การหาปริมาณไมโคทอกซินในข้าวกล้องโดยการเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดแคชเชอร์ส และไฮเพอร์เฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

Determination of mycotoxins in brown rice using QuEChERS extraction and high performance liquid chromatography

โดย

นางสาวพิมพ์ขวัญ ใจวงค์

นายณัฐพงศ์ นภาพิพัฒน์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

เรื่อง การหาปริมาณไมโคทอกซินในข้าวกล้องโดยการเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดแคชเชอร์สและไฮเพอร์เฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

โดยนางสาว พิมพ์ขวัญ ใจวงค์

นาย ณัฐพงศ์ นภาพิพัฒน์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร)

.... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่.........เดือน.................พศ. 2557

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การหาปริมาณไมโคทอกซินในข้าวกล้องโดยการเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดแคชเชอร์สและไฮเพอร์เฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
ชื่อนิสิตในโครงการ	1. นส. พิมพ์ขวัญ ใจวงค์ เลขประจำตัว 5333102523
	2. นาย ณัฐพงศ์ นภาพิพัฒน์ เลขประจำตัว 5333072323
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร

ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี1, บี2, จี1และจี2 ในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี(HPLC) และการเตรียมตัวอย่างด้วยแคชเชอร์สพบว่าเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติก เมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 45:55ให้ค่าการแยกสมบูรณ์ที่ฐานพีกของสารทั้ง 4 ชนิด โดยใช้ภาวะของเครื่อง HPLC ต่อไปนี้ (คอลัมน์ชนิด C-18 LiChrosper® ขนาด 250 mm × 4 mm อัตราการไหล 0.7 mL/min)ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์(LOQ) ด้วยเครื่องมืออยู่ในช่วง 0.03-0.05 และ 0.09-0.17μg/mL ความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์ด้วยHPLC อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ด้วยค่าความแม่น 87-113 และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (RSD) $\leq$8% (ที่ 5 μg/mL) $\leq$10% (ที่ 1 μg/mL) และ $\leq$ 13%(ที่ LOQ)ซึ่งอยู่ในร้อยละการกลับคืนตาม AOAC 80-110 (0.1-10 μg/mL) และRSD $\leq$7.3% (ที่5 μg/mL)$\leq$11% (ที่ 1 μg/mL) และ $\leq$15%(ที่ LOQ)ในการสกัดแคชเชอร์ส ได้สกัดข้าวกล้อง (2 g)ที่เติมอะฟลาทอกซิน (1 μg/g)โดยใช้อะซิโตไนไตรล์(5 mL) ที่มีNaCl (1 g) และ $MgSO_4$(4 g) และจากนั้นกำจัดสารรบกวนด้วยการสกัดวัฏภาคของแข็งแบบดีสเพอร์ซีฟโดยตัวดูดซับ 3 ชนิด (50 mg) เช่นPSA, C-18 และ PSA:C-18ประเมินโดยใช้ ANOVA single factor ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าร้อยละการกลับคืนแตกต่างกันอย่างมีไม่นัยสำคัญที่ใช้ตัวดูดซับทั้ง 3 ชนิดนี้ นอกจากนี้ความแม่นและความเที่ยงของการสกัดแคชเชอร์ส (อะฟลาทอกซินที่เติมลงในข้าวกล้อง 1 μg/g) อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของการกลับคืน 82-101%และRSD $\leq$11%(ยกเว้นร้อยละการกลับคืน76%และRSD $\leq$15%สำหรับจี2 ที่ใช้ตัวดูดซับ PSA:C-18) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของ AOAC สำหรับการกลับคืน 80-110%และ RSD $\leq$ 11%

คำสำคัญ: เทคนิค QuEChERS, อะฟลาทอกซิน, ตัวดูดซับชนิดของแข็ง, ข้าวกล้อง

Title: Determination of mycotoxins in brown rice using QuEChERS extraction and high performance liquid chromatography

Student names 1. Miss Pimkuan Jaiwong ID 5333102523

2. Mr. Natthapong Napapipat ID 5333072323

Advisor Associate Professor Dr. Thumnoon Nhujak

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

Abstract

In this work, a method for quantitative determination of aflatoxins, including B1, B2, G1 and G2, in brown rice were developed using high performance liquid chromatography (HPLC) and QuEChERS sample preparation. An isocratic mobile phase of 45:55 methanol:water was found to achieve baseline resolution of these four analytes, using the following HPLC conditions: C-18 column (LiChrosper®, 250 mm length, 4 mm dimension), flow rate of 0.7 mL/min. Instrumental LOD and LOQ for four analytes were obtained to be and 0.03-0.05and 0.09-0.17 µg/mL, respectively. Acceptable accuracy and precision in HPLC quantitative analysis were obtained with accuracy of 87-113, and RSD$\leq$8% (5 µg/mL),$\leq$ 10% (1 µg/mL) and $\leq$ 13% (LOQ), within AOAC recovery of 80-110% (0.1-10 µg/mL) and AOAC RSD $\leq$ 7.3% (5 µg/mL), $\leq$11% (1 µg/mL) and $\leq$15% (LOQ). In QuEChERS extraction, brown rice (2 g)spiked with aflatoxins 1 µg/g was extracted using acetonitrile (5 mL) in a presence of NaCl (1 g) and $MgSO_4$ (4 g), and then cleaned up based on dispersive solid phase extraction (dSPE) usingthree types of sorbents (50 mg) such as PSA, C-18,PSA:C-18. Evaluating by anANOVA single factor at the confidence level of 95%, non-significant different in recovery of four analytes was found these three sorbents used.In addition, acceptable accuracy and precision of QuEChERS extraction (1 µg/g aflatoxins spiked in brown rice) were obtained with recovery of 82-101%and RSD $\leq$ 11%, except for recovery of 76% and RSD of 15% for G2 with PSA:C-18 used, within AOAC acceptable recovery of 80-110% and RSD$\leq$11%.

Keyword: QuEChERS, aflatoxin, sorbent, brown rice

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้เนื่องด้วยความอนุเคราะห์อย่างสูงและความช่วยเหลืออย่างดีจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงที่คอยให้คำปรึกษาและคำชี้แนะทำให้รายงานฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

อีกทั้งขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช และอาจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบและสละเวลาในการตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์ อาจารย์ผู้ประสานงานงานในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณนิสิตปริญญาโท นายอดิศร เจตนะจิตรและนางสาวสุปรียา สุอังคณารัตน์ และนิสิตปริญญาโทอีกหลายๆท่านที่ให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยนี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูป	ซ
สารบัญตาราง	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.1.1 ข้อมูลเบื้องต้นของสาร	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย	5
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	5
1.5 ประโยชน์งานวิจัย	5
บทที่ 2 ทฤษฎี	6
2.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิคคิวโครมาโทกราฟี	6
2.1.1 ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่	6
2.1.2 ระบบของปั๊ม	6
2.1.3 ระบบฉีดสารตัวอย่าง	7
2.1.4 คอลัมน์	9
2.1.5 เครื่องตรวจวัด	9
2.2 เทคนิคแคชเชอร์ส	11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	13
3.1 สารเคมีและวัสดุ	13
3.2 เครื่องมือ	13
3.3 การวิเคราะห์ด้วย HPLC	14
3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารสกัดอะฟลาทอกซิน	14

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

3.5 การเตรียมสาร 15
3.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน 15
3.7 ตัวอย่าง 16
บทที่ 4 ผลการทดลอง 19
4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารอะฟลาทอกซินด้วย HPLC 19
4.2 LOD และ LOQ สำหรับการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินด้วย HPLC 19
4.3 กราฟสอบเทียบ 20
4.4 ความเที่ยงและความแม่นของ HPLC 23
4.4.1 ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน 24
4.5 ตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิด้วยที่สกัดด้วยเทคนิคแคชเชอร์ส 26
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 34

เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก 37
ประวัติผู้วิจัย 52

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูป **หน้า**

1.1 แสดงโครงสร้างอะฟลาทอกซินบี1 2

1.2 แสดงโครงสร้างอะฟลาทอกซินบี2 2

1.3 แสดงโครงสร้างอะฟลาทอกซินจี1 2

1.4 แสดงโครงสร้างอะฟลาทอกซินจี2 2

2.1 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง HPLC 6

2.2 วาล์วอยู่ในตำแหน่ง Inject 8

2.3 สารตัวอย่างถูกดึงมาเพื่อล้างท่อนำสารตัวอย่าง 8

2.4 วาล์วเปลี่ยนเป็นตำแหน่ง Load 8

2.5 สารตัวอย่างไหลเข้าสู่ท่อสารตัวอย่างเตรียมเข้าสู่คอลัมน์ 8

2.6 วาล์วกลับมาอยู่ในตำแหน่ง Inject สารตัวอย่าง ไหลเข้าสู่คอลัมน์และเข้าสู่เครื่องตรวจวัด 8

2.7 แสดงการไหลผ่านคอลัมน์ของสารตัวอย่าง 9

2.8 แสดงการเกิดโครมาโทแกรมของเครื่อง HPLC 10

2.9 โครงสร้าง PSA 11

2.10 โครงสร้าง C-18 12

2.11 โครงสร้าง $-NH_2$ 12

2.12 โครงสร้าง aluminium oxide 12

2.13 โครงสร้าง magnesium silicate 12

3.1 ตัวอย่างข้าวกล้อง 18

3.2 การบดตัวอย่างข้าวกล้อง 18

4.1 กราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2 21

4.2 กราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี1 21

4.3 กราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี2 22

4.4 กราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1 22

4.5 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ใน mobile phase ที่เป็น acetonitrile 100% 28

4.6 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ใน mobile phase ที่เป็น methanol 100% 28

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูป **หน้า**

4.7 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ใน mobile phase ที่เป็น methanol:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 70:30 29
4.8 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ใน mobile phase ที่เป็น methanol:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 50:50 29
4.9 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ใน mobile phase ที่เป็น methanol:acetonitrile:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 25:20:55 30
4.10 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ใน mobile phase ที่เป็น methanol:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 45:55 30
4.11 โครมาโทแกรมตัวอย่างข้าวกล้องที่สกัดด้วยเทคนิค QuEChERS 31
4.12 โครมาโทแกรมตัวอย่างข้าวกล้องที่สกัดด้วยเทคนิค QuEChERS เพิ่มตัวดูดซับ PSA 31
4.13 โครมาโทแกรมตัวอย่างข้าวกล้องที่สกัดด้วยเทคนิค QuEChERS เพิ่มตัวดูดซับ C-18 32
4.14 โครมาโทแกรมตัวอย่างข้าวกล้องที่สกัดด้วยเทคนิค QuEChERS เพิ่มตัวดูดซับ PSA และ C-18 32
4.15 ตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS 33
4.16 ตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS และเพิ่มตัวดูดซับ 33

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	แสดงชนิดตัวตรวจวัดเครื่อง HPLC	10
3.1	แสดง mobile phase และอัตราส่วนของ mobile phase ที่ใช้	14
3.2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินและความเข้มข้นที่คำนวณได้จากค่าการดูดกลืนของแสงตามสมการ Beer's law	16
3.3	ปริมาตรอะฟลาทอกซินที่เติมลงในตัวอย่างข้าวกล้อง (spiked)	17
3.4	แสดงปริมาณตัวดูดซับของแข็ง (d-SPE) ที่เติมลงไปในแต่ละหลอดทดลอง	17
4.1	LOD และ LOQ ของเครื่อง HPLC	20
4.2	สมการเส้นตรงของกราฟสอบเทียบ, ค่าเฉลี่ยเวลารีเทนชัน (t_r) ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน	20
4.3	ค่าความแม่นเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความเที่ยงในการวิเคราะห์และเกณฑ์การยอมรับได้ของ AOAC ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน จี2, จี1, บี2 และบี1 ภายในวันเดียวกัน	25
4.4	ค่าความแม่นเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความเที่ยงในการวิเคราะห์และเกณฑ์การยอมรับได้ของ AOAC ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน จี2, จี1, บี2 และบี1 ต่างวันกัน	25
4.5	ข้อมูลค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืน, ความเที่ยงของการศึกษาและค่า P-Value ที่คำนวณด้วย Anova: Single factor	27

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

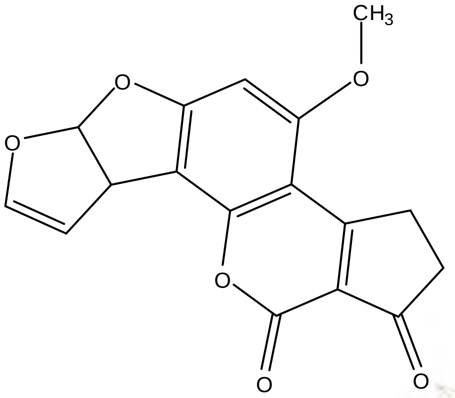
บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ

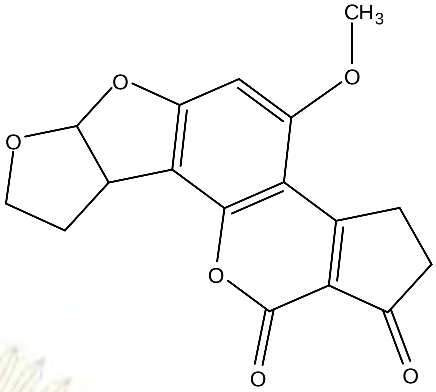
ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย อีกทั้งยังเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* ถือเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ ในอดีตคนไทยนิยมรับประทานข้าวสารหรือข้าวที่ผ่านการขัดสี แต่ในปัจจุบันนิยมคนไทยนั้นรักษาสุขภาพมากขึ้นจึงเปลี่ยนจากการบริโภคข้าวขาวขัดสีมารับประทานข้าวกล้อง แม้ว่าข้าวขัดสีและข้าวกล้องมีปริมาณพลังงาน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนใกล้เคียงกัน แต่กระบวนการผลิตและสมบัติทางโภชนาการอื่นๆแตกต่างกัน เมื่อเปลือกของเมล็ดข้าวเปลือกถูกกะเทาะออกจะได้ข้าวกล้อง ถ้าต้องการได้ข้าวสารผิวของเมล็ดข้าวอีกชั้นหนึ่งคือเยื่อหุ้มเมล็ดและจมูกข้าวจะถูกขัดสีออกไปซึ่งทำให้วิตามินและสารอาหารอื่นๆลดลงเช่น วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินบี6 ธาตุเหล็กและแมกนีเซียม ข้าวกล้องมีระยะในการเก็บรักษาน้อยเพราะเกิดความชื้นง่ายจึงทำให้เกิดเชื้อราจำพวกไมโคทอกซิน ซึ่งการวิเคราะห์ไมโคทอกซิข้าวมีหลากหลายวิธี ได้แก่ ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) แก๊สโครมาโทกราฟี (GC) และไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์โครมาโทกราฟีต่อด้วยเครื่องมืออื่นๆ เป็นต้น แต่ยังไม่ปรากฏวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องที่เตรียมด้วยเทคนิคแคชเชอร์สแล้วทำการกรองด้วยตัวดูดซับของแข็ง (dispersive solid phase extraction)

1.1.1 ข้อมูลเบื้องต้นของสาร

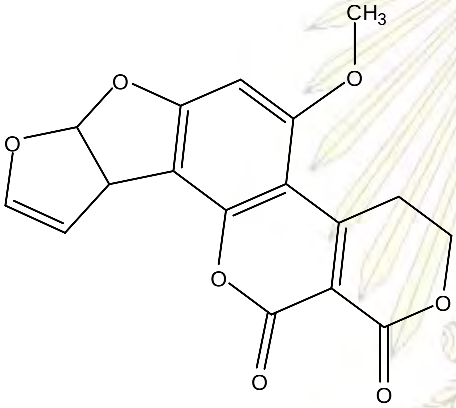
อะฟลาทอกซิน[1] ได้จากเชื้อราสายพันธ์ *Aspergillus flavus* หรือ *Aspergillus parasiticus* มี 4 ชนิด ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี1, อะฟลาทอกซินบี2, อะฟลาทอกซินจี1 และอะฟลาทอกซินจี2 อะฟลาทอกซินจัดเป็นสารก่อมะเร็ง เนื่องจากสารดังกล่าวจะรบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย และก่อให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์



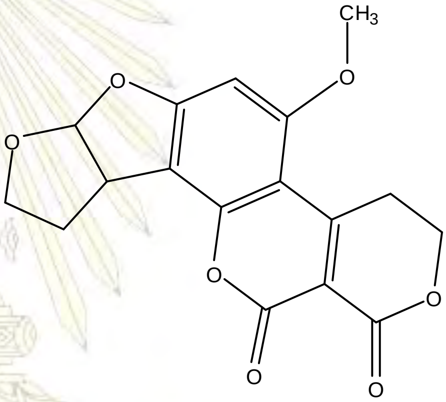
รูป 1.1 แสดงโครงสร้างอะฟลาทอกซินบี1



รูป 1.2 แสดงโครงสร้างอะฟลาทอกซินบี2



รูป 1.3 แสดงโครงสร้างอะฟลาทอกซินจี1



รูป 1.4 แสดงโครงสร้างอะฟลาทอกซินจี2

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bankole[2]และคณะได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราโดยเฉพาะอะฟลาทอกซินบี1 ในเมล็ดของแตงโมโดยเลือกซื้อแบบสุ่มจากชาวไร่ในไร่ตามป่าชื้นและทางเหนือของทุ่งหญ้าสะวันนาที่ประเทศไนจีเรีย ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผู้ศึกษาได้นำเมล็ดมาทำการสกัดผสมกับเมทานอล (methanol) และน้ำที่อัตราส่วน 70:30 จากนั้นทำการกรองสูญญากาศแล้วใส่โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) กับ n-hexane รอสารสกัดแยกชั้นแล้วนำชั้น methanol มากรองใส่สารคลอโรฟอร์ม กรองอีกครั้งจึงนำไประเหยแห้งทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟีใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ โทลูอีน, ไอโซเอมิลและ methanol การจากวิเคราะห์พบว่ามีอะฟลาทอกซินบี1 ของตัวอย่างในป่าชื้น 14.8 μg/kg และที่ทางเหนือของทุ่งหญ้าสะวันนา 11.3

μg/kg ได้ร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของอะฟลาทอกซินบี1 จากการเติมสารละลายมาตรฐานลงไปถึง 86.5 และได้ค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (RSD) 10.3%

Kleigrewe[3] และคณะวิเคราะห์ฟูราซินซี ในช่วงต้นของผลของข้าวโพดและข้าวโพดโดยนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวก์ทำการเติมน้ำและอะซิโตนไนไทร(acetonitrile) แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นเติมแมกนิเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และ NaCl ปั่นหมุนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวก์นำส่วนที่ใสที่ได้มาเติม $MgSO_4$ และ primary secondary amine (PSA) เพื่อกำจัดสารรบกวนแล้วเขย่าจากนั้นนำไปเซ็นตริฟิวก์อีกเป็นครั้งที่สองแล้วเติมตัวดูดซับแล้วนำไปประเหยและเติมตัวทำละลาย methanol:น้ำ ที่อัตราส่วนเท่ากับ 50:50 แล้วทำการเซ็นตริฟิวก์รอบสุดท้าย นำส่วนที่เป็นของเหลวมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีเท็นเด็มแมสสเปกโทรเมทรี (HPLC-MS/MS) ให้ mobile phase methanol:tetrahydropholate เป็นสารละลายชนิดเอ สารละลายชนิดบีเป็นน้ำใช้การทำให้ระบบเฟสเลื่อนที่ (mobile phase) เป็นแบบ gradient elution ได้ %recovery ของวิธีนี้เท่ากับ 80

Rubert[4] และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคการสกัดไมโคทอกซินทั้ง 14 ชนิดด้วยและกำจัดสารรบกวนด้วย matrix solid-phase dispersion (MSPD) โดยมาประยุกต์ในการสกัดไมโคทอกซินจากตัวอย่างผงแป้งซึ่งเก็บตัวอย่างจากร้านค้าทั่วไปจากการศึกษาพบไมโคทอกซินจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ นิวาลีนอล (Nivalenol) และ บิวเวอร์เรีย (Beauvericin) ซึ่งเป็นไมโคทอกซินที่ปนเปื้อนจากขั้นตอนนวดแป้งขนมปัง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเริ่มจากการบดตัวอย่างผสมกับคาร์บอน18 (C-18) ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย acetonitrile:methanol (50:50) จากนั้นนำไปกรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศแล้วทำให้แห้งนำส่วนที่แห้งละลายด้วยmethanol นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีเท็นเด็มแมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS/MS) ในขั้นตอนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS ใช้คอลัมน์ประเภท C-18 เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นแบบ gradient elution โดย mobile phase เป็นสารละลายเอมโมเนียมฟอเมต (amoniumformate) ที่ความเข้มข้น 5 mM สารละลายกรดฟอร์มิก (formic acid) ที่ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร อัตราการไหลของสารเท่ากับ 0.3 mL/s จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค MSDP ในผลในการสกัดสารไมโคทอกซินได้ดี

Antonia[5] และคณะได้ทำการศึกษาไมโคทอกซิน 10 ชนิดซึ่งมีอยู่ในไข่โดยใช้อัลตร้าไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีเท็นเด็มแมสสเปกโทรเมทรี (UHPLC-MS/MS)

ในการตรวจสอบสารพบว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ไมโคทอกซินได้ 5 ชนิดจากทั้งหมด 10 ชนิดในระยะเวลา 7 นาที โดยใช้วิธีการสกัดจากไข่ด้วยวิธีแคชเชอร์ส (QuEChERS) และไม่ผ่านขั้นตอนการทำกำจัดสารรบกวนในการสกัดการตรวจวัดไมโคทอกซินในไข่สามารถตรวจวัดได้ดีขึ้น โดยใส่สารมาตรฐานลงไป (spiked) ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 µg/kg ได้ %recovery อยู่ในช่วง 70-110 ยกเว้นอะฟลาทอกซิน G1 ที่ 10 µg/kg และอะฟลาทอกซิน G2 ที่ 50 µg/kg ที่ได้ค่าRSD ต่ำกว่า 25% ในทุกกรณีขีดจำกัดการวัด (LOD) อยู่ในช่วง 1 µg/kg ถึง 5 µg/kg (สำหรับอะฟลาทอกซินบี1, บี2 และจี1) และได้ค่าขีดจำกัดปริมาณวิเคราะห์ (LOQ) อยู่ในช่วง 1 µg/kg ถึง 10 µg/kg (สำหรับอะฟลาทอกซินบี1, บี2 และจี1)

Yeko[6] และคณะทำการวิเคราะห์ไมโคทอกซินจากเมล็ดข้าวสาลี (semolina) จำนวน 10 ชนิด โดยใช้เทคนิค QuEChERS ในการสกัดตัวอย่าง ส่วนการระบุสารใช้ GC-MS วิเคราะห์สารได้ภายในระยะเวลา 16 นาที ได้ %recovery จากการคำนวณเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ตรวจวัดได้ตากตัวอย่างที่ไม่ได้ spiked และตัวอย่างที่ผ่านการ spiked ค่าที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 74-124 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการภายในวันเดียวกันและต่างวันกันมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด

Liao[7]และคณะ ได้ศึกษาการวิเคราะห์ไมโคทอกซินทั้งหมด 26 ชนิด ในธัญพืชสำเร็จรูปและผลิตภัณฑ์จากถั่วโดยใช้ LC-MS/MS ใช้ acetonitrile:น้ำ (85:15) ในการสกัดตัวอย่างและวิเคราะห์โดยใช้วิธี internal standard ได้ค่าเฉลี่ย %recovery ของอะฟลาทอกซินบี1 อยู่ในช่วง 83 – 121, บี2 อยู่ในช่วง 77 – 107, จี1 อยู่ในช่วง 73 – 126 และจี2 อยู่ในช่วง 74 – 122 และได้ค่าเฉลี่ย RSD อะฟลาทอกซินบี1 อยู่ในช่วง 3 – 22, บี2 อยู่ในช่วง 3 - 18, จี1 อยู่ในช่วง 4 – 15 และจี2 อยู่ในช่วง 4 - 14

Arroyo-Manzanares[8] และคณะได้ศึกษาเพื่อพัฒนาขั้นตอนการสกัดและการวิเคราะห์ไมโคทอกซินจาก milk thistle (*Silybum marianum)* โดยใช้ UPHLC-MS/MS ในขั้นตอนการสกัดใช้เทคนิค QuEChERS ร่วมกับเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของเหลว (DLLME) ซึ่งพบว่าการสกัดโดยใช้ QuEChERS เพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้วิเคราะห์ได้ในอะฟลาทอกซินจึงต้องกำจัดสารรบกวนโดยใช้ DLLME แต่เมื่อทำการทำความสะอาดโดย DLLME แล้วพบว่า Fumonisin B1, Fumonisin B2, Nivalenol, Deoxynivalenol และ Fusarenon-X ที่มีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำจึงทำให้ต้องแบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกที่ผ่าน QuEChERS แล้วนำไปวิเคราะห์กับส่วนที่ต้อง QuEChERS และ DLLME แล้วจึงนำไปวิเคราะห์

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

พัฒนาวิธีการแคชเชอร์เพื่อทำปริมาณและคุณภาพวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวกล้อง

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

- หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะสารอะฟลาทอกซินชนิดบี1, บี2, จี1 และจี2
- ตรวจความใช้ได้ของวิธีการ HPLC
- เตรียมตัวอย่างข้าวด้วยเทคนิค QuEChERS

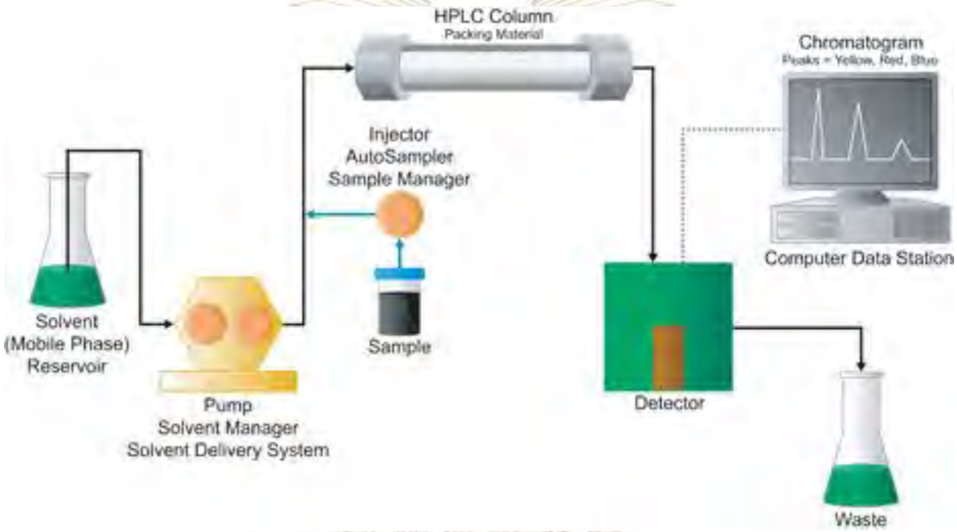
1.5 ประโยชน์งานวิจัย

สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไมโคทอกซินด้วย HPLC และสามารถเตรียมตัวอย่างได้จากวิธีการแคชเชอร์สำหรับทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพของสารพิษจากอะฟลาทอกซิน

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)[9-11]



รูป 2.1 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง HPLC

2.1.1) ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (solvent reservoir)

- ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ควรต่อกับอุปกรณ์ไล่ฟองอากาศที่ละลายอยู่ เนื่องจากฟองอากาศส่งผลต่อคอลัมน์ ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกของคอลัมน์ลดลง

- เฟสเคลื่อนที่ใช้กับเครื่อง HPLC ได้แก่สารละลายอินทรีย์ และสารละลายของเกลือต่างๆ เฟสเคลื่อนที่ควรเป็นสารที่สามารถทำละลายตัวอย่างได้และปราศจากสิ่งเจือปน อีกทั้งเหมาะสมกับเครื่องตรวจวัด (detector)

2.1.2) ระบบของปั๊ม (pump)

หน้าที่ดึง mobile phase ให้เข้าสู่ระบบ HPLC และปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้สัมพันธ์กับขนาดของคอลัมน์ อีกทั้งปรับอัตราส่วนระหว่างเฟสเคลื่อนที่ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ระบบปั๊มแบ่งเป็น 3 ประเภทคือ

- ระบบไซริงค์(syringe type) นิยมใช้กับคอลัมน์ขนาดเล็กเพราะมีขีดจำกัดในการดูดของเหลวปริมาตรมากๆ

- ระบบแทนที่ของเหลว (reciprocating piston type) ควบคุมปริมาตรโดยการควบคุมระยะชักของลูกสูบเครื่องสูบชนิดนี้สามารถดูดของเหลวในปริมาณมากได้

- ระบบความดันคงที่ (constant pressure pump) ควบคุมการไหลของของเหลวเข้าสู่คอลัมน์โดยการใช้ความดันของแก๊สเฉื่อยที่คงที่ดันให้ของเหลวไหลไปในคอลัมน์อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา

ระบบอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

- Isocratic pump เป็นการใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คงที่ตลอดการทดลอง

- Gradient pump เป็นการใช้เฟสเคลื่อนที่ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปและมีเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างการทดลอง

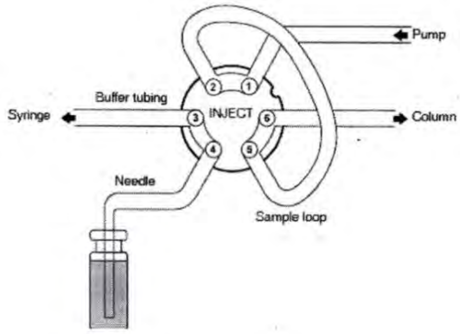
2.1.3) ระบบฉีดสารตัวอย่าง (sample injection)

ทำหน้าที่ควบคุมปริมาตรสารตัวอย่างที่ไหลเข้าสู่คอลัมน์ แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

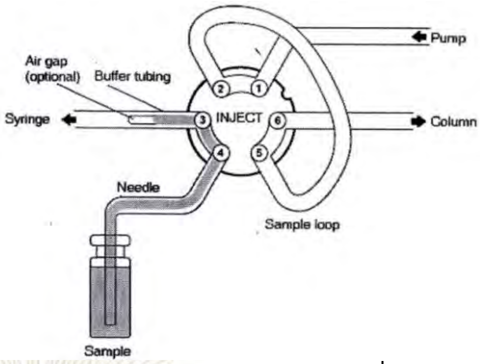
- ระบบไซริงค์เป็นชนิดที่ใช้ไซริงค์ขนาดเล็กดูดสารตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการฉีดผ่านเยื่อกั้น (septum) ซึ่งมักเป็นยางซิลิโคนด้านบนคอลัมน์

- ระบบโรตารี่ (rotary type) เป็นชนิดที่ใช้ลิ้นควบคุมการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์โดยในขั้นตอนแรกจะใช้ไซริงค์ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ (fixed loop injector) หลังจากนั้นจึงหมุนลิ้นให้สารละลายซึ่งเป็นเฟสนิ่งไล่ของเหลวทั้งหมดลงสู่คอลัมน์นอกจากนี้ยังสามารถดูดสาร ตัวอย่างเข้าไปในปริมาตรที่ต้องการฉีดเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่างซึ่งมีสารละลายอยู่ก่อนแล้วบางส่วนเมื่อหมุนลิ้นไปที่ตำแหน่งฉีดสารละลายจะพาสารตัวอย่างทั้งหมดเข้าไปใน คอลัมน์ (syringe loop injector)

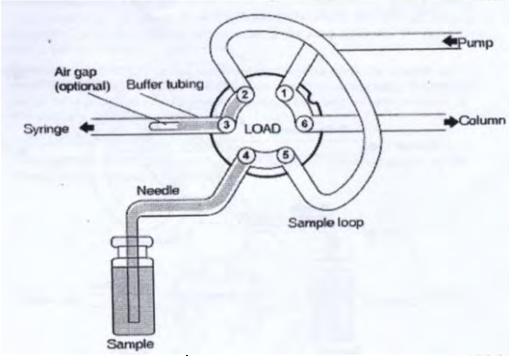
รูปแสดงการทำงานของระบบฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง HPLC



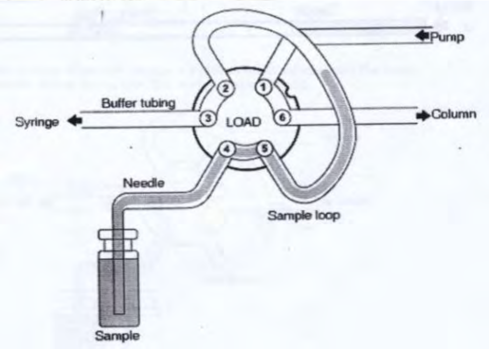
รูป 2.2 วาล์วอยู่ในตำแหน่ง inject



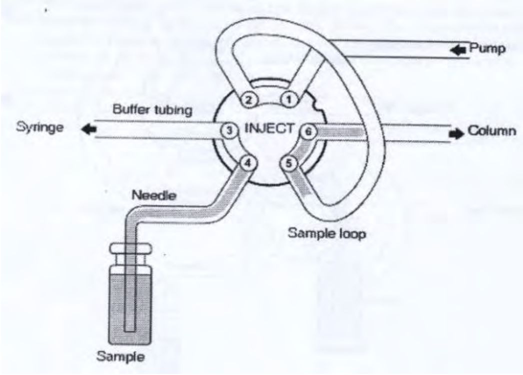
รูป 2.3 สารตัวอย่างถูกดึงมาเพื่อล้างท่อนำสารตัวอย่าง (หมายเลข 3,4)



รูป 2.5 วาล์วเปลี่ยนเป็นตำแหน่ง Load



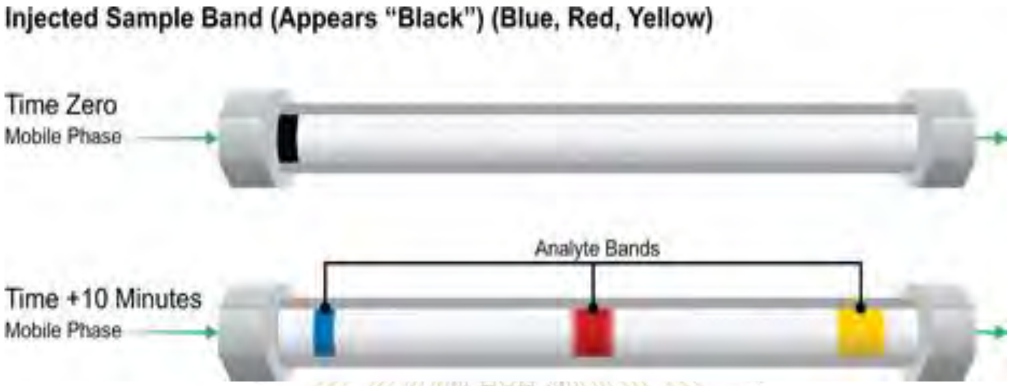
รูป 2.5 สารตัวอย่างไหลเข้าสู่ท่อสารไหลเข้าสู่ท่อสารตัวอย่างเตรียมเข้าสู่คอลัมน์ (หมายเลข 5)



รูป 2.6 วาล์วกลับมาอยู่ในตำแหน่ง Inject สารตัวอย่าง (หมายเลข 5) ไหลเข้าสู่คอลัมน์ (หมายเลข 6) และเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector)

2.1.4) คอลัมน์ (column)

ทำจากแก้วพลาสติกหรือเหล็กกล้าไร้สนิมมีความยาวในการใช้งานตั้งแต่ 10-150 ซม.สารที่ผ่านเข้าคอลัมน์จะถูกแยกส่วนประกอบตามสภาพขั้วของสารและคอลัมน์



รูป2.7 แสดงการไหลผ่านคอลัมน์ของสารตัวอย่างแถบสีดำ (รูปบน) แสดงสารตัวอย่างก่อนเข้าสู่คอลัมน์ แถบสีแดง สีน้ำเงิน สีเหลือง (รูปด้านล่าง) แสดงสารตัวอย่างขณะอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งแถบสีแต่ละแถบจะเคลื่อนที่ออกคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดเฟสเคลื่อนที่และชนิดของคอลัมน์

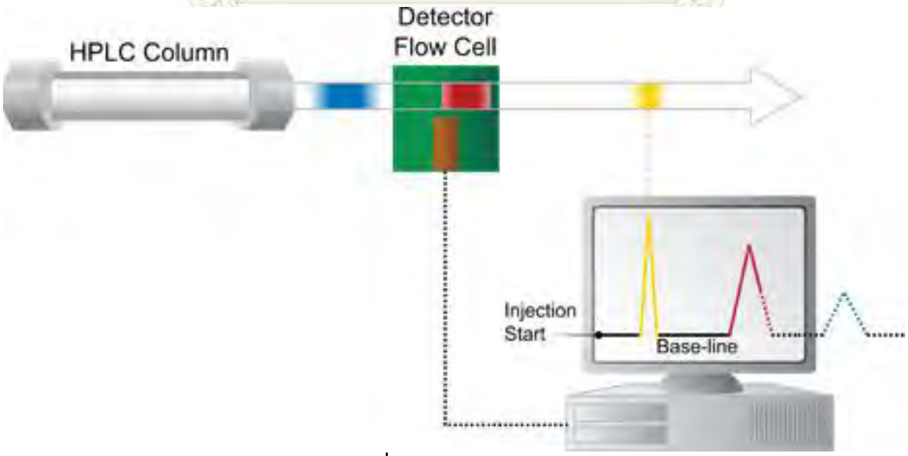
2.1.5) เครื่องตรวจวัด (detector)

มีหน้าที่วัดปริมาณของสารเพื่อส่งให้เครื่องบันทึกผลทำการบันทึกค่าและแสดงกราฟของสารชนิดต่างๆตัวตรวจหามีหลายชนิดขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่ต้องตรวจหา

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง2.1 แสดงชนิดตัวตรวจวัดเครื่อง HPLC

ชนิดตัวตรวจวัด	ความเร็วในการตรวจวัด (g/min)	ผลของอุณหภูมิ	อัตราการไหลมีผลต่อการตรวจวัด	หมายเหตุ
UV absorption	$5x10^{-5}$	ส่งผลน้อย	ไม่มีผล	นิยมใช้ในช่วง 254-280 nm
IR absorption	10^{-6}	ส่งผลน้อย	ไม่มีผล	-
Fluorometry	10^{-6}	ส่งผลน้อย	ไม่มีผล	-
Refractive index	$5x10^{-7}$	ส่งผลน้อย	ไม่มีผล	วัดความแตกต่างดัชนีหักเหของสาร
Conductivity	10^{-8}	±1°C	มีผล	-
Flame ionization	10^{-8}	ไม่มีผล	มีผล	สารตัวอย่างถูกเผาให้เป็นไอออน และถูกจับโดยแอโนดเพลท
Mass Spectrometry	10^{-10}	ไม่มีผล	ไม่มีผล	วิเคราะห์สารได้ถึง 0.2-1.0 ng

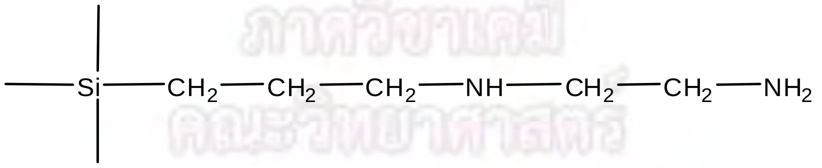


รูป 2.8 แสดงการเกิดโครมาโทแกรมของเครื่อง HPLC จากภาพจะเห็นว่าพีคสีเหลืองปรากฏบนหน้าจอคอมพิวเตอร์แสดงถึงสารสีเหลือง (บนลูกศร) เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด และส่งสัญญาณมายังโปรแกรคอมพิวเตอร์ปรากฏเป็นพีคที่เวลาต่างกันเนื่องจากสารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์และเข้าสู่เครื่องตรวจวัดในเวลาที่แตกต่างกัน

2.2 เทคนิคแคชเชอร์ส(QuEChERS)[13,17]

QuEChERS มาจากคำว่า รวดเร็ว (Quick), ง่าย (Easy), ราคาถูก (Cheap), มีประสิทธิภาพ (Effective), มีความทนทาน (Rugged), ปลอดภัย (Safe) เป็นเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช-สัตว์ที่ตกค้างในผักและผลไม้ หากต้องนำมาใช้กับสารตัวอย่างที่มีความชื้นต่ำเช่น ข้าวกล้อง จึงต้องมีการเติมน้ำก่อนขั้นตอนการสกัดเพื่อทำให้เกิดการชุ่มน้ำและสกัดแยกได้ดีขึ้น เทคนิคนี้ได้ขยายขอบเขตการวิเคราะห์และมีการปรับเปลี่ยนขั้นตอนต่างๆหลายครั้งเช่น เทคนิคที่มีทั้งขั้นตอนการสกัดและการทำความสะอาดสารตัวอย่าง นอกจากจะใช้ในการวิเคราะห์สารตกค้าง ยังสามารถนำมาใช้เตรียมตัวอย่างสำหรับเมทริกซ์อาหารประเภทอื่นๆอีกหลายชนิดเช่น ถั่ว น้ำผึ้ง อาหารสัตว์ เป็นต้น ข้อดีของ QuEChERS คือการให้ร้อยละการกลับคืนสูง สกัดสารได้พร้อมกันหลายชนิด ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยและใช้ตัวอย่างน้อย ลดค่าใช่จ่ายจากสารเคมี ลดการใช้เครื่องแก้ว จึงเป็นที่สนใจและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายจนพัฒนาเป็นวิธีมาตรฐานของ AOAC ขั้นตอนของเทคนิคนี้เริ่มจากสกัดสารตัวอย่างด้วย acetonitrile ที่มี magnesium sulphate ผสมอยู่ สารจะแยกชั้นออกจากกัน จากนั้นแยกสารละลายสกัดออกมาทำความสะอาดด้วยตัวทำความสะอาดสารสกัดอีกครั้งด้วยการเลือกใช้ตัวดูดจับที่เหมาะสมป้องกันไม่ให้สิ่งปนเปื้อนเข้ามารบกวนการตรวจวัด สาเหตุที่ใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลายเนื่องจากมีผู้ศึกษาพัฒนาเทคนิคนี้ และพบว่า acetonitrile เหมาะสมกับเทคนิคการวิเคราะห์ทั้ง GC/MS และ LC/MS โครมาโทแกรมที่ได้มีสิ่งรบกวนน้อยที่สุด การเลือกใช้ตัวดูดซับเป็นสิ่งสำคัญ ชนิดของตัวดูดซับที่ใช้ในเทคนิค QuEChERS มีดังนี้

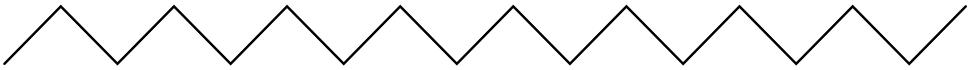
Primary Secondary Amine (PSA) เป็นสารมีขั้ว ใช้กำจัดสารรบกวนที่มีสภาพขั้วได้แก่สารที่มีพันธะไฮโดรเจน กรดไขมัน น้ำตาล เป็นต้น



รูป 2.9 โครงสร้าง PSA

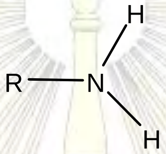
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Octadecylsilyl (C-18) เป็นสารไฮโดรคาร์บอนสายโซ่ยาว มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม ใช้ในการกำจัดสารที่ไม่มีขั้วได้แก่ กรดไขมัน น้ำมัน เป็นต้น



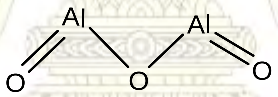
รูป 2.10 โครงสร้างของ C-18

Aminopropyl (-NH_2) เป็นสารที่มีขั้วเช่นเดียวกับ PSA มีประสิทธิภาพมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลาย



รูป 2.11 โครงสร้างของ –NH_2

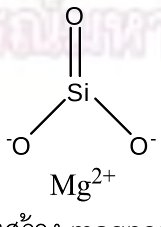
Alumina เป็นสารออกไซด์ของอะลูมิเนียม กำจัดสารจำพวกน้ำมัน



รูป 2.12 โครงสร้าง aluminium oxide

Graphitized carbon black (GCB) เป็นสารที่มีอะตอมจับกันเป็นวง สามารถกำจัดสาร sterols, chlorophyll และสารโครงสร้างแบบ planar

Florisil เป็นสารประกอบของ magnesium silicate ใช้กำจัดสารประเภทไขมันและสารที่มีสภาพขั้วต่ำ



รูป 2.13 โครงสร้าง magnesium silicate

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
การทดลอง

3.1 สารเคมีและวัสดุ

1) สารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซินชนิด บี1, บี2, จี1 และจี2
2) ตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิ
3) acetonitrile (CH_3CN, Gradient grade); Merck
4) methanol (CH_3OH, Gradient grade); Merck
5) น้ำ
6) magnesium sulphate anhydrous ($MgSO_4$); Panreac
7) sodium chloride (NaCl); UNIVAR
8) Primary and Secondary Amine (PSA, Bonded silica); Bulk
9) Carbon-18 (C-18); SUPELCO
10) centrifuge tube ขนาด 50 mL แบบมีฝาปิด
11) centrifuge tube ขนาด 1.5 mL แบบมีฝาปิด
12) nylon membrane filter 0.45 µm; Chrom Tech
13) บีกเกอร์
14) ปิเปตขนาด 5 mL
15) ขวดสีชา (vial) ขนาด 2 mL และ 8 mL

3.2 เครื่องมือ

1) high performance liquid chromatograph(HPLC); Waters 1525
2) vortex; Vortex-2 Genie
3) micro Pipet 10 µL, 100 µL, 1000 µL; eppendorf
4) เครื่องชั่ง; Mettler Toledo
5) เครื่อง centrifuge; Hettich Universal 320 R

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีดังนี้

Injection volume	:	20 µL
Flow rate	:	0.7 mL/min
Column	:	LiChrosper® 100 RP-18e (250 mm X 4 mm)
Column temperature	:	25 ºC
Detector	:	UV/ visible detector
Wavelength	:	365 nm

3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน

ใช้ mobile phase เป็น methanol:น้ำ สภาวะที่เหมาะสมพิจารณาจากพีกสารมาตรฐานอะฟลาท็อกซินที่แยกออกจากกันอย่างชัดเจนและใช้เวลารีเทนชัน (T_r)ที่สั้นที่สุด

ตาราง 3.1mobile phase[12] และอัตราส่วนของ mobile phase ที่ใช้

ลำดับที่	Flow rate (mL/min)	สารที่ใช้	อัตราส่วนสารที่ใช้
1	1	Acetonitrile	100
2	1	MeOH	100
3	0.7	MeOH : น้ำ	70 : 30
4	0.7	MeOH : น้ำ	50 : 50
5	0.7	MeOH : Acetonitrile : น้ำ	25 : 20 : 55
6	0.7	MeOH : น้ำ	45 : 55

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การเตรียมสาร[6]

3.5.1) สารมาตรฐาน (stock standard solution) ความเข้มข้นประมาณ 40 μg/mL

1) ชั่งอะฟลาทอกซินบี1, บี2, จี1และ จี2 อย่างละ 1 mg

2) ละลายด้วยสารละลายผสม Benzene-Acetonitrile (98:2,v/v)และปรับปริมาตรเป็น 25 mL

3.5.2) เตรียมสารมาตรฐานอะลาทอกซินความเข้มข้น LOQ, 0.5 μg/mL, 1.0 μg/mL, 2.0 μg/mL และ 5.0 μg/mL เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง (calibration curve) ใช้ความเข้มข้นจากตาราง 3.2 ในการคำนวณ

1) ปิเปตสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1, บี2, จี1 และจี2 จากสารมาตฐานความเข้มข้น ~40 μg/mL ใส่ขวดสีชา

2) ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนมีปริมาตร 5.0 mL จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

3) กรองสารด้วย nylon membrane filter

4) วิเคราะห์ด้วย HPLC

3.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี external standard calibration curve โดยนำสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินที่ประกอบด้วยอะฟลาทอกซินบี1, บี2, จี1 และจี2 จำนวน 5 ความเข้มข้นคือ 5.0μg/mL, 2.0 μg/mL, 1.0 μg/mL, 0.5 μg/mL และ 0.1 μg/mL วิเคราะห์ด้วย HPLC และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสาร ให้แกน y แสดงข้อมูลพื้นที่ใต้พีก (peak area) และแกน X แสดงความเข้มข้นของสาร (mg/L)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 ตัวอย่าง

3.7.1) การเตรียมตัวอย่างข้าว

1) บดตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น

2) ชั่งตัวอย่างข้าวกล้องที่บดแล้วใส่ใน centrifuge tube 5 หลอด หลอดละ 2 กรัม

3) เติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินลงในตัวอย่างข้าวจำนวน 4 หลอด ดังตาราง 3.3

3.7.1.4) นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

3.7.2) การสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS[8]

1) เติมน้ำปริมาตร 8 mL

2) ปิเปต acetonitrile 5.0 mL ใส่ในหลอดสารตัวอย่างแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

3) ชั่ง $MgSO_4$ 4.0 g และ NaCl 1.0 g แล้วใส่ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

4) ปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รอบหมุน 3500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

5) ปิเปตชั้น acetonitrile (ชั้นบน) 1 mL ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 1.5 mL แบบมีฝาปิดแล้วเติมสารดังตาราง 3.4

6) ตั้งหลอดทดลองที่ 3, 4, 5 ไว้ประมาณ 15นาที

7) ปิเปตชั้น acetonitrile (ชั้นบน) 700 µL แล้วกรองใส่ขวดสีชา

8) วิเคราะห์ด้วย HPLC

ตาราง 3.2ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินและความเข้มข้นที่คำนวณได้จากค่าการดูดกลืนของแสงตามสมการ Beer’s law

อะฟลาทอกซิน	ค่าการดูดกลืนแสงUV (nm)	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (stock solution) µg/mL
บี 1	365	42.7
บี 2	365	40.9
จี 1	365	58.2
จี 2	365	35.8

ตาราง 3.3 ปริมาตรอะฟลาทอกซินที่เติมลงในตัวอย่างข้าวกล้อง (spiked)

หลอดที่	ปริมาตรAFB1 (μL)	ปริมาตรAFB2 (μL)	ปริมาตรAFG1 (μL)	ปริมาตรAFG2 (μL)
1	-	-	-	-
2	117	112	86	140
3	117	112	86	140
4	117	112	86	140
5	117	112	86	140

ตาราง 3.4 ปริมาณตัวดูดซับของแข็ง (d-SPE) ที่เติมลงไปในแต่ละหลอดทดลอง[15-16]

หลอดที่	MgSO4 (mg)	PSA (mg)	C-18 (mg)	หมายเหตุ
1	-	-	-	กรองใส่vialสีชา
2	-	-	-	กรองใส่ vialสีชา
3	150	50	-	-
4	150	-	50	-
5	150	25	25	-
6	-	-	-	กรองใส่ vial สีชา

*หลอดที่ 6 ตัวทำละลาย (Blank) ใช้ประกอบการคำนวณเปรียบเทียบกับอะฟลาทอกซินที่สกัดได้ด้วยเทคนิค QuEChERS ในตัวอย่าง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูป3.1 ตัวอย่างข้าวกล้อง

รูป3.2 การบดตัวอย่างข้าวกล้อง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารอะฟลาทอกซินด้วย HPLC

จากการหาสภาวะที่เหมาะสม (ดังการทดลอง 3.4) สำหรับการแยกสารอะฟลาทอกซินบี1, บี2, จี1และจี2 โดยใช้ mobile phase ระบบ isocratic elution ระหว่าง acetonitrile:น้ำ, methanol:น้ำ (ในอัตราส่วนตามตารางที่ 3.1) ได้โครมาโทแกรมดังรูป 4.6-4.10 เมื่อเปรียบเทียบการแยกของพีกอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 โครมาโทแกรมรูป 4.10 มีพีกที่แยกออกจากกันได้ชัดเจนที่สุด จากนั้นคำนวณค่าการแยก (resolution) ของสภาวะดังกล่าว (แสดงวิธีคำนวณในผ-ก.1) พีก AFG2:พีก AFG1 มีค่าเท่ากับ 2.9 พีก AFG1 :พีก AFB2 มีค่าเท่ากับ 3.1 และพีก AFB2:พีก AFB1 มีค่าเท่ากับ 3.5 จึงสรุปว่า mobile phase ที่เหมาะสำหรับการแยกสารอะฟลาทอกซินบี1, บี2, จี1 และจี2 ออกจากกันคือ mobile phase ที่เป็น methanol:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 45:55 ที่อัตราการไหลของ mobile phase (flow rate) 0.7 mL/min

4.2 LOD และ LOQ[16] สำหรับการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินด้วย HPLC

LOD (Limit of detection) คือค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยอมรับว่าเครื่อง HPLC สามารถตรวจสอบได้ หาได้จากความเข้มข้นที่ให้ความสูงของพีกที่ signal to noise ratio เท่ากับ 3 LOQ (Limit of quantitation) คือความเข้มข้นของสารละลายที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ หาได้จากความเข้มข้นที่ให้ความสูงของพีกที่ signal to noise เท่ากับ 10 ทำการหาค่า LOD และ LOQ โดยใช้สารละลายมาตรฐานที่ประกอบด้วยอะฟลาทอกซินชนิดบี1, บี2, จี1 และจี2 ได้ค่าดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 4.1 LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

	AFB1 (µg/mL)	AFB2 (µg/mL)	AFG1 (µg/mL)	AFG2 (µg/mL)
LOD	0.05	0.03	0.03	0.03
LOQ	0.17	0.11	0.09	0.09

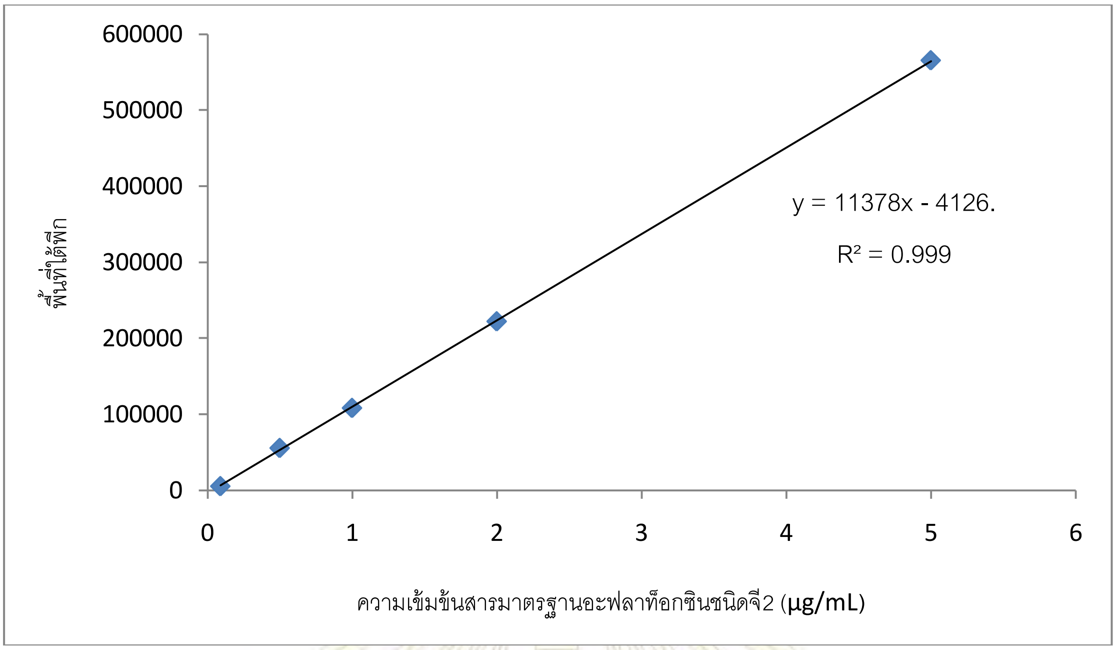
4.3 กราฟสอบเทียบ

ได้ตรวจวัดความเข้มข้นของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินความเข้มข้นในช่วง 0.1- 5.0 µg/mL จำนวน 3 ครั้ง (ดังการทดลองที่ 3.6) สร้างกราฟสอบเทียบจากค่าเฉลี่ยความเข้มข้นโดยใช้ข้อมูลจากตาราง ผ-ข.1, ผ-ข.2, ข-3 และผ-ข.4 จะได้สมการเส้นตรง y = ax + b เมื่อ a คือ ความชันและ b คือจุดตัดแกน y (y-intercept)

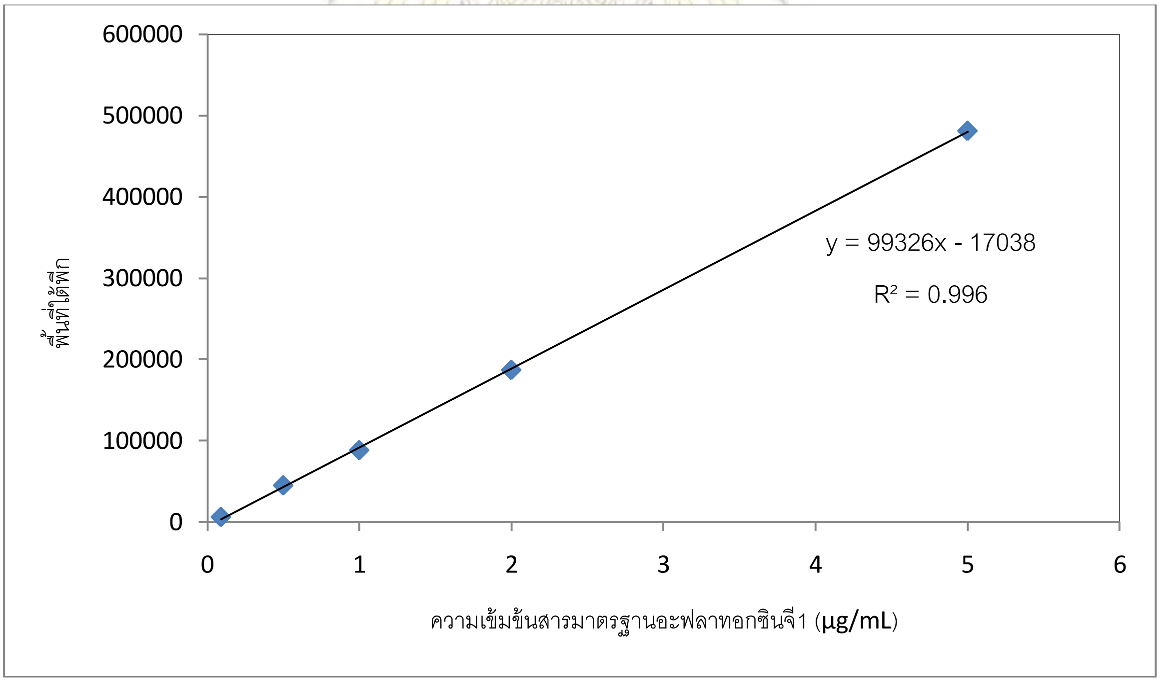
ตาราง 4.2 สมการเส้นตรงของกราฟสอบเทียบ, ค่าเฉลี่ยเวลารีเทนชัน (t_r) ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน

ชนิดสารละลายมาตรฐาน	สมการเส้นตรง	r^2	t_rเฉลี่ย (min)
อะฟลาทอกซินจี2	y = 11378x - 4126	0.999	11.79
อะฟลาทอกซินจี1	y = 99326x - 17038	0.996	14.81
อะฟลาทอกซินบี2	y = 13530x - 6928	0.999	18.97
อะฟลาทอกซินบี1	y = 11323x - 4446	0.999	24.37

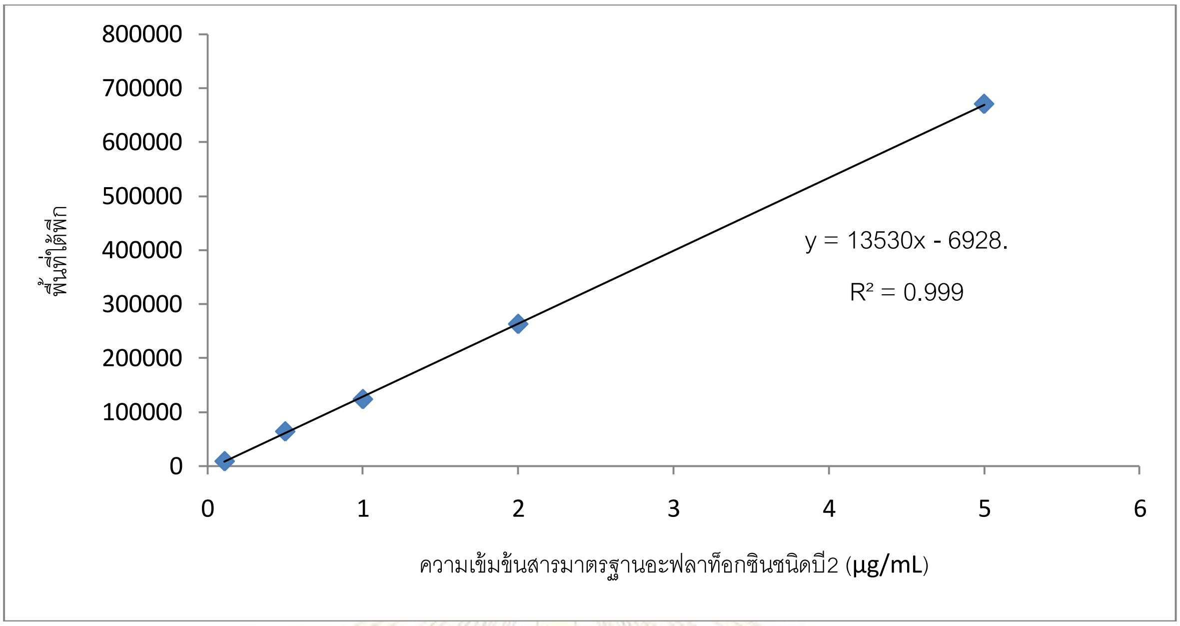
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



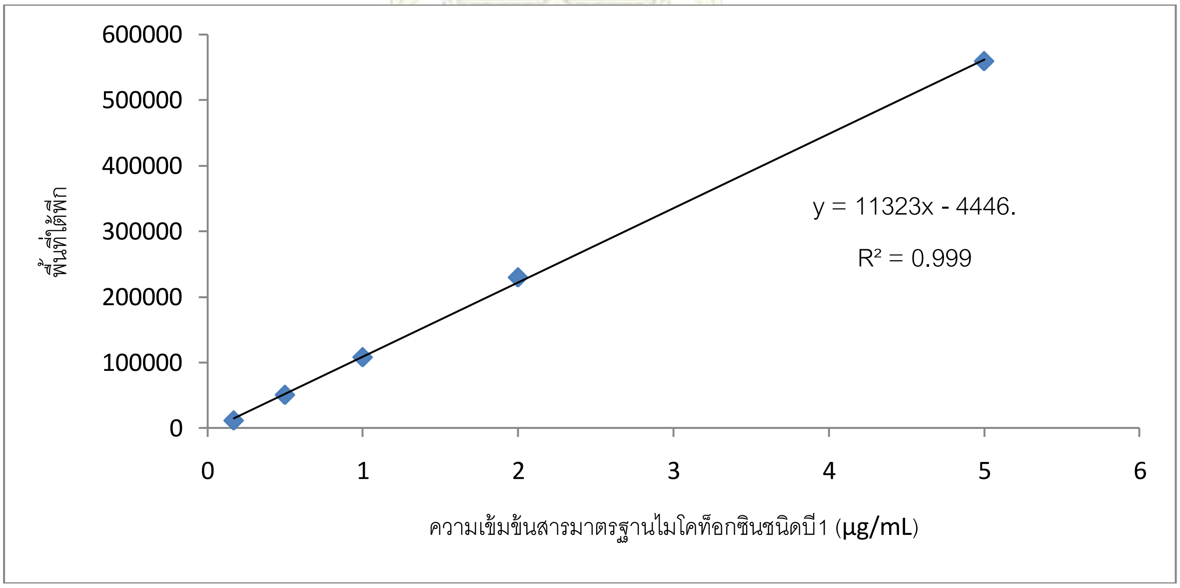
รูป 4.1 กราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2



รูป 4.2 กราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี1



รูป 4.3 กราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี2



รูป 4.4 กราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1

4.4 **ความเที่ยง** (precision) **และความแม่น** (accuracy) **ของ** HPLC

ความเที่ยงวิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนหรือการกระจายตัวของผลจากค่าเฉลี่ยในการวิเคราะห์ซ้ำหลายๆครั้ง วิธีวิเคราะห์ที่ดีจะต้องมีค่าความแปรปรวนต่ำซึ่งค่านี้จะเป็นค่าที่ใช้แสดงความแม่นของวิธีวิเคราะห์ คำนวณได้จากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (Relative standard deviation) หรือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation)

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} X100$$

เมื่อ $\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย

ความแม่น หมายถึง ความสามารถของเครื่อง HPLC ที่วัดความเข้มข้นของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินได้ใกล้เคียงกับค่าแท้จริงซึ่งคำนวณได้จาก

$$\text{ความแม่น} = \frac{\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ค่าความเข้มข้นจริง}} x100$$

ในการทดลองนี้เลือกสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/mL, 1.0 µg/mL และ 5.0 µg/mL (จากการทดลองตอนที่ 3.4) เพื่อให้ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงและแบ่งการศึกษาความเที่ยงความแม่นเป็นสองช่วงเวลาคือ ภายในวันเดียวกัน (Intraday) 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำจำนวน 5 ครั้ง และต่างวันกัน (interday) วันละ 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง
จำนวน 5 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.1 ภายในวันเดียวกัน (intraday) และ ต่างวันกัน (interday)

จากการวิเคราะห์ภายในวันจำนวน 5 ครั้งของแต่ละความเข้มข้น (ดังตาราง 4.3) และระหว่างวันเป็นระยะเวลาทั้งหมด 5 วัน ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง (ดังตาราง 4.4) ได้ค่าความแม่นและความเที่ยงของข้อมูลอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 เมื่อนำมาเปรียบเทียบความแม่นกับมาตรฐาน AOAC (80 – 110% ที่ช่วงความเข้มข้น 0.1 – 10 µg/mL) และความเที่ยงกับมาตรฐาน AOAC (ที่ช่วงความเข้มข้น 0.1 µg/mL - 1 µg/mL อยู่ใน 11-15 %, 1 – 10 µg/mL อยู่ใน 7.3 – 11%) พบว่าค่าความแม่นและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานของอะฟลาทอกซินของภายในวันเดียวกันอยู่ในเกณฑ์ของ AOAC ทั้งหมด ส่วนการวิเคราะห์ระหว่างวันพบว่าความแม่นอยู่ในเกณฑ์ของ AOAC ทั้งหมดร้อยละ 66.67 และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์ของ AOAC ทั้งหมด

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 4.3 ค่าความแม่น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าความเที่ยงในการวิเคราะห์และเกณฑ์การยอมรับได้ของ AOAC ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน จี2, จี1, บี2 และบี1 ภายในวันเดียวกัน (n=5)

สารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความแม่น	RSD	ความแม่น	RSD	ความแม่น	RSD
จี2	96.9	12.6	86.8	3.3	88.9	5.6
จี1	110	6	95.6	7.1	103	8
บี2	97.1	6.2	88.1	7.7	96.3	4.9
บี1	90.0	4.6	96.6	9.5	103	8
AOAC	80 – 110	≤ 15	80 – 110	≤ 11	80 - 110	≤7.3

หมายเหตุ ความเข้มข้นที่วัดได้จากการทดลองแสดงในตาราง ผ-ข.5, ผ-ข.6, ผ-ข.7 และ ผ-ข.8

ตาราง 4.4 ค่าความแม่นเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความเที่ยงในการวิเคราะห์และเกณฑ์การยอมรับได้ของ AOAC ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน จี2, จี1, บี2 และบี1 ต่างวันกัน (n=1)

สารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความแม่น	RSD	ความแม่น	%SD	ความแม่น	RSD
จี2	99.6	11.6	96.1	7.58	94.3	4.6
จี1	113	3	108	9	109	4
บี2	101	5	102	10	104	6
บี1	93.9	4.8	113	9	113	6
AOAC	80 – 110	≤ 15	80 - 110	≤ 11	80 - 110	≤7.3

หมายเหตุ ความเข้มข้นที่วัดได้จากการทดลองแสดงในตาราง ผ-ข.9, ผ-ข.10, ผ-ข.11 และผ-ข.12

4.5 ตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิที่สกัดด้วยเทคนิคแคชเชอร์ (QuEChERS)

จากการทดลองที่ 3.7 นำตัวอย่างข้าวกล้องที่ไม่เติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินและตัวอย่างข้าวกล้องที่เติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (spiked) แล้วผ่านกระบวนการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS ใช้ตัวดูดซับของแข็ง PSA, C-18 และ PSA:C-18 แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการดูดซับสิ่งปนเปื้อนในสารตัวอย่าง ได้ผลการทดลองแสดงในตาราง ผ-ข.13 และเปรียบเทียบร้อยละของการกลับคืนของสารอะฟลาทอกซินดังตาราง 4.15 ซึ่งร้อยละการกลับคืนคำนวณได้จาก

$$\%recovery = \frac{a}{b} x100$$

a คือ ความเข้มข้นละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินที่วัดได้ในตัวอย่างข้าวกล้องที่เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (spiked) µg/g

b คือ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน ที่แน่นอนที่เติมลงไปในตัวอย่างข้าวกล้อง µg/g

เมื่อเปรียบเทียบความใสของสารสกัดจากตัวอย่างข้าวกล้องพบว่าสารสกัดจากตัวอย่างที่ไม่ได้ใช้ตัวดูดซับขุ่นกว่าสารสกัดจากตัวอย่างที่ใช้ตัวดูดซับที่มีสีใสนำความเข้มข้นที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC มาคิดค่าร้อยละของการกลับคืนจากนั้นนำค่าดังกล่าวมาหาค่าเฉลี่ยได้ค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 75.7 – 101.4% คำนวณค่าทางสถิติด้วย ANOVA: Single Factor ช่วงความเชื่อมั่น 95% P-value > 0.05 แสดงว่าร้อยละของการกลับคืนที่ได้จากการใช้ตัวดูดซับของแข็งทั้ง3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและเมื่อพิจารณาเกณฑ์ AOAC ค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (80 – 110% ที่ 1 µg/mL) มี 1 ข้อมูลที่ไม่ได้อยู่ในช่วงดังกล่าวซึ่งเป็นข้อมูลของสารอะฟลาทอกซินจี2 และแนวโน้มของข้อมูลในตัวดูดซับชนิดอื่นเป็นไปในทิศทางเดียวกัน สาเหตุที่ทำให้ข้อมูลมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานอาจเกิดจากสารอะฟลาทอกซินจี2 มีความเป็นขั้วสูงสารออกจากคอลัมน์ในเวลาอันสั้น ตัวทำละลาย acetonitrile อาจจะไม่เหมาะสมกับสารดังกล่าวทำให้ความเข้มข้นที่วัดได้ในการทดลองคลาดเคลื่อนและโครมาโทแกรมของสารสกัดจากตัวอย่างข้าวดังรูป 4.12-4.14 พีกที่ได้เป็นพีกที่มีหาง (tail) ทำให้การคำนวณพื้นที่ใต้กราฟด้วยการอินทิเกรตคลาดเคลื่อนจากค่าที่แท้จริง

ตาราง 4.5 ข้อมูลค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืน, ความเที่ยงของการศึกษาและค่า P-Value ที่คำนวณด้วย Anova: Single factor โดย n=3

อะฟลาทอกซิน	%recovery (RSD)			
	PSA	C-18	PSA:C-18	P-Value
จี2	85.3 (1.3)	82.0 (11)	75.7 (15)	0.562
จี1	97.4 (1.7)	96.7 (11)	87.7 (10)	0.466
บี2	88.1 (3.6)	89.0 (7.7)	83.4 (11)	0.705
บี1	97.5 (2.1)	101 (6)	96.9 (11)	0.805

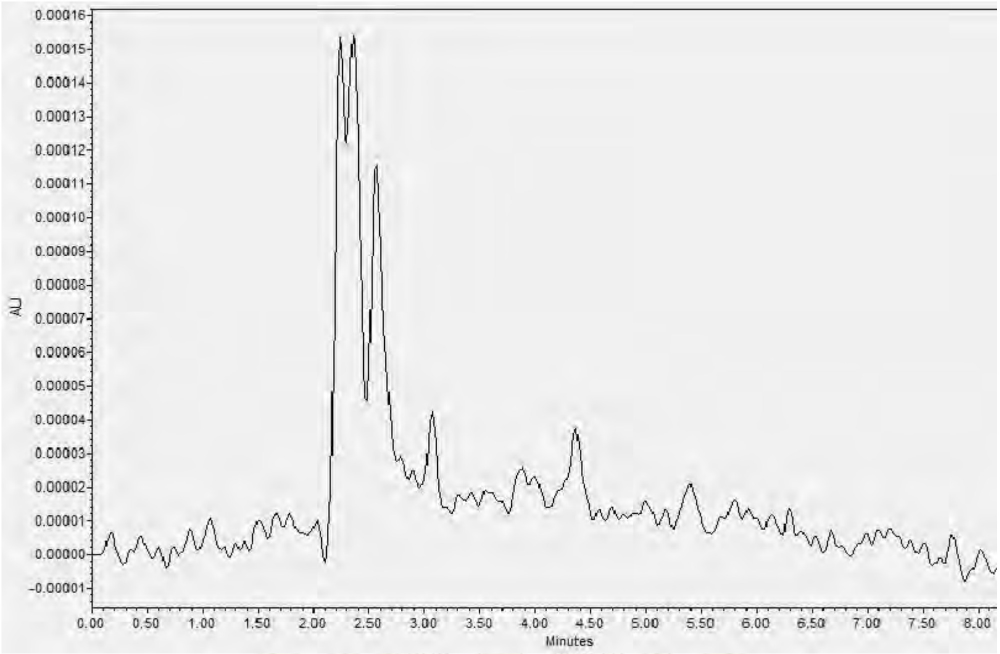
%recovery ที่ยอมรับได้ของ AOAC[15] (ที่ 1 ppm) = 80-110%

RSD ที่ยอมรับได้ของ AOAC [15](ที่ 1 ppm) $\leq$ 11%

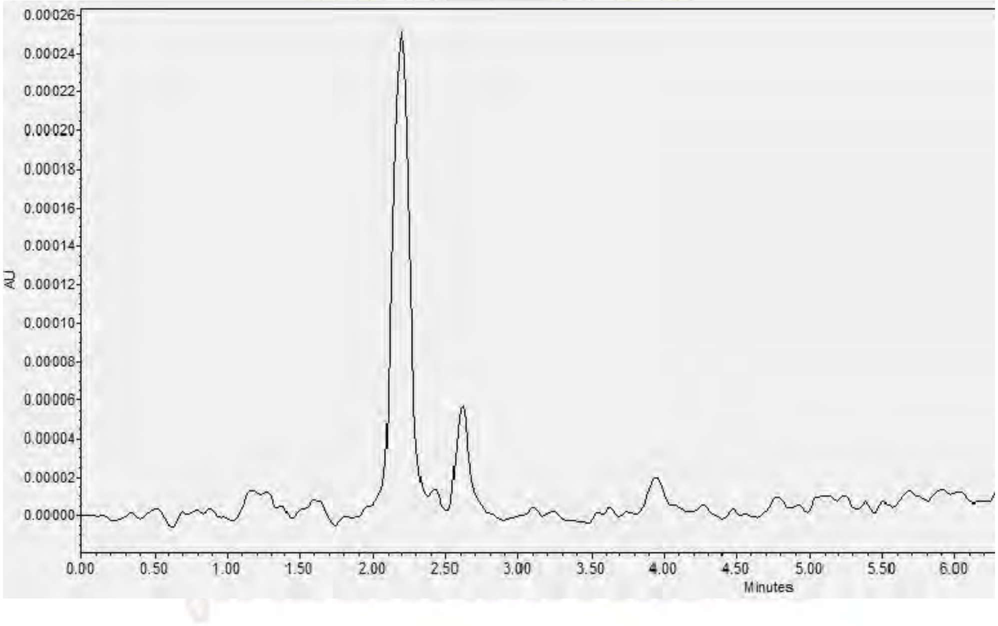
ความเข้มข้นของตัวอย่างข้าวกล้องที่ไม่เติมสารมาตรฐานมีค่าต่ำกว่า LOQ

คำนวณ ANOVA: Single factor แสดงในตาราง ผ-ข.14, ผ-ข.15, ผ-ข.16 และผ-ข.17

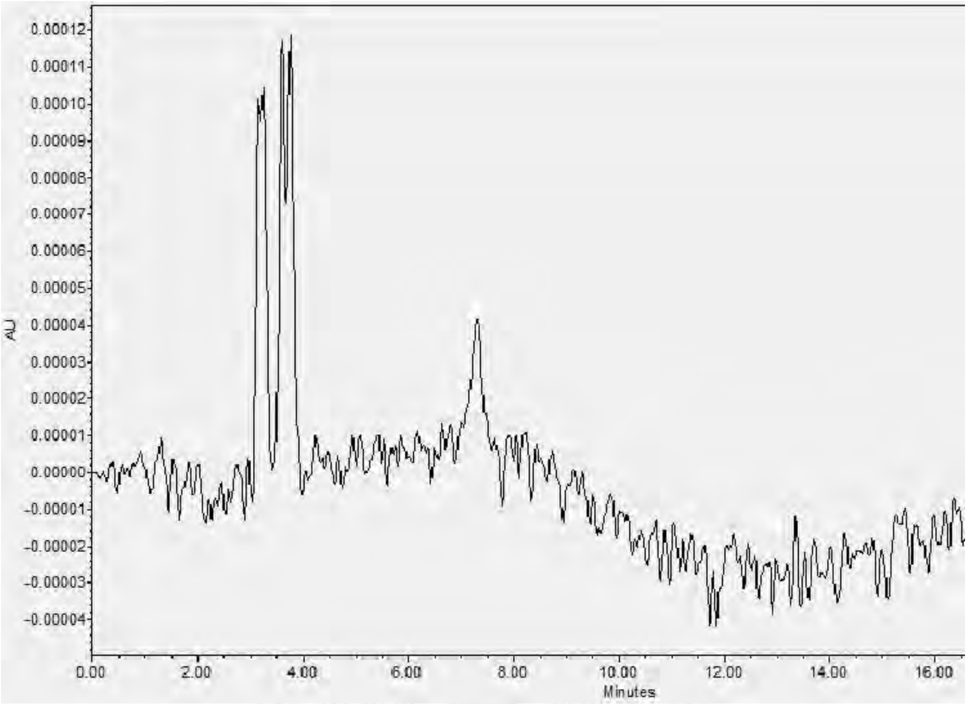
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



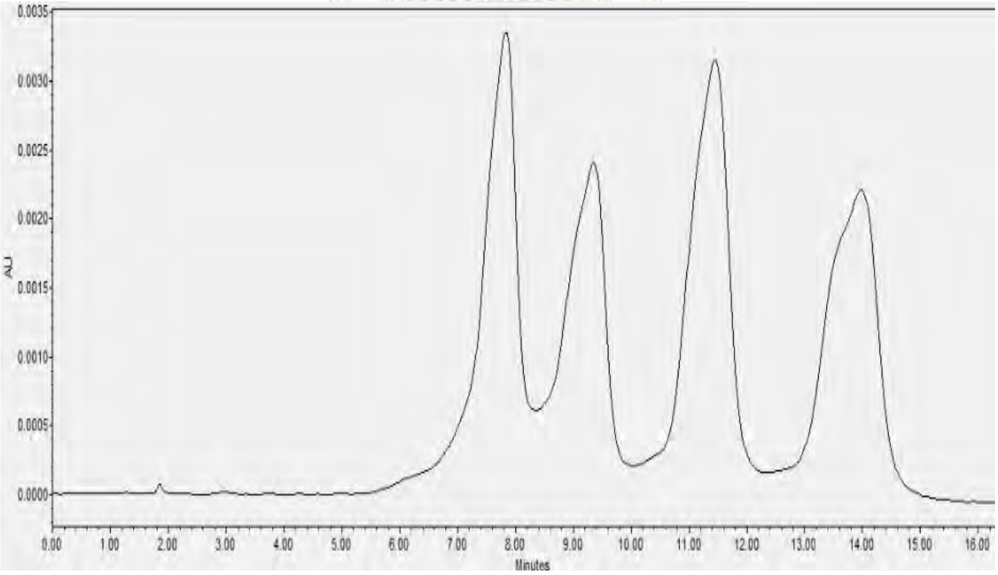
รูป 4.5 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1
ใน mobile phase เป็น acetonitrile 100%



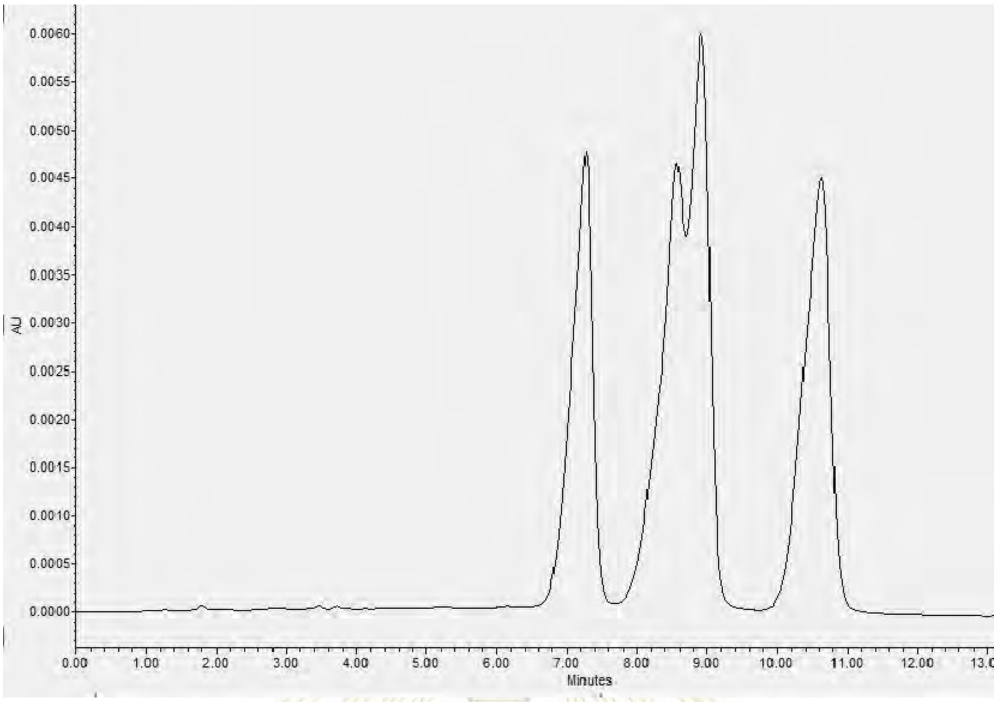
รูป 4.6 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1
ใน mobile phase ที่เป็น methanol 100%



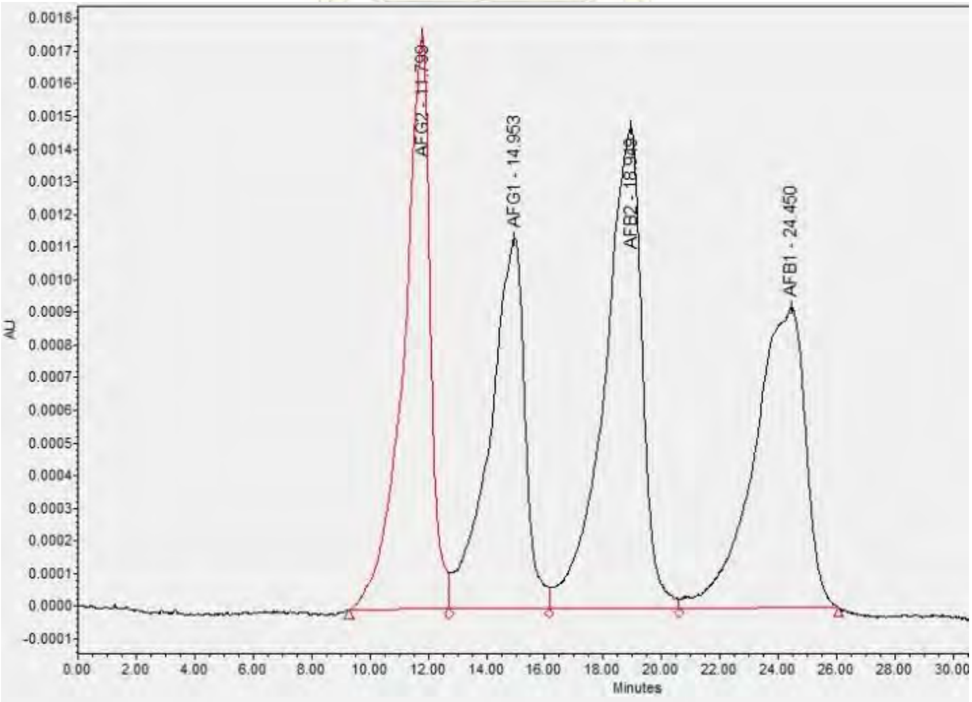
รูป 4.7 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1
ใน mobile phase เป็น methanol:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 70:30



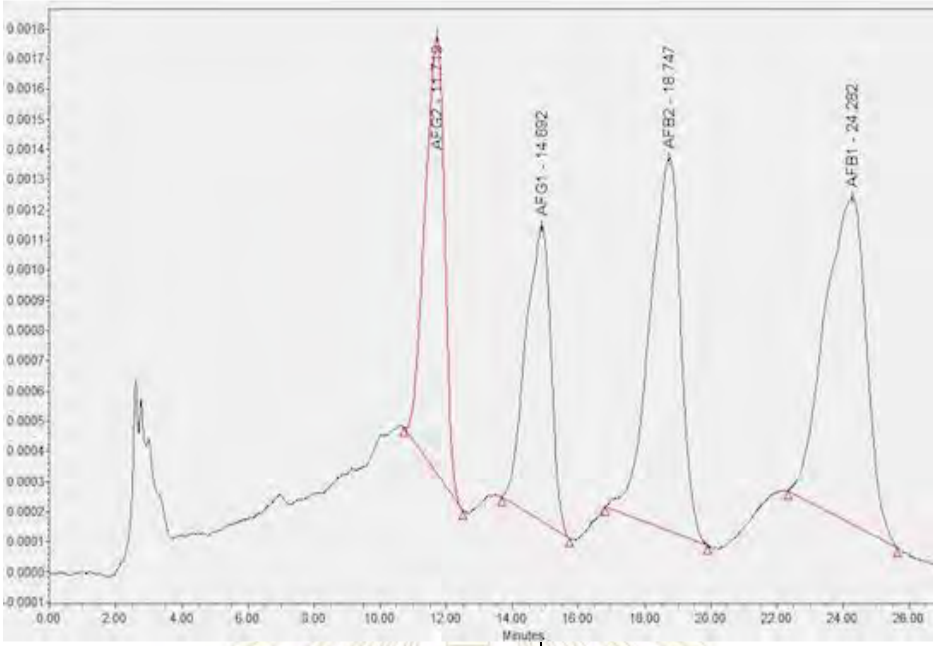
รูป 4.8 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1
ในmobile phase ที่เป็น methanol:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 50:50



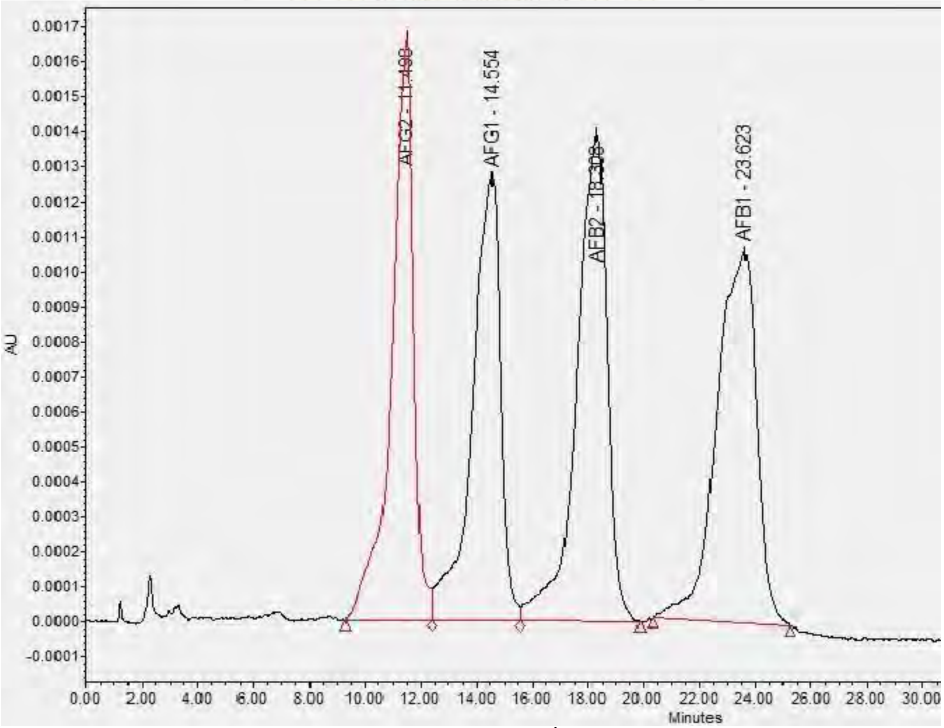
รูป 4.9 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ใน mobile phase เป็น methanol:acetonitrile:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 25:20:55



รูป 4.10 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ใน mobile phaseที่เป็น methanol:น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 45:55

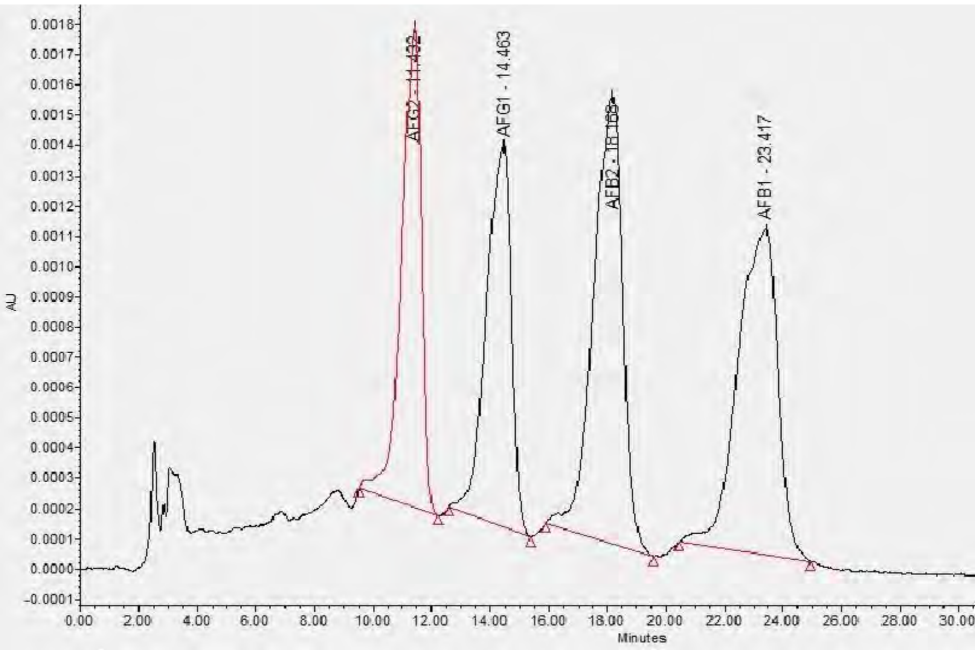


รูป 4.11 โครมาโทแกรมตัวอย่างข้าวกล้องที่สกัดด้วยเทคนิค QuEChERS

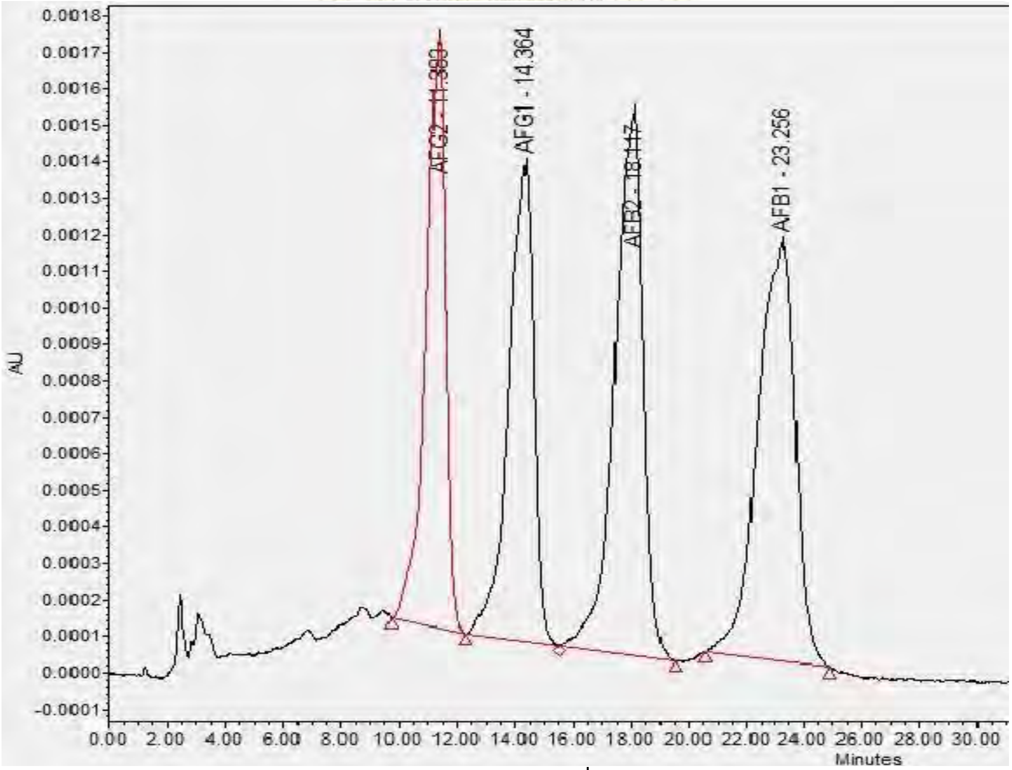


รูป 4.12 โครมาโทแกรมตัวอย่างข้าวกล้องที่สกัดด้วย

เทคนิค QuEChERS เพิ่มตัวดูดซับ PSA

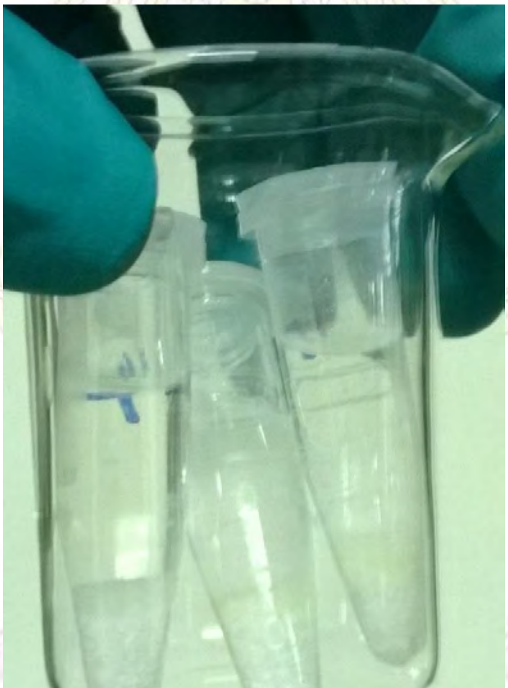


รูป 4.13 โครมาโทแกรมตัวอย่างข้าวกล้องที่สกัดด้วย
เทคนิค QuEChERS เพิ่มตัวดูดซับ C-18



รูป 4.14 โครมาโทแกรมตัวอย่างข้าวกล้องที่สกัดด้วย
เทคนิค QuEChERS เพิ่มตัวดูดซับ PSAและ C-18

รูป 4.15 ตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS



รูป 4.16 ตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS

หลอดทดลองซ้ายมือเติมตัวดูดซับ C-18, กลางเติมตัวดูดซับ PSA และ

ขวามือเติมตัวดูดซับ PSA และ C-18

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินและพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเทคนิค QuEChERS และกรองด้วยตัวดูดซับของแข็งเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ methanol: น้ำในอัตราส่วน 45 : 55 อัตราไหลของสารอยู่ที่ 0.7 mL/min เมื่อพิจารณากราฟสอบเทียบสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินด้วย HPLC พบว่าสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1, บี2, จี1 และจี2 มีการตอบสนองเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น LOQ-5 µg/mL และค่า correlation coefficient (R^2) มากกว่า 0.995

ตรวจสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการและเครื่องมือโดยเปรียบเทียบผลการคำนวณร้อยละของการกลับคืนและความเที่ยงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินในวันเดียวกันและต่างวันกันกับมาตรฐาน AOAC พบว่าข้อมูลส่วนใหญ่ (66.67%) อยู่ในเกณฑ์

ในการสกัดอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค QuEChERS และกรองด้วยตัวดูดซับของแข็ง (dSPE) ชนิด PSA, C-18 และ PSA:C-18 ได้ร้อยละของผลได้แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value > 0.05) และร้อยละ 91.7 ของความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ตัวดูดซับทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน

แต่ในความเป็นจริงควรใช้ตัวดูดซับชนิด PSA:C-18 เพราะในสารสกัดจากตัวอย่างข้าวกล้องมีกรดไขมันและสารมีขั้วอื่นๆปนอยู่ การที่ใช้ตัวดูดซับทั้งสองชนิดพร้อมกันในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจะทำให้การตรวจวัดสารตัวอย่างด้วย HPLC มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

[1] Richard J., Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *Science Direct* 2007, 119, 3-10.

[2] Bankole, S.A.; Ogunsanwo, B.M.; Osho, A.; Adewuyi, A., Fungal contamination and alfratoxin B1 of 'egusi' melon seeds in Nigeria. *Food Control* 2006, 17, 814-818.

[3] Kleigrewe, K.; Sohnel, A.; Humpf, H., A new high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method based on dispersive solid phase extraction for the determination of the mycotoxinfusarin c in corn ears and processed corn samples. *Journal of agricultural and food chemistry* 2011, 59, 10470-10476.

[4] Rubert, J.; Soler, C.; Jordi, M., Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC-MS/MS. *Talanta* 2011, 85, 206-215.

[5] Antonia, F.; Roberto, G.; María, P.; José, V., Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERs-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole. *Journal of Chromatography A* 2011, 1218, 4349-4356.

[6] Yelko, C.; Houda, B.; Guillermina, F.; Jordi, M., Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction procedure and gas chromatography-tendem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2012, 1270, 28-40.

[7] Liao, C.; Wong, J.W.; Zhang, K.; Hayward, D.G.; Lee, N.S., Multi-mycotoxin analysis of finished grain and nut products using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 2013,61, 4771-4782.

[8] Arroyo-Manzanares, N.; Garcia-Campana, A. M.; Gámiz-Gracia, L., Multiclass mycotoxins analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on

QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* 2013, 1282(1) , 11-19.

[9] คู่มือการใช้งาน HPLC Waters 1525 จัดทำโดยบริษัทสิทธิพรแอสโซซิเอสจำกัด

[10] หลักการทำงานของเครื่อง HPLC สืบค้นเมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2557http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/chemical-analysis-instrument-menu/item/126-high-performance-liquid-chromatography-hplc.html

[11]ประเภทปั๊ม HPLC สืบค้นเมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2557 http://home.kku.ac.th/chuare/12/HPLC.pdf

[12] Carrasco Y.; Berrada H.; Font G., Mañes J., Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-base extraction procedure and gas chromatography-tandam mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2012, 1270, 28-40.

[13] Blesa J.; Sospedra I.; Mañes J., Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A-and B-trichothecenes in wheat flour. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 1473-1440

[14] Ferreira I.; Fernandes J.O.; Cunha S.C., Optimixation and validation of a method in a QuEChERS procedure and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn. *Food Control* 2012, 27, 188-193.

[15] Taverniers I.; Loose M.; Bockstaele E., Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry* 2004, 23, 535-551.

[16] เอกสารประกอบการเรียนวิชาเคมีวิเคราะห์ 2 (2302244) เรื่อง Chromatographic Separation สอนโดย อ. พุทธรักษา วรานุศุภากุล

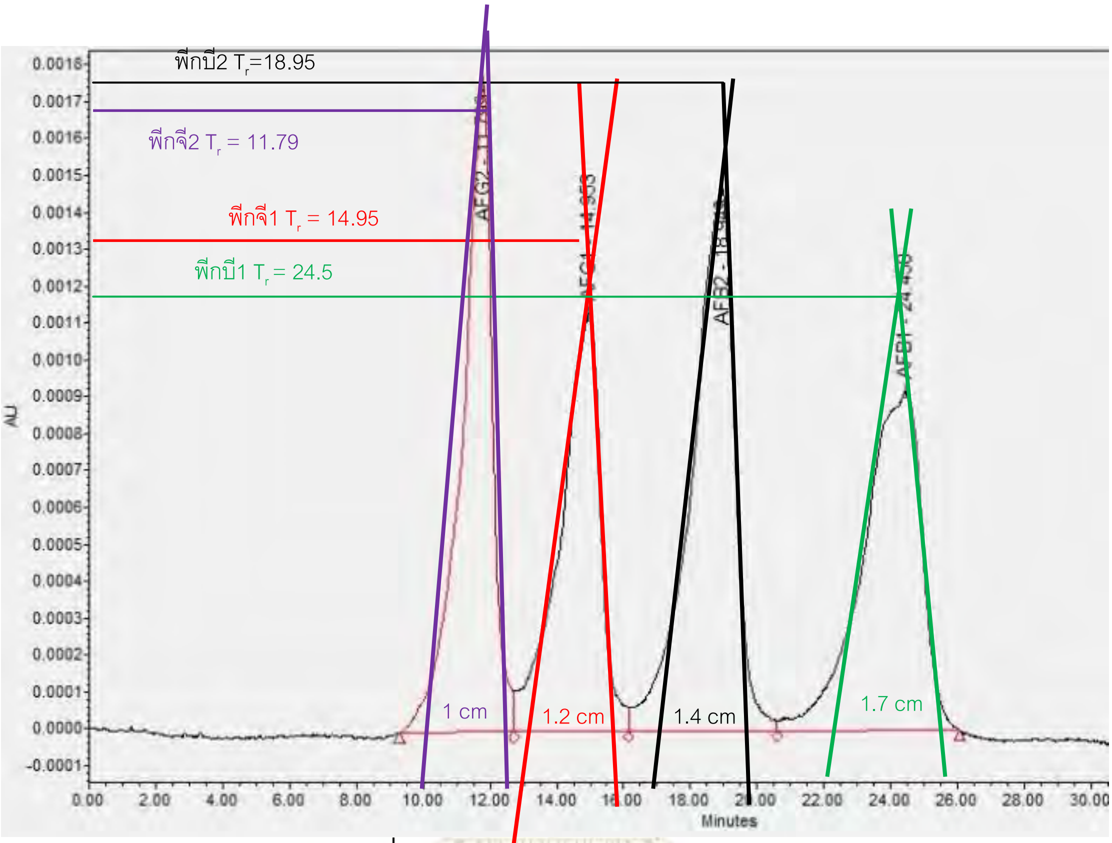
[17] เทคนิค QuEChERS สืบค้นเมื่อวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2557 http://quechers.cvua-stuttgart.de/

ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก การคำนวณ

ภาคผนวก ก.1 การคำนวณค่าการแยกของพีก



รูป ก.1 แสดงการวัดพีกเพื่อคำนวณค่าการแยกโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2 และบี1 ตามลำดับ

ตัวอย่างการคำนวณค่าการแยกพีก AFG2:พีก AFG1

$$Rs = \frac{2[t_2 - t_1]}{W_1 + W_2}$$ [15]

แทนค่า $$Rs_{1:2} = \frac{2(14.95-11.79)}{1.2+1} = 2.87$$

ดังนั้น Rs = 2.9

ทำเช่นเดียวกันกับพีก AFG2:พีก AFB2 และ พีก AFB2:พีก AFB1

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข ตารางแสดงค่าที่วัดได้จากการทดลอง

ผลการทดลองตอนที่ 3.6 ตาราง ข.1 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีก(Ave. Peak area),ความสูงเฉลี่ยของพีค (Ave. Height)และค่าเวลารีเทนชันของอะฟลาทอกซินจี2 (Ave. T_r) โดย n=3

ความเข้มข้น (µg/mL)	Ave. Peak area	Ave. Height	Ave. Tr (min)
5	565338	11269	11.9
2	222147	3460.33	11.9
1	108271	2092.3	11.7
0.5	55633.3	930	11.7
0.09	5416	120	11.7

ตาราง ข.2 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค, ความสูงเฉลี่ยของพีคและค่าเวลารีเทนชันเฉลี่ยของอะฟลาทอกซินจี1 (n=3)

ความเข้มข้น (µg/mL)	Ave. Peak area	Ave. Height	Ave. Tr (min)
5	481241	6367	15.2
2	187053	1949	15.2
1	88347	1104	14.9
0.5	45045	614	14.9
0.09	6114	113	14.9

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข.3 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค, ความสูงเฉลี่ยของพีคและค่าเวลารีเทนชันเฉลี่ย ของอะฟลาทอกซินบี2 (n=3)

ความเข้มข้น (µg/mL)	Ave. Peak area	Ave. Height	Ave. T_r (min)
5	670381	8422	19.2
2	263007	2630	19.2
1	123860	1442	18.9
0.5	64103.3	789.3	18.8
0.11	8941	200	18.8

ตาราง ข.4 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค, ความสูงเฉลี่ยของพีค และค่าเวลารีเทนชันเฉลี่ยของอะฟลาทอกซินบี1 (n=3)

ความเข้มข้น (µg/mL)	Ave. Peak area	Ave. Height	Ave. T_r (min)
5	559014	3807	25.2
2	229727	1536	23.8
1	108141	917.7	24.4
0.5	50806.3	527.7	24.3
0.17	11827	160.3	24.2

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการตรวจวัดความแม่นและความเที่ยงของ HPLC โดยตรวจวัดภายในวันเดียวกัน (Intraday)

ตาราง ข.5 ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้, ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความแม่นและความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1 (n=5)

ครั้งที่	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น
1	0.159	93.5	0.968	96.8	5.164	103
2	0.156	91.8	1.075	108	5.027	100
3	0.147	86.5	0.943	94.3	5.596	112
4	0.159	93.5	0.830	83	4.537	90.7
5	0.144	84.7	1.015	102	5.441	109
ค่าเฉลี่ย	0.153	90.0	0.966	96.6	5.153	103
SD	0.007	4.1	0.091	9.1	0.41	8.2
RSD	4.6		9.5		8	

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข.6 ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้, ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความแม่น และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี2 (n=5)

ครั้งที่	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น
1	0.111	101	0.839	83.9	4.765	95.3
2	0.111	101	0.986	98.6	4.93	98.6
3	0.111	101	0.904	90.4	5.01	100
4	0.105	95.5	0.811	81.1	4.426	88.5
5	0.096	87.3	0.869	86.9	4.929	98.6
ค่าเฉลี่ย	0.107	97.1	0.882	88.1	4.81	96.3
SD	0.01	5.9	0.07	6.8	0.23	4.7
RSD	6.2		7.7		4.9	

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข.7 ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้, ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความแม่น และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี1 (n=5)

ครั้งที่	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น
1	0.097	108	0.961	96.1	5.25	105
2	0.108	120	1.01	101	5.16	103
3	0.098	109	0.991	99.1	5.38	108
4	0.099	110	0.840	84.0	4.45	89.1
5	0.092	102	0.978	97.8	5.38	108
ค่าเฉลี่ย	0.099	110	0.956	95.6	5.13	103
SD	0.006	6.5	0.068	6.8	0.39	7.7
RSD	6		7.1		8	

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข.8 ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้, ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความแม่น และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2 (n=5)

ครั้งที่	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น
1	0.087	96.7	0.868	86.8	4.51	90.1
2	0.082	91.1	0.858	85.8	4.44	88.7
3	0.083	92.2	0.901	90.1	4.62	92.5
4	0.078	86.7	0.827	82.7	4.02	80.5
5	0.106	118	0.888	88.8	4.63	92.6
ค่าเฉลี่ย	0.087	96.9	0.868	86.8	4.44	88.9
SD	0.011	12.2	0.029	2.9	0.25	4.9
RSD	12.6		3.3		5.6	

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการตรวจวัดความแม่นและความเที่ยงของ HPLC โดยตรวจวัดต่างวันกัน (Interday)

ตาราง ข.9 ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้, ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความแม่น และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1 (n=1)

วันที่	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น
1	0.153	90.0	0.966	96.6	5.15	103
2	0.166	97.6	1.20	120	5.93	118
3	0.169	99.4	1.12	112	5.81	116
4	0.152	89.4	1.18	118	5.97	119
5	0.158	92.9	1.17	117	5.49	110
ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น	0.160	93.9	1.13	113	5.67	113
SD	0.008	4.5	0.1	10	0.35	7
RSD	4.8		9		6	

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข.10 ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้, ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความแม่น และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี2 (n=1)

วันที่	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น (Accuracy)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น (Accuracy)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น (Accuracy)
1	0.110	97.1	0.882	88.2	4.81	96.3
2	0.120	107	1.04	104	5.28	106
3	0.117	106	1.08	108	5.48	110
4	0.107	97.3	1.14	114	5.51	110
5	0.106	96.4	0.97	97.2	4.87	97.5
ค่าเฉลี่ย	0.111	101	1.02	102	5.19	104
SD	0.006	6	0.1	10	0.33	7
RSD	5		10		6	

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข.11 ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้, ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความแม่น และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี1 (n=1)

วันที่	LOQ		1.0 µg/mL		5.0 µg/mL	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/mL)	ความแม่น
1	0.0988	110	0.956	95.6	5.13	103
2	0.106	118	1.14	114	5.60	112
3	0.103	114	1.15	115	5.67	113
4	0.100	111	1.18	118	5.55	111
5	0.099	110	0.990	99.4	5.27	106
ค่าเฉลี่ย	0.101	113	1.08	108	5.44	109
SD	0.003	3.4	0.10	10.2	0.23	4.6
RSD	3		9		4	

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข.12 ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้, ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความแม่น และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2 (n=1)

วันที่	LOQ		1.0 μg/mL		5.0 μg/mL	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (μg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (μg/mL)	ความแม่น	ความเข้มข้นที่วัดได้ (μg/mL)	ความแม่น
1	0.087	96.9	0.868	86.8	4.44	88.7
2	0.085	94.4	0.984	98.4	4.90	98.0
3	0.083	92.2	1.01	101	4.81	96.2
4	0.085	94.4	1.04	104	4.89	97.9
5	0.108	120	0.901	90.1	4.52	90.4
ค่าเฉลี่ย	0.09	99.6	0.960	96.1	4.71	94.3
SD	0.01	11.5	0.073	7.3	0.22	4.4
RSD	11.6		7.6		4.6	

*วันที่ 1 ของระหว่างวันเป็นค่าเฉลี่ยของภายในวันของวันแรก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองตอนที่ 3.7

ตาราง ข.13 ความเข้มข้นที่วัดได้เมื่อเติมตัวดูดซับชนิดของแข็งหลังจากขั้นตอนการสกัดสารอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค QuEChERS (n=3)

อะฟลาทอกซิน	ความเข้มข้นที่วัดได้ เมื่อเติม PSA (μg/g)	ความเข้มข้นที่วัดได้ เมื่อเติม C-18 (μg/g)	ความเข้มข้นที่วัดได้ เมื่อเติม PSA & C-18 (μg/g)
จี2	0.852, 0.867, 0.84	0.692, 0.857, 0.912	0.703, 0.652, 0.918
จี1	0.978, 0.992, 0.951	0.828, 0.99, 1.084	0.857, 0.777, 0.999
บี2	0.838, 0.915, 0.889	0.813, 0.878, 0.979	0.809, 0.733, 0.96
บี1	0.979, 0.949, 0.998	0.949, 0.996, 1.097	0.965, 0.839, 1.103

หมายเหตุ ในขั้นตอนสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS เติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินจี2, จี1, บี2, บี1 (spiked) ความเข้มข้น 1.0 μg/g

ตาราง ข.14 คำนวณด้วย ANOVA: Single Factor ของสารสกัดอะฟลาทอกซินจี2ด้วยเทคนิค QuEChERS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
PSA	3	2.559	0.853	0.000183
C-18	3	2.461	0.820333	0.013108
PSA & C-18	3	2.273	0.757667	0.01993

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	0.014083	2	0.007041	0.63585	0.561754	5.143253
Within Groups	0.066443	6	0.011074			
Total	0.080526	8				

ตาราง ข.15 คำนวณด้วย ANOVA: Single Factor ของสารสกัดอะฟลาทอกซินจี1ด้วยเทคนิค QuEChERS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
PSA	3	2.921	0.973667	0.000434
C-18	3	2.902	0.967333	0.016769
PSA + C-18	3	2.633	0.877667	0.012641

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	0.017296	2	0.008648	0.869303	0.466086	5.143253
Within Groups	0.05969	6	0.009948			
Total	0.076986	8				

ตาราง ข.16 คำนวณด้วย ANOVA: Single Factor ของสารสกัดอะฟลาทอกซินบี2ด้วยเทคนิค QuEChERS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
PSA	3	2.642	0.880667	0.001534
C-18	3	2.67	0.89	0.006997
PSA + C-18	3	2.502	0.834	0.013351

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	0.005401	2	0.0027	0.370223	0.705323	5.143253
Within Groups	0.043765	6	0.007294			
Total	0.049166	8				

ตาราง ข.17 คำนวณด้วย ANOVA: Single Factor ของสารสกัดอะฟลาทอกซินบี1ด้วยเทคนิค QuEChERS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
PSA	3	2.926	0.975333	0.00061
C-18	3	3.042	1.014	0.005719
PSA + C-18	3	2.907	0.969	0.017436

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	0.00356	2	0.00178	0.224711	0.805177	5.143253
Within Groups	0.047531	6	0.007922			
Total	0.051091	8				

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นาย ณัฐพงศ์ นภาพิพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2534ที่จังหวัดกรุงเทพมหานครสำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายสามัญแผนก วิทย์-คณิตจากโรงเรียนศรีอยุธยาในพระอุปถัมภ์ฯ กรุงเทพมหานครเมื่อปีการศึกษา 2552 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี 195 ถ.ประชาสงเคราะห์ 2 แขวงดินแดง เขตดินแดง จังหวัดกรุงเทพมหานคร,10400

นางสาว พิมพ์ขวัญ ใจวงค์ เกิดเมื่อวันที่ 7 เดือนเมษายน พ.ศ. 2533 ที่จังหวัดลำปาง สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายสามัญแผนกวิทย์-คณิตโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา กรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2552 เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อปีการศึกษา 2553 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 14/4 สายลมอพาร์ตเม้น ซอยพหลโยธินซอย 8 ถ. พหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย