 2 ชนิด คือ กุ้งเลี้ยง (farming-shrimp) และกุ้งทะเล (sea-shrimp) แล้วทำการตรวจวัดด้วยวิธี HPLC-PAD ที่เสนอและวิธีมาตรฐานของ AOAC ผลการทดลองพบว่า วิธีมาตรฐานของ AOAC ให้ค่า % recovery ต่ำกว่า เนื่องจากการสูญเสียของเตตราไซคลินในระหว่างกระบวนการสกัดสารเพื่อเตรียมสารตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC นอกจากนี้ การตรวจวัดด้วยวิธีการทางเคมีไฟฟ้าให้ผลการทดลองที่สภาพความไวที่สูงกว่าการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัด UV-VIS detector ดังนั้นวิธีการที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำมาให้หาปริมาณของเตตราไซคลินและอนุพันธ์ทั้ง 4 ตัวในสารตัวอย่างกุ้งพร้อมกันได้

ตารางที่ 3.14 การเปรียบเทียบผลการทดลองจากเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนจากการเติมสารมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง จากวิธีการ HPLC-PAD method และ the AOAC Official method สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างกุ้งฟาร์ม* (n=3)

	% Recovery	
	Developed method	AOAC Official method [*]
Spiking at level 0.5 mg/kg		
Oxytetracycline	74.8±1.7	71.3±2.0
Tetracycline	80.6±3.2	73.1±4.3
Chlortetracycline	74.2±1.8	73.7±1.9
Doxycycline	76.7±3.7	-
Spiking at level 1.0 mg/kg		
Oxytetracycline	81.1±2.2	80.5±3.3
Tetracycline	84.3±5.5	78.5±4.0
Chlortetracycline	93.3±2.0	77.0±6.2
Doxycycline	92.1±3.8	-
Spiking at level 5.0 mg/kg		
Oxytetracycline	90.1±2.4	84.6±4.6
Tetracycline	92.0±1.1	83.9±3.7
Chlortetracycline	93.3±3.3	81.2±4.1
Doxycycline	92.1±3.3	-
Spiking at level 10 mg/kg		
Oxytetracycline	97.4±3.3	89.5±3.5
Tetracycline	96.6±2.8	91.2±3.6
Chlortetracycline	95.2±2.2	85.8±3.6
Doxycycline	97.0±2.4	-

* farming-shrimp

* AOAC official method 995.09 (Chlortetracycline, Oxytetracycline and Tetracycline in edible animal tissues ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดUV-VIS detector)

ตารางที่ 3.15 การเปรียบเทียบผลการทดลองจากเปอร์เซ็นต์ร้อยละการกลับคืนจากการเติมสารมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง จากวิธีการ HPLC-PAD method และ the AOAC Official method สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างกุ้งทะเล^a (n=3)

	% Recovery	
	Developed method	AOAC Official method ^b
Spiking at level 0.5 mg/kg		
Oxytetracycline	76.3±2.4	76.2±4.0
Tetracycline	79.0±3.4	73.1±3.6
Chlortetracycline	78.3±4.8	71.8±2.4
Doxycycline	79.9±7.8	-
Spiking at level 1.0 mg/kg		
Oxytetracycline	89.3±3.8	81.0±3.8
Tetracycline	88.8±4.3	79.3±2.4
Chlortetracycline	88.4±2.4	75.4±2.5
Doxycycline	87.3±2.9	-
Spiking at level 5.0 mg/kg		
Oxytetracycline	95.3±2.8	83.7±4.3
Tetracycline	95.0±3.9	83.6±3.9
Chlortetracycline	91.8±5.1	81.1±2.1
Doxycycline	94.1±3.1	-
Spiking at level 10 mg/kg		
Oxytetracycline	100.2±2.6	90.7±5.5
Tetracycline	97.9±3.5	89.1±3.2
Chlortetracycline	96.2±4.5	90.1±3.2
Doxycycline	94.3±6.9	-

^a sea-shrimp

^b AOAC official method 995.09 (Chlortetracycline, Oxytetracycline and Tetracycline in edible animal tissues ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดUV-VIS detector)

3.9.3 การหาปริมาณเตตราไซคลินและสารอนุพันธ์ในสารตัวอย่างกุ้งที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ในการทดลองนี้ใช้สารตัวอย่างกุ้งที่มาจากฟาร์มและกุ้งทะเล เป็นสารตัวอย่างของวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีมาตรฐาน AOAC และผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการ Center for Food and Agricultural Products Company Limited (LCFA) ซึ่งใช้การตรวจวัดแบบ UV-VIS detector ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.16 และตารางที่ 3.17 สำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างกุ้งฟาร์มและกุ้งทะเล จากการวิเคราะห์พบว่า ไม่ตรวจพบ ออกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน คลอเตตราไซคลิน และด็อกซิไซคลินในสารตัวอย่างกุ้งทั้งสองชนิด จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-PAD ที่เสนอและวิธีมาตรฐานของ AOAC แต่สามารถตรวจพบ คลอเตตราไซคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมจากผลการวิเคราะห์ของ LCFA

ตารางที่ 3.16 การเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณของเตตราไซคลินในสารตัวอย่างกุ้งฟาร์มด้วยวิธีการต่างๆ

Compound	Concentration of TCs in shrimp (mg/kg)		
	Developed method	AOAC**	LCFA***
Oxytetracycline	ND*	ND*	ND*
Tetracycline	ND*	ND*	ND*
Chlortetracycline	ND*	ND*	ND*
Doxycycline	ND*	-	-

* Not detectable

** AOAC official method 995.09 (Chlortetracycline, Oxytetracycline and Tetracycline in edible animal tissues)

*** Result of Laboratory Center for Food and Agricultural Product Co.,Ltd (LCFA)

ตารางที่ 3.17 การเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณของเตตราไซคลินใน
สารตัวอย่างกุ้งทะเลด้วยวิธีการต่างๆ

Compound	Concentration of TCs in shrimp (mg/kg)		
	Developed method	AOAC**	LCFA***
Oxytetracycline	ND*	ND*	ND*
Tetracycline	ND*	ND*	ND*
Chlortetracycline	ND*	ND*	0.07
Doxycycline	ND*	-	-

* Not detectable

** AOAC official method 995.09 (Chlortetracycline, Oxytetracycline and Tetracycline in
edible animal tissues ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดUV-VIS detector)

*** Result of Laboratory Center for Food and Agricultural Product Co.,Ltd (LCFA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

บทสรุปและงานวิจัยต่อเนื่อง

4.1 บทสรุป

การศึกษากาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของออกซิเตตราไซคลิน เตตราไซคลิน กลอเตตราไซคลิน และค็อกซิไซคลิน ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอโนไคซ์โบรอนโคปโคมอนด์ พบว่าสารอนุพันธ์ของเตตราไซคลินทุกตัวให้สัญญาณพีคที่ชัดเจนที่ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิด

การศึกษากาภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย E_{det} , t_{det} , t_{inc} , E_{oxid} , t_{oxid} , E_{red} และ t_{red} ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดสารเตตราไซคลินด้วยเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับพัลส์แอมเพอโรเมทรี ได้ทำการศึกษาทั้งที่ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอโนไคซ์โบรอนโคปโคมอนด์ สภาวะของเฟสเคลื่อนที่ในระบบไฮเปอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟีประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 2.5) และอะซิโตนไทรล์ ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตรและคอลัมน์ที่ใช้คือ C_{18} ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการศึกษาเทคนิค HPLC-PAD สำหรับวิเคราะห์สารกลุ่มเทตระไซคลินโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิด พบว่าขั้วไฟฟ้าแอโนไคซ์โบรอนโคปโคมอนด์ให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ต่ำกว่า ให้ช่วงการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงกว้างกว่า และให้ความไวสูงกว่าขั้วไฟฟ้าทอง

ต่ำสุดในการตรวจวัดที่ต่ำกว่า ให้ช่วงการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงกว้างกว่า และให้ความไวสูงกว่า
 ขั้วไฟฟ้าทอง

เทคนิค HPLC-PAD สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเทตระไซคลินในกุ้งได้
 ความเข้มข้นในการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.1-100 พีพีเอ็ม ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์
 ของเส้นตรงเท่ากับ 0.99 ที่ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดได้ 0.01-0.05 พีพีเอ็ม ค่าการคืนกลับอยู่
 ในช่วง 75.0 ถึง 98.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการ
 ทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่า ระบบ HPLC-PAD ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอน โคปโคมอนด์ ให้ผลการ
 ทดลองที่มีความแม่นยำและความเที่ยงที่สูง

สำหรับการเปรียบเทียบผลการทดลองจากเทคนิค HPLC-PAD ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์
 โบรอนโคปโคมอนด์ และวิธีมาตรฐานของเอไอเอซี พบว่า ค่าการคืนกลับของเทคนิค HPLC-PAD
 ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ มีค่าสูงกว่าของวิธีมาตรฐานเอไอเอซี นอกจากนี้ยังได้
 ทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการใช้เทคนิค HPLC-PAD ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคป
 โคมอนด์และวิธีการวิเคราะห์ของศูนย์ทดสอบอาหารเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง สารตัวอย่าง
 กุ้งที่นำมาทำการทดลองประกอบด้วยกุ้งสองชนิด คือ กุ้งฟาร์มและกุ้งทะเล ดังแสดงผลการทดลอง
 ในตารางที่ 3.14 และ 3.15 จากการทดลองพบว่า สารตัวอย่างกุ้งที่นำมาทดสอบไม่ตรวจพบสารเตตรา
 ไซคลินและอนุพันธ์ ยกเว้นในตัวอย่างกุ้งทะเล ที่ตรวจพบคลอเตตราไซคลิน 0.07 มิลลิกรัมต่อ

กิโลกรัม โดยวิธีของศูนย์ทดสอบอาหาร แต่วิธีมาตรฐานเอโอเอซี และ HPLC-PAD ที่ใช้ขั้วไฟฟ้า
แอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ ไม่สามารถตรวจพบเตตราไซคลินและอนุพันธ์

4.2 งานวิจัยในอนาคต

HPLC-PAD ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้
สำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างอื่น ๆ ที่มีความซับซ้อนได้ เช่น สารตัวอย่างนม ปลา และเนื้อ
นอกจากนี้ HPLC-PAD ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโคปโคมอนด์สามารถนำไปพัฒนาใช้
วิเคราะห์ ยาปฏิชีวนะอื่นๆ เช่น ซัลโฟนาไมด์ กลอแรมฟิสิกอล และอะมิโนไกลโคไซด์ เป็นต้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Yoshida, K. and Kondo, F. "Simplified classification method for residual antibiotics by microbiological assay using drug-resistant bacteria" *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 35 (1994): 543-547.
2. Nouws, J.; Van Egmond, H.; Smulders, I.; Loeffen, G.; Schouten, J. and Stegeman, H. "A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels" *Int. Dairy J.* 9 (1999): 85-90.
3. Simsson, D. L. and Kobos, R. K. "Microbiological assay of antibiotics based on inhibition of ammonia production monitored with an ammonia electrode" *Anal. Chim. Acta.* 164 (1984): 273-274.
4. Oka, H.; Ikai, Y.; Hayakawa, J.; Masuda, K.; Harada, K.; Suzuki, M.; Martz, V. and MacNeil, J. D. "Improvement of chemical analysis of antibiotics, 18 Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by TLC/FABMS with a sample condensation technique" *J. Agr. Food. Chem.* 41 (1993): 410-415.
5. Oka, H.; Ikai, Y.; Hayakawa, J.; Masuda, K.; Harada, K. and Suzuki, M. "Improvement of chemical analysis of antibiotics, 19 Determination of tetracycline antibiotics in milk by liquid chromatography and thin-layer chromatography fast-atom-bombardment mass-spectroscopy" *J. AOAC. Int.* 77 (1994): 891-895.
6. Oka, H.; Ikai, Y.; Hayakawa, J.; Masuda, K.; Harada, K.; Suzuki, M.; Himie, R.; Horie, M. and Nakazawa, H. "Identification of residual tetracyclines in honey by TLC/FABS" *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 34 (1993): 517-523.
7. Oka, H.; Ikai, Y.; Kawamura, N.; Uno, K.; Yamada, M.; Harada, K.; Uchiyama, M.; Asukabe, H. and Suzuki, M. "Improvement of chemical analysis of antibiotics X. Determination of eight tetracyclines using thin-layer and high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr. A* 393 (1987): 285-296.
8. Oka, H.; Ikai, Y.; Kawamura, N.; Uno, K.; Yamada, M.; Harada, K. and Suzuki, M. "Improvement of chemical analysis of antibiotics XII. Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey" *J. Chromatogr. A.* 400 (1987): 253-261.

9. Oka, H.; Uno, K.; Harada, K.; Kaneyama, Y. and Suzuki, M. "Improvement of the chemical analysis of antibiotics I. Simple method for the analysis of tetracyclines on silica gel high-performance thin-layer plates" *J. Chromatogr. A* 260 (1983): 457-462.
10. Ikai, Y.; Oka, H.; Kawamura, N.; Yamada, M.; Harada, K. and Suzuki, M. "Improvement of chemical analysis of antibiotics XIII. Systematic simultaneous analysis of residual tetracyclines in animal tissues using thin-layer and high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr. A* 411 (1987): 313-323.
11. Xie, H. Z.; Dong, C.; Fen, Y. L. and Liu, C. S. "Determination of doxycycline, tetracycline and oxyxyxline simultaneously by TLC-fluorescence scanning desitometry" *Anal. Lett.* 30 (1997): 79-90.
12. Ragazzi, E. and Veronese, G. "Simple method for the quantitative analysis of tetracyclines by direct fluorimetry after thin-layer chromatography on cellulose plates" *J. Chromatogr. A* 132 (1977): 105-114.
13. Szabo, A.; Kovacs, M. and Tomorkeny, E. "Thin-layer chromatographic assay of tetracyclines" *J. Chromatogr. A* 151 (1978): 256-258.
14. Omer, A. I. H.; Kariem, E. A. G. and Salama, R. B. "Separation and semi-quantitative determination of tetracycline degradation products in tetracycline hydrochloride powders and capsules by thin-layer chromatography" *J. Chromatogr. A*, 205 (1981): 484-489.
15. Kazemifard, A. G. and Moore, D. E. "Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations" *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1997): 689-696.
16. Ding, Y.; Yu, H. and Mou, S. "Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by ion-exchange chromatography with integrated pulse amperometric detection" *J. Chromatogr. A* 982 (2002): 237-244.
17. Cheng, J.; Jandik, P. and Avdalovic, N. "Use of disposable gold working electrode for cation chromatography-integrated pulsed amperometric detection of sulfur-containing amino acids" *J. Chromatogr. A* 997 (2003): 73-78.

18. Yu, H.; Ding, Y. and Mou, S. "Some factors affecting separation and detection of amino acids by high-performance liquid chromatography with integrated pulsed amperometric detection" *J. Chromatogr. A* 997 (2003): 145-143.
19. Palaharn, S.; Charoenraks, T.; Wangfuengkanagul, N.; Grudpan, K. and Chailapakul, O. "Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection" *Anal. Chim. Acta*, 499 (2003): 191-197.
20. Charoenraks, T.; Palaharn, S.; Grudpan, K.; Siangproh, W. and Chailapakul, O. "Flow injection analysis of doxycycline or chlortetracycline in pharmaceutical formulations with pulsed amperometric detection" *Talanta* 64 (2004): 1247-1252.
21. Fujishima, A.; Enaga, Y.; Rao, T.N.; and Tryk, D. A. *Diamond Electrochemistry*. Tokyo: Elsevier, 2005
22. Chailapakul, O.; Aksharanandana, P.; Frelink, T.; Einega, Y. and Fujishima, A. "The electrooxidation of sulfur-containing compounds at boron-doped diamond electrode" *Sensor. Actuat. B* 80 (2001): 193-201.
23. Siangproh, W.; Wangfuengkanagul, N. and Chailapakul, O. "Electrochemical oxidation of tiopronin at diamond film electrodes and its determination by amperometric flow injection analysis" *Anal.Chim.Acta*, 499 (2003): 183-189.
24. Siangproh, W.; Ngamukot, P. and Chailapakul, O. "Electrochemical determination of captopril at boron-doped diamond thin film electrode applied to a flow injection system" *Sensor. Actuat. B*. 91 (2003): 60-66.
25. Wangfuengkanagul, N. and Chailapakul, O. "Electrochemical analysis of acetaminophen using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system" *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002): 841-847.
26. Terashima, C.; Rao, T. N.; Sarada, B. V.; Tryk, D. A. And Fujishima, A. "Electrochemical oxidation of chlorophenols at boron-doped diamond and their determination by high-performance liquid chromatography with amperometric detection" *Anal. Chem.* 74 (2002): 895-902.
27. Chailapakul, O.; Siangproh, W.; Sarada, B. V.; Terashima, C.; Rao, T. N.; Tryk, D. A. And Fujishima, A. "The electrochemical oxidation of homocysteine at boron-doped

- diamond electrodes with application to HPLC amperometric detection" *Analyst* 127 (2002): 1164-1168.
28. Wangfuengkanagul, N.; Siangproh, W. and Chailapakul, O. " A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode" *Talanta* 64 (2004): 1183-1188.
29. Mc Donald P. D. and Bouvier E.S.P. Solid Phase Extraction Application Guide and Bibliography 6th ed., Water, Milford, Massachusetts 1995.
30. Oka, Hisao.; Matsumoto, H.; Harada, K. U.; Kadowaki, S and Suzuki, M. "Improvement of chemical analysis of antibiotics : VIII. Application of prepacked C₁₈ cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver " *Journal of Chromatography A* 325 (1985): 265-274 .
31. AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov 1993.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Charoenraks, T.; Chuanuwatanakul, S.; Honda, K.; Yamaguchi, Y.; and Chailapakul, O.; Analysis of Tetracycline Antibiotics Using HPLC with Pulsed Amperometric Detection *Analytical Sciences*, 2005, 21, 241.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย