การหาปริมาณออกซาเลตในชาพร้อมดื่มด้วยเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

Determination of oxalate ion in instant tea using capillary electrophoresis

โดย

นางสาวสวรรยา โอชวิช

นางสาวธนาภา ชัยสถิตย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

เรื่อง การหาปริมาณออกซาเลตในชาพร้อมดื่มด้วยเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

โดย นางสาวสวรรยา โอชวิช และ นางสาวธนาภา ชัยสถิตย์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศุภากุล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คเณศ วงษ์ระวี)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วัน...22... เดือน...พ.ค..... พ.ศ. ..58...

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การหาปริมาณออกซาเลตในชาพร้อมดื่มด้วยเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวสวรรยา โอชวิช เลขประจำตัว 5433146223

นางสาวธนาภา ชัยสถิตย์ เลขประจำตัว 5433098823

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ในตัวอย่างชาพร้อมดื่ม โดยการวิเคราะห์นี้ใช้คะพิลลารีที่เป็นซิลิกาปราศจากการเคลือบภายในที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 50 µm i.d. × 60.2 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า -20 kV ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ประกอบด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 30 mM ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 mM และเตตระเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 mM ที่พีเอช 7.0 และตรวจวัดโดยตรงด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 195 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 7 นาที มีค่าความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 10 - 500 mg/L เป็น 0.9994, 0.9996, 0.9997 และ 0.9998 สำหรับออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ตามลำดับ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยการทดสอบความแม่น พบว่ามีค่าร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต เป็น 70.23%, 120.03%, 91.60% และ 70.75% ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง เพื่อหาความเที่ยงในวันเดียวกัน %RSD ของไมเกรชั่นไทม์ของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต มีค่าน้อยกว่า 1% ส่วนพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) มี %RSD ของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่มีความเข้มข้นสูง (90 mg/L) จะมีค่าต่ำกว่า 5% แต่ที่ความเข้มข้นต่ำ (30 mg/L) มี %RSD อยู่ในช่วง 2.30-7.53% แต่พบว่าแอสคอร์เบตมี %RSD เท่ากับ 15.58-18.22% สำหรับความเที่ยงระหว่างวันโดยทำการวิเคราะห์ติดกัน 3 วัน พบว่า %RSD ของไมเกรชั่นไทม์ของสารมาตรฐานทุกชนิดมีค่าน้อยกว่า 5% และพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.59-8.11% ส่วนแอสคอร์เบตมีค่า %RSD 13.58-18.22% ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต เท่ากับ 3, 5, 10 และ 15 mg/L และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เท่ากับ 10, 8, 25 และ 20 mg/L ตามลำดับ จากการประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการหาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต พบว่าในชาพร้อมดื่มตัวอย่างชนิดต่าง ๆ มีปริมาณออกซาเลต ซิเทรต และแอสคอร์เบต อยู่ในช่วง 6.70-41.40 mg/L, 4.53-1,283.78 mg/L และ 23.37-463.82 mg/L ตามลำดับ ส่วนมาเลตมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้

คำสำคัญ: คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส, ออกซาเลต, ชาพร้อมดื่ม

Title Determination of oxalate ion in instant tea using capillary electrophoresis

Student Names Ms.Sawanya Ojavij ID 5433146223

Ms.Thanapa Chaisatit ID 5433098823

Advisor Dr.Monpichar Srisa-Art

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2014

Abstract

In this work, capillary electrophoresis (CE) was used for quantitative determination of oxalate, citrate, malate and ascorbate in instant tea samples. An uncoated fused silica capillary having 50 μm i.d. × 60.2 cm (50 cm to detector) under an applied voltage of -20 kV and a temperature of 25 ℃ was used with a background electrolyte (BGE), containing 30 mM borate buffer mixed with 40 mM phosphate buffer and 0.5 mM tetradecyltrimethyl ammoniumbromide (TTAB) at pH 7.0 and UV-Vis detection at a wavelength of 195 nm. Results showed analysis of oxalate, citrate, malate and ascorbate was achieved within 7 minutes and linear relationships (R^2) for the concentration range of 10–500 mg/L were 0.9994, 0.9996, 0.9997 and 0.9998 for oxalate, citrate, malate and ascorbate, respectively. From method validation, accuracy, %recovery were 70.23%, 120.03%, 91.60% and 70.75% for oxalate, citrate, malate and ascorbate, respectively. Intraday precision (repeated 10 times) was determined and found that %RSDs of migration time for oxalate, citrate, malate and ascorbate were less than 1% and %RSDs of corrected peak area of oxalate, citrate, malate and ascorbate at high concentration (90 mg/L) were less than 5% while at low concentration (30 mg/L) %RSDs was found in the range of 2.30-7.53% but %RSD of ascorbate was 15.58-18.22%. For interday precision (3 days), it was found that %RSDs of migration time were less than 5% and %RSDs of corrected peak area of oxalate, citrate and malate were ranged from 1.59 to 8.11%, while %RSD of ascorbate was in the range from 13.58-18.22%. Limits of detection for oxalate, citrate, malate and ascorbate were 3, 5, 10 and 15 mg/L and limits of quantitative were 10, 8, 25 and 20 mg/L, respectively. The proposed method was successfully applied for quantitively determination of oxalate, citrate, malate and ascorbate in instant tea samples. It was found that the amounts of oxalate, citrate and ascorbate were found to be in the ranges of 6.70-41.40 mg/L, 4.53-1,283.78 mg/L and 23.37-463.82 mg/L, respectively. However malate was not detected in the samples because it was present in a small amount.

Keywords: Capillary Electrophoresis, Oxalate, Instant tea

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ประสบผลสำเร็จได้เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านมาโดยตลอด และให้คำปรึกษา คำแนะนำ รวมทั้งความรู้เพื่อเป็นแนวทางในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณอาจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศุภากุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คเณศ วงษ์ระวี ที่เป็นประธานและกรรมการในการสอบงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณนางสาวขนิษฐา คนหาญ นิสิตปริญญาโท, นางสาวกนกพร จินดาพรรณ นิสิตปริญญาเอก และนายอัคพล เสืองาม นิสิตปริญญาโท ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ เทคนิคต่าง ๆ การดูแลรักษาเครื่องมือ และความรู้ในด้านการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานการวิจัยนี้

ขอขอบคุณคุณพ่อคุณแม่และครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือ ผู้วิจัยขอขอบคุณในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญรูป	ญ
สารบัญตาราง	ฐ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา มูลเหตุจูงใจและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎี	5
2.1 คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary electrophoresis, CE)	5
2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE	5
2.3 การทำงานของเครื่อง CE	7
2.4 ประเภทของเทคนิค CE	8
2.5 คะพิลลารีโซนอิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary Zone Electrophoresis, CZE)	9
2.5.1 ค่าการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (Electrophoretic mobility, μ)	9
2.5.2 อิเล็กโทรออสโมซิส (Electroosmosis)	11

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.2.1 การเคลื่อนที่ของสารภายใต้ EOF ปกติ (normal EOF) 14

2.5.2.2 การกลับทิศการเคลื่อนที่ของ EOF (Reversed EOF) 16

2.5.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อ EOF 18

2.5.3 ไมเกรชันไทม์ (migration time) และอิเล็กโทรเฟอโรแกรม (electropherogram) 19

2.5.4 Joule heating 20

2.5.5 การแพร่กระจายของพีคใน CE (Peak dispersion in CE) 21

2.5.6 ค่าการแยกสาร (Resolution, R_s) 22

2.6 คุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE (Qualitative and quantitative analysis in CE) 23

บทที่ 3 การทดลอง 24

3.1 เครื่องมือ 24

3.2 สารเคมี 24

3.3 การเตรียมสารละลาย 25

3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส เพื่อใช้หาปริมาณ ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต 25

3.5 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ 29

3.5.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ 29

3.5.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) 30

3.5.3 ความเที่ยง (Precision) 31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.4 ความแม่น (Accuracy)	31
3.6 วิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในตัวอย่างชาพร้อมดื่ม โดยวิธี CE ที่พัฒนาขึ้น	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล	34
4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตด้วยเทคนิค CE	36
4.1.1 ผลของชนิดและพีเอชของบัฟเฟอร์	36
4.1.1.1 บอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer)	36
4.1.1.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)	38
4.1.1.3 บัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตและฟอสเฟต	39
4.1.2 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟต	42
4.1.3 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้า	44
4.1.4 ผลของการเติมตัวทำละลายอินทรีย์	46
4.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)	48
4.2.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (Limit of detection, LOD and limit of Quantitation, LOQ)	48
4.2.2 กราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve)	49
4.2.3 ความเที่ยง (Precision)	50
4.2.4 ความแม่น (Accuracy)	54
4.3 การตรวจวัดสารในตัวอย่าง	55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	59

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	62
ประวัติผู้วิจัย	64

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูป **หน้า**

2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE 5

2.2 Double layer ที่ผนังคะพิลลารี 12

2.3 การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (EOF) ในคะพิลลารี 13

2.4 Flat Flow Profile และพีคของสารใน CE และ HPLC 14

2.5 พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้อิทธิพลของ EOF ปกติ 15

2.6 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทแคตไอออนต่อทิศทางการไหลของ EOF และลำดับการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ reversed EOF 17

2.7 ตัวอย่างอิเล็กโทรเฟอโรแกรม 20

2.8 ลักษณะของพีคแบบ Gaussian 21

4.1 โครงสร้างของสารเมื่อแตกตัวเป็นประจุลบ 35

4.2 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น (ก) 20 (ข) 60 (ค) 80 และ (ง) 100 mM 37

4.3 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น (ก) 20 และ (ข) 60 mM 38

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป **หน้า**

4.4 (A) อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟตต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตความเข้มข้น 20 mM กับฟอสเฟตที่ปรับความเข้มข้นเป็น (ก) 20 (ข) 40 (ค) 60 (ง) 80 และ (จ) 100 mM 40

4.4 (B) อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟต ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตเข้มข้น 30 mM กับฟอสเฟตที่ปรับความเข้มข้นเป็น (ก) 20 (ข) 40 (ค) 60 (ง) 80 และ (จ) 100 mM 41

4.5 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ผสมของบอเรตความเข้มข้น 30 mM และฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm โดยปรับพีเอชของบัฟเฟอร์ผสมเป็น (ก) pH 6.0 และ (ข) pH 7.0 (ค) pH 8.0 (ง) pH 9.0 และ (จ) pH 10.0 43

4.6 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm โดยปรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น (ก) -15 kV (ข) -20 kV และ (ค) -25 kV 45

4.7 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm โดยเติมเมทานอลและปรับความเข้มข้นเป็น (ก) ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ (ข) 5% (ค) 10% (ง) 15% และ (จ) 20% 46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป	หน้า
4.8 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตความเข้มข้น 30 mM และฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM ปรับ pH ของบัฟเฟอร์ผสมเป็น 7 และใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าในการแยกสารเท่ากับ -20 kV	47
4.9 กราฟเทียบมาตรฐานของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในสารตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค CE ภาวะที่ใช้คือ สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ประกอยด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 30 mM ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้ม 40 mM และเตตระเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 mM ที่พีเอช 7ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า -20 kV ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	49
4.10 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ที่มีอยู่ในชาพร้อมดื่มตัวอย่างโดย (ก) ชา Manobu (ข) ชา Pokka (ค) ชา Tea Plus พีก 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีก 3 คือ มาเลต และพีก 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับสภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในรูป 4.9	56
4.11 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ที่มีอยู่ในชาพร้อมดื่มตัวอย่างโดย (ก) คือชา Ichiton (ข) คือชา Tesco (ค) คือชา Puriku พีก 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีก 3 คือ มาเลต และพีก 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับสภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในรูป 4.9	57
4.12 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ที่มีอยู่ในชาพร้อมดื่มตัวอย่างโดย (ก) คือชา Unift (ข) คือชา Fuji (ค) คือชา Lipton พีก 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีก 3 คือ มาเลต และพีก 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับสภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในรูป 4.9	58

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

3.1 ปริมาตรและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ 27

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจาก stock solution ความเข้มข้น 1000 ppm 30

3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจาก stock solution ความเข้มข้น 2000 ppm 30

3.4 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเพื่อหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ 31

4.1 โครงสร้างของสารเมื่อแตกตัวเป็นประจุลบ 35

4.2 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ 48

4.3 สมการเชิงเส้นตรงของกราฟสอบเทียบของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต 50

4.4 ความเที่ยงของไมเกรชั่นไทม์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐาน ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (จำนวนการวิเคราะห์ n = 10) 51

4.5 ความเที่ยงของไมเกรชั่นไทม์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐาน ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการวิเคราะห์ติดกัน 3 วัน (n = 3) 53

4.6 ความแม่นของการวิเคราะห์สารมารฐานที่เติมลงในชาพร้อมดื่มตัวอย่าง (วิเคราะห์ซ้ำ n = 10) 54

4.7 ความเข้มข้นของชาพร้อมดื่มชนิดต่าง ๆ 55

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา มูลเหตุจูงใจและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชาเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันมีการผลิตชาในรูปแบบของเครื่องดื่มสำเร็จรูปกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสะดวกต่อการบริโภค จึงทำให้การบริโภคชาพร้อมดื่มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จากการศึกษาของ Onakpoya และคณะ (1) พบว่าชาเขียวสามารถลดความดันโลหิต ลดระดับไขมันที่ความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein cholesterol) ในเลือดรวมทั้งสามารถป้องกันโรคหลอดเลือดแข็งตัวได้ เนื่องจากในใบชามีสารแคทิชิน (catechin) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระเพื่อช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (2) และในชายังมีสารอินูลิน (inulin) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่จัดเป็นเส้นใยอาหารประเภทละลายได้ในน้ำ แต่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ในระบบทางเดินอาหาร จึงมีผลช่วยลดการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่ในเลือด สารอินูลินจะถูกย่อยได้ด้วยแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ ดังนั้นชาจึงมีสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก (3) อย่างไรก็ตามการบริโภคชาในปริมาณที่สูงเกินอาจส่งผลกระทบต่อร่างกาย นอกจากนี้ในใบชายังมีกรดออกซาลิก (oxalic acid) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์มีสูตรโมเลกุลคือ $H_2C_2O_4$ เมื่ออยู่ในรูปของประจุเรียกว่า ออกซาเลต (oxalate) ซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีเหมือนกับหมู่ลิแกนด์ (ligand) ในสารประกอบเชิงซ้อน หากร่างกายได้รับออกซาเลตเข้าไปจะไปรวมกับแร่ธาตุอื่นกลายเป็นผลึกออกซาเลต ถ้าออกซาเลตรวมกับไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) จะเกิดเป็นแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) ที่ไม่ละลายน้ำและเป็นสาเหตุทำให้เกิดก้อนนิ่วแคลเซียมออกซาเลตในระบบทางเดินปัสสาวะได้ (4) ซึ่งในประเทศไทยผู้ป่วยโรคนิ่วมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น การมีนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะจะส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนได้ เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การทำงานของไตเสื่อมลง เกิดภาวะไตวายเรื้อรังและโรคไตระยะสุดท้าย ผู้ป่วยที่เคยเป็นโรคนิ่วมีโอกาสเป็นนิ่วซ้ำสูงมาก ทำให้สูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง โรคนิ่วจึงจัดเป็นปัญหาสุขภาพที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรไทย (5) ดังนั้นการหาปริมาณออกซาเลตในชาพร้อมดื่มจึงมีความสำคัญเพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาเพื่อลดปัจจัยเสี่ยงที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดนิ่วจากออกซาเลต

การหาปริมาณออกซาเลตในอาหารหรือเครื่องดื่มมีหลายวิธี เช่น โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) ในปี 1998 Fengwu Wu (6) และคณะได้พัฒนาวิธีการหาปริมาณออกซาเลตในชาด้วยเทคนิค HPLC ที่ตรวจวัดด้วยวิธีวัดการเปล่งแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี (chemiluminescence) โดยใช้ tris(1,10-phenanthroline)-ruthenium (II) เป็นรีเอเจนต์ที่เติมลงในเฟสเคลื่อนที่ ผลการวิเคราะห์พบว่ามีขีดจำกัดการตรวจวัด (detection limit) เท่ากับ 6.2 ไมโครโมลาร์ และมีความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

ต่อมาในปี 2010 Hönow และคณะ (7) ได้หาปริมาณออกซาเลตในชาเขียวสำหรับชงจากแหล่งปลูกที่ต่างกันด้วยเทคนิค HPLC แบบการแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) โดยเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ผสมด้วยเอทิลีนไดเอมีนเตตระแอซิติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) และใช้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase enzyme) เพื่อเปลี่ยนออกซาเลตให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นทำการตรวจวัดด้วยวิธีแอมเพอโรเมตรี (amperometry) จากการศึกษาพบว่าปริมาณออกซาเลตที่ละลายอยู่ในน้ำชามีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 8.3 ถึง 139.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี 2011 Morita และคณะ (8) ทำการหาปริมาณออกซาเลตในชาในกลุ่ม *Camelliasinensis L.* จากใบ ลำต้นและราก ด้วยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี (ion chromatography) พบว่ารากมีปริมาณออกซาเลตที่สามารถละลายในน้ำได้มากที่สุด และใบชามีปริมาณออกซาเลตมากที่สุด

อย่างไรก็ตาม HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีความยุ่งยากในการเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์เนื่องจากต้องกำจัดเมทริกซ์ (matrix) ที่อาจส่งผลต่อเฟสคงที่ (stationary phase) ภายในคอลัมน์ โดยทำให้เกิดการอุดตันของคอลัมน์และส่งผลให้ประสิทธิภาพในการแยกสารลดลง และในการวิเคราะห์สารหลายชนิดที่มีโครงสร้างแตกต่างกันอาจต้องใช้คอลัมน์ที่มีเฟสคงที่ต่างชนิดกัน ดังนั้นจึงได้มีผู้พัฒนานำเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (capillary electrophoresis, CE) มาใช้ในการหาปริมาณออกซาเลตในชา

สำหรับเทคนิค CE จัดเป็นเทคนิคในการวิเคราะห์สารโดยใช้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า การแยกอาศัยความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร เทคนิคนี้ใช้สารเคมีและตัวทำละลายในปริมาณน้อยมาก สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพการแยกที่สูง ดังนั้นเทคนิค CE จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจสำหรับการหาปริมาณออกซาเลต

จากการศึกษาของ Hideki Horie และคณะ (9) ได้วิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตในชาพร้อมชงที่บรรจุอยู่ในถุงด้วยเทคนิค CE แบบกลับขั้วไฟฟ้า (reversed polarity) ซึ่งมีการควบคุมภาวะการทดลองโดยใช้สารละลายโครเมต (chromate) และพทาเลต (phthalate) เป็นสารละลายบัฟเฟอร์และสารเติมแต่งที่ประกอบด้วย โซเดียมโครเมต (sodium chromate), tetradecyltri-methylammonium bromide (TTAB) และ ethylenediaminetetraacetic acid (disodium salt) ใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยก -20 กิโลโวลต์ และใช้การตรวจวัดแบบยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (uv-visible spectroscopy) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่ามีความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สูงและปริมาณออกซาเลตที่ตรวจพบในชาแต่ละชนิดอยู่ในช่วง 12.1 ถึง 76.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายังไม่มีรายงานการใช้เทคนิค CE สำหรับหาปริมาณออกซาเลตในชาพร้อมดื่มที่มีขายอย่างแพร่หลายในท้องตลาดในปัจจุบัน และนอกจากนี้ในชาพร้อมดื่มยังประกอบด้วยซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการหาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มด้วยเทคนิค CE โดยจะทำการหาภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทดลอง ได้แก่ ชนิด pH และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ให้เหมาะสม เพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ในชาพร้อมดื่มได้คราวเดียวกัน โดยคาดว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และสามารถนำไปประยุกต์ในการหาปริมาณสารแต่ละชนิดดังกล่าวในตัวอย่างชาพร้อมดื่ม เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณออกซาเลตในชาพร้อมดื่มสำหรับเป็นแนวทางในการเลือกบริโภคชาพร้อมดื่มเพื่อช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิ่ว ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นดังกล่าวจะสามารถตรวจวัดปริมาณออกซาเลตออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์

1. พัฒนาวิธีหาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มด้วยเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส
2. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. หาภาวะที่เหมาะสม เช่น บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยก (ชนิด pH และความเข้มข้น) และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ในชาพร้อมดื่ม
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น เช่น ขีดจำกัดการตรวจวัด ขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ความแม่น ความเที่ยง และช่วงความเป็นเส้นตรง
3. วิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับหาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ในชาพร้อมดื่ม
2. ข้อมูลปริมาณออกซาเลตที่มีอยู่ในชาพร้อมดื่ม เพื่อใช้เป็นแนวทางในการบริโภคเพื่อลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิ่ว

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

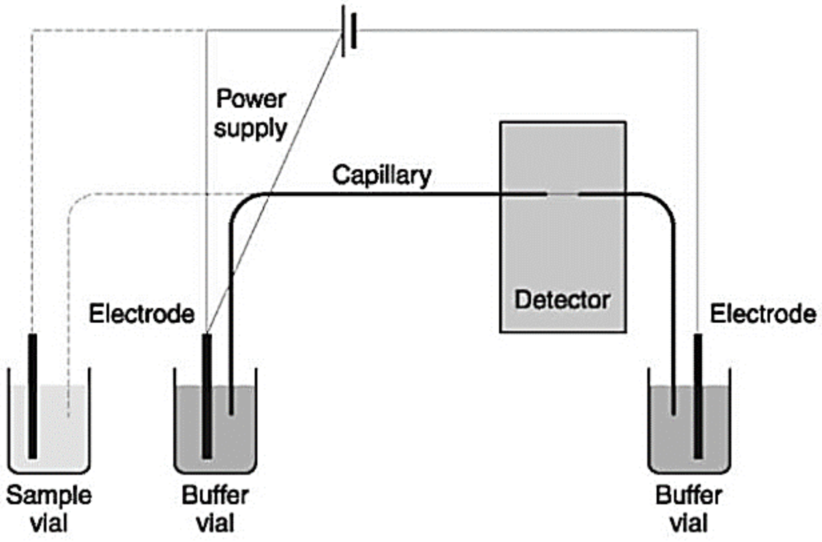
บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary electrophoresis, CE)

คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารผ่านตัวกลางที่เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ที่บรรจุในคะพิลลารีขนาดเล็ก ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า โดยกลไกการแยกจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของค่าการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งเป็นค่าจำเพาะของสารแต่ละชนิด เทคนิค CE เหมาะกับการแยกสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ที่มีประจุและไม่มีประจุ รวมทั้งสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีนและเพปไทด์ เป็นต้น

2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE (10)

1) คะพิลลารี (capillary)

โดยทั่วไปใช้คะพิลลารีที่เป็น fused silica capillary มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 10 ถึง 200 μm ทั่วไปนิยมใช้ขนาด 50 และ 75 μm ภายนอกคะพิลลารีถูกเคลือบด้วยพอลิเอไมด์ (polyamide) เพื่อป้องกันการแตกหัก โดยจะลอกพอลิเอไมด์ออกเฉพาะบริเวณที่ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี หรือ ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโคปี (fluorescence spectroscopy)

2) เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (voltage supply)

เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงที่ให้ความต่างศักย์ -30 ถึง +30 กิโลโวลต์ และกระแสสูงสุดไม่เกิน 200 ถึง 300 ไมโครแอมแปร์ ทั่วไปนิยมใช้ความต่างศักย์คงที่ และให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นบวก กำหนดให้ขั้วไฟฟ้าด้านฉีดสารเข้าเป็นขั้วบวก ขั้วไฟฟ้าด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วลบ ซึ่งเรียกว่าการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบขั้วปกติ (normal polarity) และเรียกศักย์ไฟฟ้าเมื่อขั้วไฟฟ้าฝั่งฉีดสารเข้าเป็นขั้วลบ ขั้วไฟฟ้าด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวกว่าศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reversed polarity)

3) ขั้วไฟฟ้า (electrode)

นิยมใช้ขั้วไฟฟ้าที่เป็นลวดโลหะแพลทินัม

4) สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE)

สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่นิยมใช้โดยทั่วไปจะประกอบด้วยบัฟเฟอร์ เช่น บอเรต ฟอสเฟตและอะซิเทต เป็นต้น อาจมีการเติมสารเติมแต่ง เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์หรือ (tetradecyltrimethyl ammonium bromide, TTAB) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแยก เป็นต้น

5) ภาชนะบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และสารตัวอย่าง

ส่วนมากภาชนะที่ใช้บรรจุมักทำจากแก้ว ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 1 ถึง 5 มิลลิลิตร

6) เครื่องตรวจวัด (detector)

เครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้คือ ยูวี-วิสิเบิล และฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถวัดสารบนคอลัมน์โดยตรง หรือเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ (mass spectrometer) ที่ต้องต่อแยกจากเครื่อง CE

7) ส่วนควบคุมความดัน (pressure controller)

เป็นส่วนที่ใช้บรรจุสารละลายเข้าสู่คะพิลลารี และยังใช้เป็นระบบบรรจุสารแบบอัดความดัน นิยมใช้แก๊สไนโตรเจน หรือเครื่องอัดอากาศ

8) ระบบการฉีดสารตัวอย่าง (sample introduction)

การฉีดสารตัวอย่างอาจให้ศักย์ไฟฟ้า (electrokinetic injection) จากเครื่องกำเนิดไฟฟ้า หรือการให้ความดัน (pressure injection) จากระบบควบคุมความดัน

9) ส่วนควบคุมอุณหภูมิของคะพิลลารี (temperature controller)

เป็นส่วนที่ช่วยลดอุณหภูมิของคะพิลลารีเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าในขณะทำการแยกสาร และใช้สำหรับเปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อปรับประสิทธิภาพการแยกสารให้ดีขึ้น

2.3 การทำงานของเครื่อง CE

1) บรรจุโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อเปลี่ยนผิวของคะพิลลารีให้เป็นประจุลบ หรือบรรจุกรดฟอสฟอริกเพื่อลดประจุลบบนผิวของคะพิลลารี

2) บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์เข้าสู่หลอดคะพิลลารี

3) บรรจุสารละลายตัวอย่างเข้าสู่หลอดคะพิลลารี

4) จุ่มปลายหลอดคะพิลลารี และขั้วไฟฟ้าทั้งสองข้างลงในภาชนะบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เพื่อทำการแยกสารตัวอย่าง

5) ให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อให้สารเกิดการเคลื่อนที่และแยกออกจากกันตามค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (μ) ของสาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 ประเภทของเทคนิค CE

เทคนิค CE แบ่งออกเป็น 6 ประเภทหลักตามกลไกการแยกของสาร ดังนี้

1) Capillary Zone Electrophoresis (CZE)

ภายในคะพิลลารีประกอบด้วยบัฟเฟอร์ โดยกลไกการแยกขึ้นกับความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารเนื่องจากอัตราส่วนประจุต่อขนาดที่ต่างกัน นิยมใช้ CZE สำหรับสารที่มีประจุทั่ว ๆ ไป อย่างไรก็ตาม CZE สามารถวิเคราะห์สารที่ไม่มีประจุได้โดยเติม complexing agent เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีประจุ

2) Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC)

มีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงในบัฟเฟอร์เพื่อให้เกิดไมเซลลาร์เฟส กลไกการแยกขึ้นกับความต่างของค่าคงที่การกระจายตัว (distribution equilibrium) ระหว่างเอเควียสเฟส (aqueous phase) และไมเซลลาร์เฟส (micellar phase) ดังนั้น MEKC จึงสามารถแยกได้ทั้งสารที่มีประจุและไม่มีประจุ

3) Capillary Electrochromatography (CEC)

คะพิลลารีถูกบรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) ดังนั้นกลไกการแยกจึงขึ้นอยู่กับความแตกต่างของค่าคงที่การกระจายตัวระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับเฟสคงที่ ดังนั้น CEC สามารถใช้แยกได้ทั้งสารที่มีประจุและไม่มีประจุ

4) Capillary Gel Electrophoresis (CGE)

คะพิลลารีประกอบด้วยเจล โดยกลไกการแยกขึ้นอยู่กับความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารผ่านรูพรุนของเจลที่ต่างกัน CGE จึงเหมาะกับการแยกสารโมเลกุลใหญ่ที่มีประจุ เช่น ดีเอนเอ โปรตีน เป็นต้น

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5) Capillary Isoelectric Focusing (CIEF)

คะพิลลารีถูกบรรจุด้วยบัฟเฟอร์ที่ทำให้เกิดพีเอชเกรเดียนท์ (pH gradient) กลไกการแยกขึ้นกับค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, p*I*) ที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิด CIEF มักใช้แยกสารประเภทแอมโฟไลต์ (ampholytes) เช่น โปรตีน และกรดอะมิโน เป็นต้น

6) Capillary Isotachophoresis (CITP)

คะพิลลารีประกอบด้วย discontinuous electrolyte คือ leading electrolyte (มีค่า μ สูง) และ terminating electrolyte (มีค่า μ ต่ำ) กลไกการแยกจึงขึ้นกับค่า μ ที่ต่างกันของสารที่ภาวะสมดุล (steady state) สารเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเท่ากัน

ในงานวิจัยนี้ จะใช้แค่ CZE ดังนั้นจะกล่าวถึง CZE ในรายละเอียด

2.5 คะพิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟริซิส (Capillary Zone Electrophoresis, CZE)

เทคนิค CZE เป็นที่นิยมใช้โดยทั่วไปเนื่องจากเทคนิค CZE เหมาะกับการแยกสารที่มีประจุ และสามารถวิเคราะห์สารที่ไม่มีประจุได้เมื่อเติม complexing agent ซึ่งการแยกสารใน CZE สามารถทำได้ง่าย ตัวกลางที่ใช้คือบัฟเฟอร์และบางกรณีอาจเติมสารเติมแต่งบางชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแยกของสาร กลไกการแยกขึ้นกับความต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า ที่เป็นผลมาจากอัตราส่วนประจุต่อขนาดที่ต่างกัน

2.5.1 ค่าการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ)

คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity, v_{ep}) ภายใต้ความเข้มของสนามไฟฟ้า 1 V m^{-1} ซึ่งเป็นค่าจำเพาะของสารแต่ละชนิด และในตัวกลางใด ๆ ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารจะขึ้นกับ ค่าประจุ รัศมีไฮโดรไดนามิก และความหนืดของตัวกลางดังสมการ

$$\mu = \frac{v_{\mathrm{ep}}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_{\mathrm{h}}} \qquad (2.1)$$

E ความแรงของสนามไฟฟ้า (applied electric field)

z ค่าประจุของสาร

e ค่าประจุของอิเล็กตรอน (1.6×10^{-19} คูลอมบ์)

η ความหนืดของสารละลาย

r_h รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

จากสมการดังกล่าว จะเห็นได้ว่าสารที่มีค่าประจุมากและขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วที่สุด ส่วนสารที่มีประจุน้อยและขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปได้ช้าที่สุด อีกประการหนึ่งคือ สารที่มีประจุตรงกันข้ามจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้ามกัน

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่า μ ได้แก่

1) ความเข้มข้น หรือความแรงไอออนิก (ionic strength) ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

เมื่อความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เพิ่มสูงขึ้น ทำให้สารตัวอย่างถูกล้อมรอบด้วยเคาน์เตอร์ไอออนที่มีประจุตรงข้ามของสารละลายอิเล็กโทรไลต์จึงทำให้ r_h จึงเพิ่มขึ้น และ z ลดลง ส่งผลให้ μ ลดลง แต่การเติมสารละลายอิเล็กโทรไลต์มากขึ้น จะทำให้มีไอออนอยู่ในระบบมากขึ้น ส่งผลให้เกิดความร้อนจากการให้ศักย์ไฟฟ้า (Joule heating) และอาจทำให้ μ เพิ่มขึ้นได้เนื่องจากความหนืดที่ลดลง

2) pH ของบัฟเฟอร์

หากสารตัวอย่างเป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ค่า pH ของบัฟเฟอร์จะมีผลต่อดีกรีการแตกตัวของสาร (degree of ionization, α) โดยความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าปรากฏ (μ_{eff}) ของสารขึ้นกับดีกรีการแตกตัวของสารและความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารที่แตกตัว 100% (μ_0) ถ้าสารตัวอย่างเป็นกรดอ่อน สารจะแตกตัวเป็นประจุลบมากขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น μ จึงเพิ่มขึ้น หากสารตัวอย่างเป็นเบสอ่อน สารจะรับโปรตอนเป็นประจุบวกมากขึ้นเมื่อ pH ลดลง ส่งผลให้ μ เพิ่มขึ้น

3) ความหนืดและอุณหภูมิ

ความหนืด

จากสมการ 2.1 พบว่า ค่า μ แปรผกผันกับความหนืด ดังนั้นเมื่อเพิ่มความหนืดของสารละลายตัวกลาง จึงส่งผลให้ μ ลดลง

อุณหภูมิ

เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ความหนืดลดลงและทำให้ค่า μ ของสารเพิ่มขึ้น

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4) ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)

การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงในบัฟเฟอร์ ตัวทำละลายอินทรีย์จะล้อมรอบสารตัวอย่างทำให้สารตัวอย่างมีขนาดใหญ่ขึ้น และส่งผลให้การแตกตัวของสารที่เป็นกรดอ่อนและเบสอ่อนลดลง จึงทำให้ค่า μ ลดลง แต่หากเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มากในปริมาณหนึ่งอาจทำให้ค่า μ เพิ่มขึ้นได้เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้ความหนืดลดลง

2.5.2 อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis)

เนื่องจากคะพิลลารีที่ใช้ในเทคนิค CE ทำด้วย fused silica ผิวด้านในของคะพิลลารีจึงประกอบด้วยหมู่ซิลานอล (silanol group, Si-OH) เมื่อผิวคะพิลลารีสัมผัสกับบัฟเฟอร์ที่มี pH > 2 ส่งผลให้หมู่ซิลินอลเกิดการแตกตัว ทำให้ผิวด้านในของคะพิลลารีมีประจุเป็นลบ ดังสมการ

$$\text{-Si-OH} + OH^- \rightleftharpoons \text{-Si-O}^- + H_2O \qquad (2.2)$$

$$\text{-Si-OH} + H_2O \rightleftharpoons \text{-Si-O-} + H_3O^+ \qquad (2.3)$$

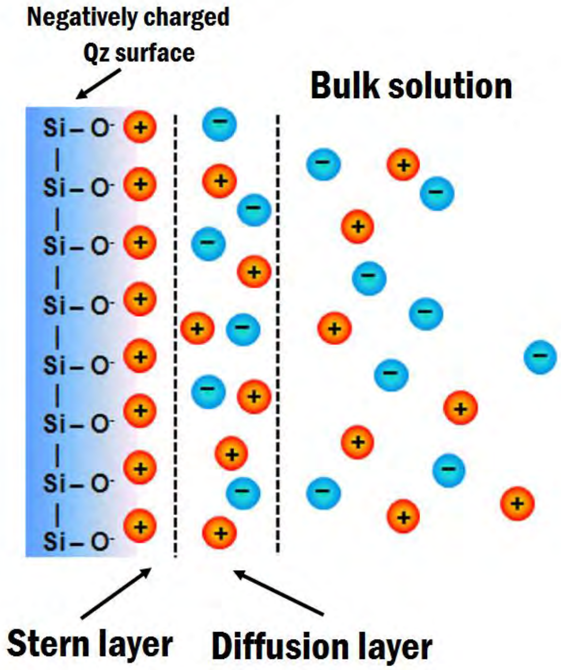
เมื่อผิวด้านในของคะพิลลารีมีประจุเป็นลบ (anion) จึงมีความสามารถในการดึงดูดประจุบวก (cation) จากสารละลายตัวกลางมาเกาะที่ผิว เกิดเป็นชั้นของไอออน 2 ชั้น หรือ double layers (ดังรูปที่ 2.2) ประกอบด้วย

1. Fixed Layer หรือ The Stern Layer คือชั้นที่ประจุบวกเกาะติดแน่นกับผิวของคะพิลลารีโดยไม่เคลื่อนที่เนื่องจากแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic force) หรือแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals forces)

2. Diffuse Layer คือชั้นที่ไอออนบวกเกาะอย่างหลวม ๆ

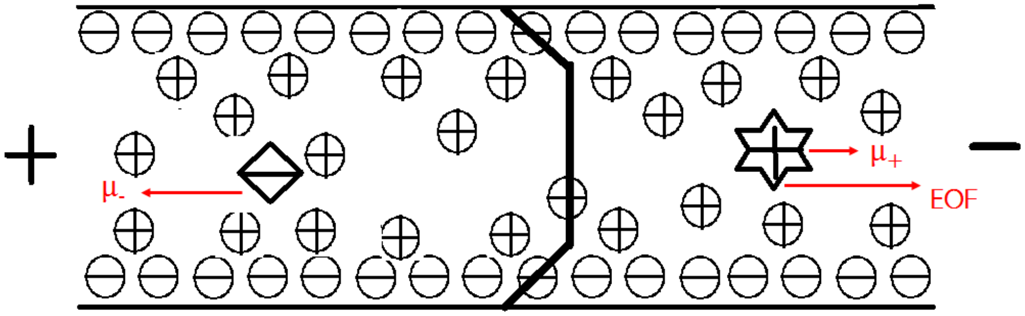
3. Bulk solution คือส่วนประจุบวกที่เหลือที่กระจายอยู่ในสารละลาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 Double layer ที่ผนังคะพิลลารี (ref.11)

เมื่อให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ปลายสองข้างของคะพิลลารี (กำหนดให้ขั้วไฟฟ้าด้านการตรวจวัดเป็นขั้วลบ) ประจุบวกที่อยู่กันหนาแน่นแต่เคลื่อนที่ได้ที่ชั้น Diffuse Layer ก็เคลื่อนไปยังขั้วลบ แต่เนื่องจากประจุบวกมีน้ำล้อมรอบ การเคลื่อนที่ของประจุบวกจึงพาโมเลกุลน้ำไปด้วย เกิดเป็นกระแสของสารละลายตัวกลางไหลจากปลายของคะพิลลารีด้านหนึ่ง (ขั้วบวก) ไปยังปลายอีกด้านหนึ่ง (ขั้วลบ) โดยเรียกปรากฏการณ์การเคลื่อนที่ของน้ำหรือสารละลายนี้ว่า “อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis)” และเรียกการเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลนี้ว่า electroosmotic flow (EOF) ซึ่งสารทุกชนิดจะได้รับอิทธิพลจากแรง EOF เท่ากัน และ EOF เป็นตัวพาให้ประจุลบสามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบได้ แต่เนื่องจากสารมี μ ที่ต่างกัน จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้ ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (EOF) ในคะพิลลารี

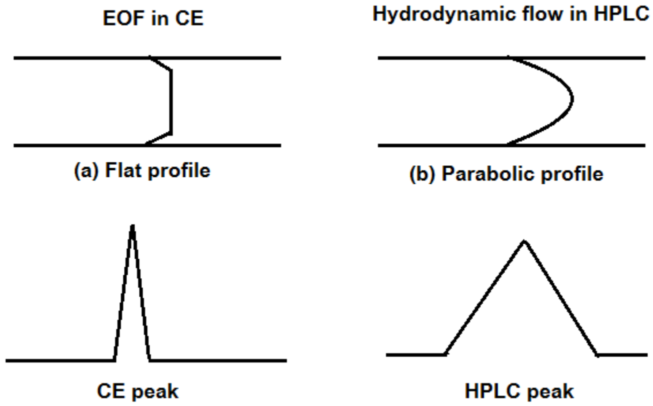
ความเร็วของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic velocity, v_{eo}) ในความเข้มสนามไฟฟ้า 1 V m^{-1} เรียกว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วยอิเล็กโทรออสโมซิส หรือสัมประสิทธิ์ของอิเล็กโทร-ออสโมซิส (electroosmotic mobility, μ_{eo}) ดังสมการที่ 2.4

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{-\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \qquad (2.4)$$

ε permittivity ของตัวกลาง

ζ ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential)

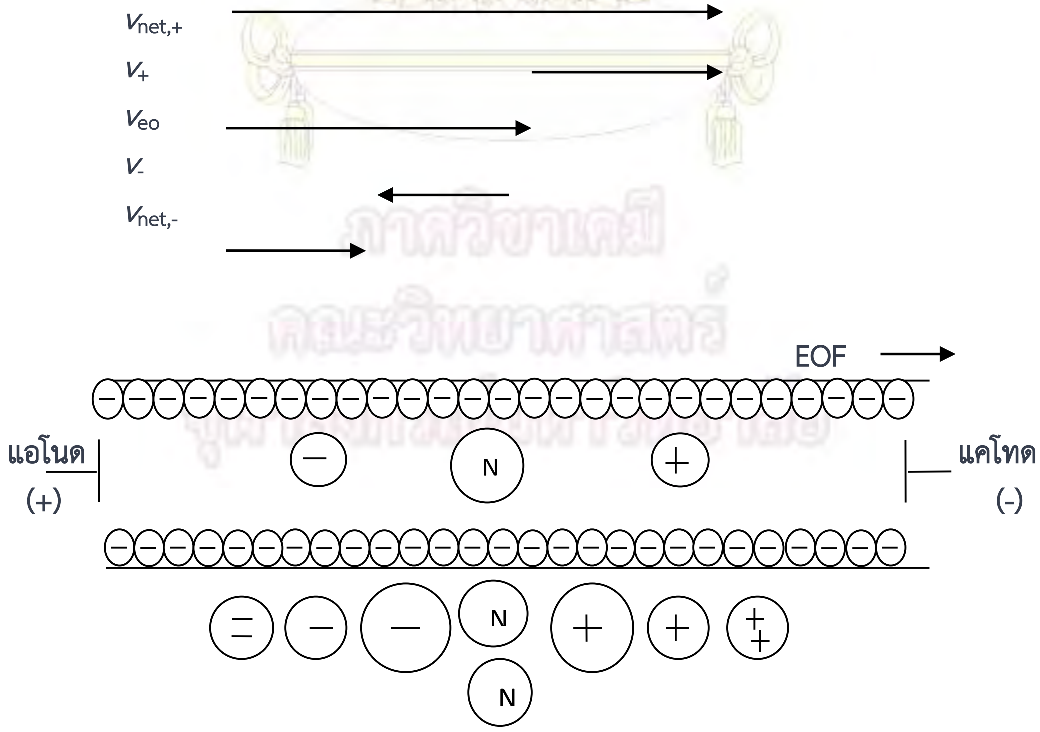
จากรูปที่ 2.3 จะพบว่า μ_{eo} เท่ากันตลอดรัศมีของคะพิลลารี ลักษณะการเคลื่อนที่เป็นแบบหน้าตัดเรียบ (flat flow profile) ซึ่งแตกต่างจากการไหลใน HPLC ที่ใช้ pump เป็นตัวผลักดันทำให้เกิดการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งการไหลโดยใช้ pump จะเป็นแบบลามินาร์ (laminar) เนื่องจากอัตราเร็วของ mobile phase ตรงกลางคอลัมน์จะสูงกว่าที่ผนังซึ่งมีแรงเสียดทาน (shear force) ผลที่ตามมาคือโซนของสารที่เกิดจากการแยกใน CE จะแคบกว่าใน HPLC จึงทำให้ประสิทธิภาพในการแยก (separation efficiency) ของ CE ดีกว่า HPLC ดังรูปที่ 2.4



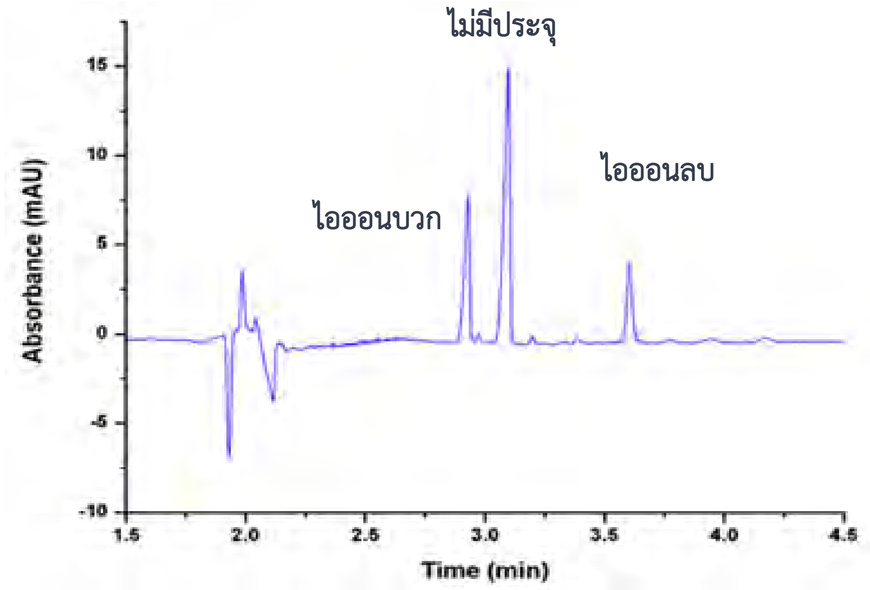
รูปที่ 2.4 Flat Flow Profile และพีคของสารใน CE (a) และ HPLC (b)

2.5.2.1 การเคลื่อนที่ของสารภายใต้ EOF ปกติ (normal EOF)

(ก)



(ข)



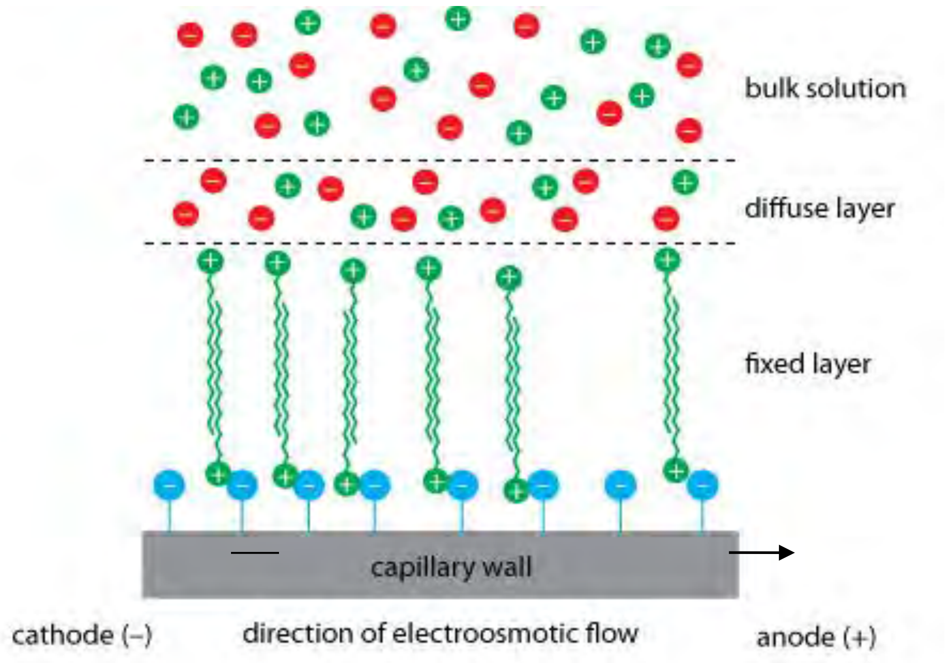
รูปที่ 2.5 (ก) พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสาร (ประจุ บวก ลบ และไม่มีประจุ) ภายใต้อิทธิพลของ EOF ปกติ ซึ่งผิวของคะพิลลารีเป็นประจุลบและใช้ขั้วไฟฟ้าปกติ (ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วลบ) ขนาดไอออนที่แสดงหมายถึงรัศมีไฮโดรไดนามิก (ข) ลำดับการแยกของสารจะเป็น สารที่มีประจุบวก สารที่ไม่มีประจุ และสารที่มีประจุลบ ตามลำดับ

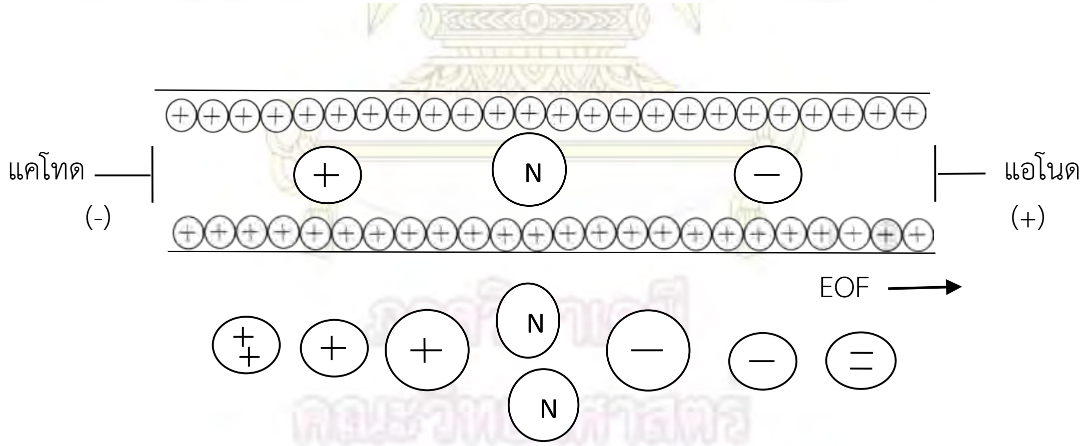
โดยปกติ EOF จะมีทิศทางการเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบที่อยู่ด้านปลายหรือด้านเครื่องตรวจวัด สารทุกชนิดจะได้รับอิทธิพลจาก EOF ที่เท่ากัน ดังนั้นสารตัวอย่างที่เป็นไอออนบวกจะมีทิศทางการเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบเช่นเดียวกับ EOF จึงทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของไอออนบวก (v_{net}) มาจากความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวมันเอง ($v_{ep,+}$) รวมกับความเร็วของ EOF (v_{eo}) ดังนั้นไอออนบวกที่มีค่าประจุมากและมีรัศมีไฮโดรไดนามิกน้อย (ค่า μ มาก) จะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดออกมาก่อน ดังรูปที่ 2.5 ส่วนสารตัวอย่างที่เป็นไอออนลบจะมีทิศทางการเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกหรือด้านเข้า ซึ่งมีทิศทางตรงข้ามกับ EOF แต่ถ้า v_{eo} มีขนาดมากกว่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของไอออนลบ ($v_{ep,-}$) ในที่สุด EOF จะสามารถพาไอออนลบเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดไปยังขั้วลบได้ แต่ลำดับการเคลื่อนที่จะตรงข้ามกับไอออนบวก โดยไอออนลบที่มีประจุมากและรัศมีไฮโดรไดนามิกน้อย (ค่า μ มาก) จะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง เนื่องจากมีแรงต้าน EOF มากกว่า (ดังรูปที่ 2.5) ส่วนสารตัวอย่างที่ไม่มีประจุจะเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจวัดได้เนื่องจาก EOF เท่านั้น โดยจะออกมาพร้อมกันและไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ดังนั้นในภาวะ EOF ปกติ ลำดับการออกของสารจะเป็น ไอออนบวก สารที่ไม่มีประจุ และไอออนลบ ตามลำดับ

2.5.2.2 การกลับทิศการเคลื่อนที่ของ EOF (Reversed EOF)

การกลับทิศทางของ EOF นิยมใช้กับแยกสารตัวอย่างที่เป็นไอออนลบที่มีค่า μ มาก เพื่อให้สารตัวอย่างสามารถเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดได้เร็วขึ้น การกลับทิศของ EOF ทำได้โดยเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactant) เช่น tetradecyltrimetylammonium bromide (TTAB) ลงไปใน BGE ซึ่งสารลดแรงตึงผิวจะมีการเรียงตัวเป็นสองชั้นที่ผิวคะพิลลารี โดยชั้นแรกส่วนหัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกจะถูกดูดซับที่ผิวของคะพิลลารีที่มีประจุลบโดยเกิดแรงดึงดูดแบบไอออนิก และส่วนหางนั้นจะชี้ออกมาในสารละลาย ขณะที่ชั้นที่สองส่วนหางของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะแทรกเข้าที่ส่วนหางของชั้นแรกและหันส่วนหัวออก ทำให้เสมือนว่าที่ผิวคะพิลลารีนั้นมีประจุบวกแทน ดังรูปที่ 2.6 และในสารละลายจะมีไอออนลบอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า ไอออนลบเหล่านี้จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วแอโนดซึ่งเป็นขั้วบวก และพาโมเลกุลน้ำและตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปด้วย เกิดเป็น EOF ที่มีทิศทางไปทางขั้วบวก (EOF กลับทิศ) ดังนั้นถ้าต้องการให้ EOF เคลื่อนที่ไปทางเครื่องตรวจวัดจะต้องทำการกลับขั้วไฟฟ้า (reversed polarity) ให้ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวกหรือขั้วแอโนด นั่นคือการกลับทิศของ EOF มักจะเกิดคู่กับการกลับขั้วไฟฟ้า โดยลำดับการแยกคือ สารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ออกมาก่อนสารไม่มีประจุ และสารที่มีประจุลบตามลำดับ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 2.6 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทแคตไอออนต่อทิศทางการไหลของ EOF และลำดับการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ reversed EOF (12)

2.5.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อ EOF

1) ความเข้มข้นหรือความแรงไอออนิกของ BGE

การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ทำให้ความหนาของ diffusion layer ลดลง ขนาดของ ζ ลดลง (จากสมการที่ 2.4) ดังนั้น ค่า μ_{eo} ลดลง แต่การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย BGE อาจทำให้ค่า μ_{eo} เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากเกิดความร้อนส่งผลให้ความหนืดของสารละลายลดลง

2) ความหนืดและอุณหภูมิ

จากสมการที่ 2.2 จะเห็นว่าค่า μ_{eo} แปรผกผันกับความหนืด (η) ดังนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิความหนืดจะลดลงทำให้ μ_{eo} สูงขึ้น

3) pH ของบัฟเฟอร์

มีผลต่อการแตกตัวของหมู่ซิลานอลที่ผนังคะพิลลารี เมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH ต่ำ หมู่ซิลานอลแตกตัวได้น้อย ทำให้ μ_{eo} น้อย นั่นคือ μ_{eo} จะเพิ่มขึ้นตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น

4) ความต่างศักย์และขนาดคะพิลลารี

การเพิ่มความต่างศักย์หรือขนาดของคะพิลลารี อาจทำให้ค่า μ_{eo} เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากผลของความร้อนที่เกิดขึ้นจากการให้ศักย์ไฟฟ้า ซึ่งคะพิลลารีที่มีขนาดใหญ่จะระบายความร้อนที่เกิดขึ้นออกไปได้ช้าส่งผลให้ความหนืดของสารละลายลดลง ค่า μ_{eo} จึงเพิ่มขึ้น

5) ตัวทำละลายอินทรีย์

มีผลทำให้ EOF ลดลง เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์อาจเกิดอันตรกิริยากับผนังคะพิลลารี ทำให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์บริเวณ double layer เพิ่มขึ้น ความหนืดบริเวณ double layer เพิ่มขึ้น ค่า μ_{eo} จึงลดลง

2.5.3 ไมเกรชันไทม์ (migration time) และอิเล็กโทรเฟอโรแกรม (electropherogram)

การแสดงผลการแยกของเทคนิค CE จะเรียกว่า อิเล็กโทรเฟอโรแกรม (electropherogram) ซึ่งมีการแสดงผลออกมาเป็นพีคพร้อมกับระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่ดังรูป 2.7 โดยระยะเวลาที่สารใช้เคลื่อนที่จากปลายคะพิลลารีด้านบรรจุสารไปยังเครื่องตรวจวัด เรียกว่า ไมเกรชันไทม์ (migration time, t_m) ภายใต้ EOF ปกติสารที่มีประจุบวก (C) จะออกมาก่อน (t_m น้อยที่สุด) ตามด้วยสารที่ไม่มีประจุ (B) และสารที่มีประจุลบ (A) ความเร็วของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด (v_{net}) จะเป็นผลรวมของการเคลื่อนที่เนื่องจากค่า μ ของสารเอง (v_{ep}) รวมกับความเร็ว EOF (v_{eo}) ดังสมการ

$$v_{net} = v_{eo} + v_{ep} \tag{2.5}$$

$$\mu_{net} = \mu + \mu_{eo} \tag{2.6}$$

ดังนั้นเมื่อทราบ ไมเกรชันไทม์ (t_m) ของสาร จะสามารถคำนวณ μ_{eo} และ μ ได้ดังสมการ

$$\mu_{eo} = \frac{lL}{vt_{eo}}, \ \mu_{net} = \frac{lL}{vt_m} \tag{2.7}$$

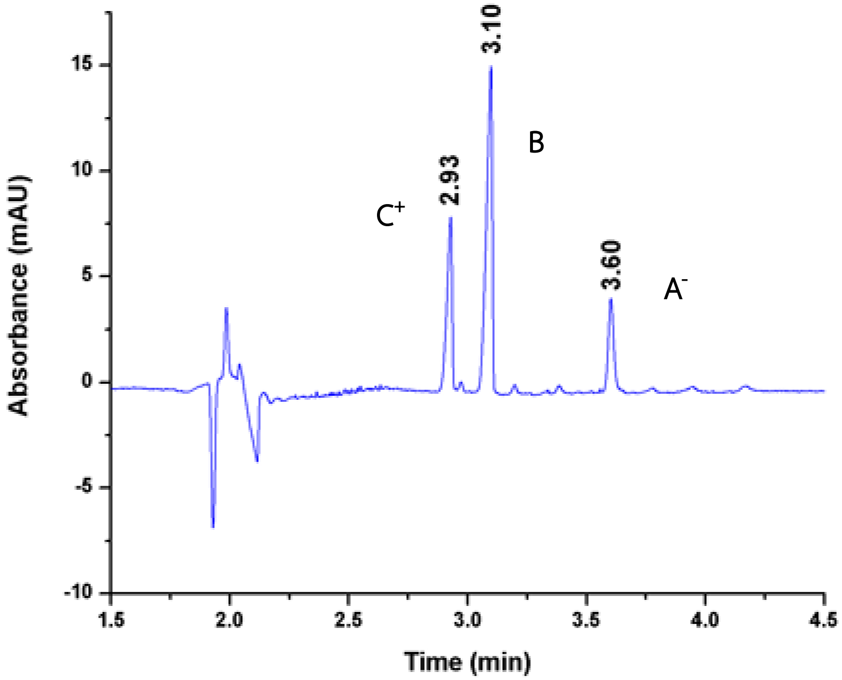
$$\mu = \mu_{net} - \mu_{eo} = \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}}\right)\frac{lL}{V} \tag{2.8}$$

L คือ ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี (m)

l คือ ความยาวจากปลายคะพิลลารีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด (m)

V คือ ศักย์ไฟฟ้า (V)

t_{eo} คือ ไมเกรชันไทม์ของสารที่ไม่มีประจุหรือ EOF marker (s)

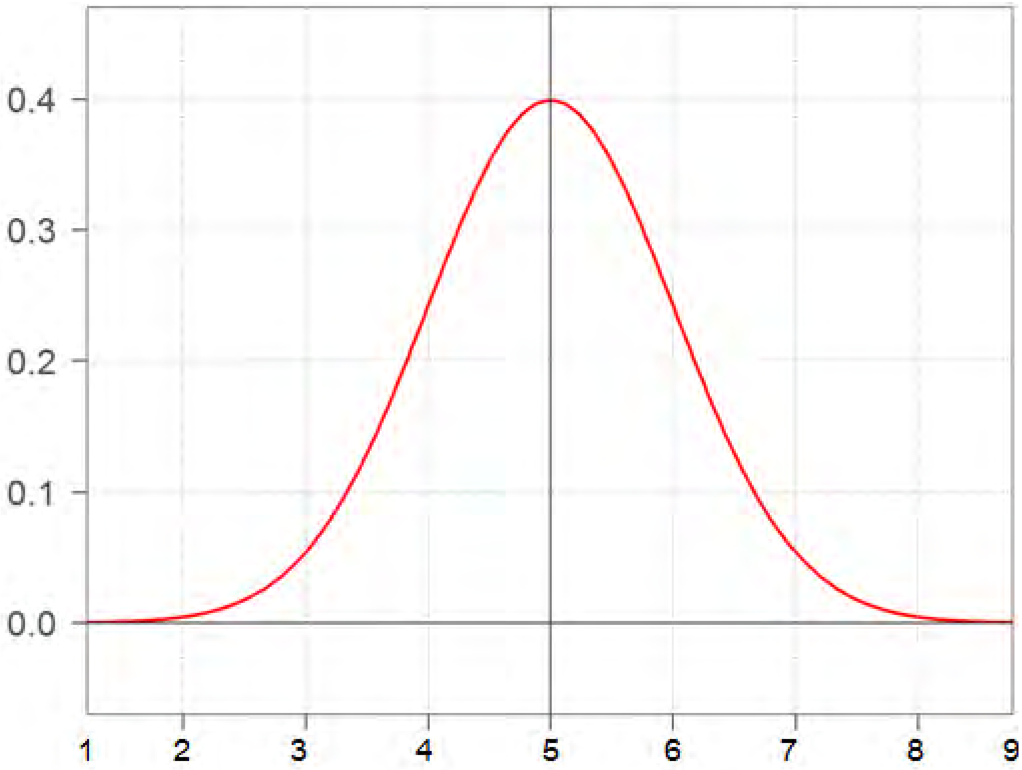


รูปที่ 2.7 ตัวอย่างอิเล็กโทรเฟอโรแกรมจากเครื่อง CE ของ A (ไอออนลบ), B (EOF marker ซึ่งไม่มีประจุ) และ C (ไอออนบวก)

2.5.4 Joule heating

เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารีที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ จะทำให้เกิดความร้อนขึ้นภายในคะพลิลลารี ซึ่งเรียกว่า Joule heating โดยความร้อนที่ผิวคะพิลลารีสามารถแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกได้ ทำให้สารละลายที่ติดกับผนังคะพิลลารีมีอุณหภูมิต่ำลง และอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นตามระยะห่างจากผนังคะพิลลารีกระทั่งมีอุณหภูมิสูงที่สุดตรงกลางของคะพิลลารี หากคะพิลลารีไม่มีการระบายความร้อนออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก จะทำให้อุณหภูมิภายในคะพิลลารีเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการไหลแบบพาราโบลา และเกิดการแพร่กระจายของโซนสาร ประสิทธิภาพการแยกจึงลดลง ดังนั้นในเครื่อง CE จึงมีระบบควบคุมอุณหภูมิภายในคะพิลลารีให้คงที่ ด้วยการใช้ตัวกลางที่เป็นอากาศ น้ำ หรือสารหล่อเย็น เพื่อเป็นการลด Joule heating ที่เกิดขึ้นจากการให้ศักย์ไฟฟ้า

2.5.5. การแพร่กระจายของพีคใน CE (Peak dispersion in CE)



รูปที่ 2.8 ลักษณะของพีคแบบ Gaussian

โดยทั่วไปพีคในอุดมคติ (ideal peak) จะมีลักษณะเป็น Gaussian peak ดังรูป 2.8 คือพีคมีลักษณะสมมาตร แต่ในความเป็นจริง พีคสารที่ได้อาจเบี่ยงเบนไปจากลักษณะของพีคในอุดมคติ เนื่องจากมีการแพร่กระจายของโซนสาร ทำให้ประสิทธิภาพการแยกลดลง โดยปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายของโซนสารมีดังนี้

1) Longitudinal เป็นการแพร่กระจายของสารออกไปด้านหน้าและหลังของโซนสารตามแนวแกน x เนื่องจากมีความแตกต่างของความเข้มข้นระหว่างบริเวณโซนสารตัวอย่างและโซนบัฟเฟอร์จึงทำให้สารเกิดการแพร่

2) Thermal dispersion เป็นการกระจายของโซนสารที่เป็นผลมาจากความร้อนที่เกิดขึ้นจาก Joule heating ทำให้เกิดการกระจายแบบพาราโบลา (parabolic distribution) โดยสารบริเวณตรงกลางคะพิลารีจะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุดเนื่องจากมีความหนืดน้อยที่สุด
3) Electromigration dispersion (EMD) เกิดเมื่อบริเวณโซนสารตัวอย่างและโซนบัฟเฟอร์มีค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) แตกต่างกันมาก สารบริเวณส่วนต้น กลาง และปลายของโซนจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน ทำให้มีการกระจายแบบ tailing peak หรือ fronting peak ส่งผลให้พีคที่ตรวจวัดได้ไม่สมมาตร
4) การดูดซับที่ผิวคะพิลลารี เกิดเนื่องจากผนังของคะพิลลารีมีประจุลบที่เกิดจากการแตกตัวของหมู่ซิลานอล สารตัวอย่างที่เป็นไอออนบวกสามารถเกิดอันตรกิริยาหรืออาจถูกดูดซับที่ผนังคะพิลลารี เป็นผลให้เกิดการกระจายของพีคแบบ tailing distribution

2.5.6 ค่าการแยกสาร (Resolution, R_s)

ค่าการแยกของสารจะพิจารณาจากระยะห่างระหว่าง 2 พีคที่ติดกัน ซึ่งค่าการแยกจะสามารถคำนวณได้จาก ระยะห่างของกึ่งกลางระหว่าง 2 พีคที่ติดกันต่อค่าเฉลี่ยของความกว้างของฐานพีคในหนึ่งหน่วยเวลา ดังสมการ

$$R_s = \frac{\Delta t_m}{0.5(W_1 + W_2)} \tag{2.9}$$

W_1 และ W_2 คือความกว้างของฐานพีคของสาร 1 และ 2 ตามลำดับ

ดังนั้นถ้า 2 พีคมีการแยกจากกันจนถึง baseline จะได้ค่า R_s = 1.5 และเพื่อความถูกต้องในการทำปริมาณวิเคราะห์ควรมี $R_s \geq 1.5$

2.6 คุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE (Qualitative and quantitative analysis in CE)

คุณภาพวิเคราะห์ใน CE สามารถทำได้โดย

1) เปรียบเทียบค่าไมเกรชันไทม์ (t_m) กับสารมาตรฐาน ซึ่งสารชนิดเดียวกันจะให้ค่า t_m เท่ากัน

2) เปรียบเทียบ UV spectrum ของสารที่สงสัยกับสารมาตรฐานที่มีไมเกรชันไทม์ใกล้เคียงกัน

3) การเติมสารมาตรฐาน (spiking technique) คือ การเติมสารละลายมาตรฐานของสารที่วิเคราะห์ลงไปในสารตัวอย่าง หากพีคใดในสารตัวอย่างมีพื้นที่ใต้พีคมากขึ้นแสดงว่าพีคนั้นคือสารที่ต้องการวิเคราะห์

4) ใช้ CE-MS เพื่อช่วยยืนยันสูตรโครงสร้างและระบุสารตัวอย่างได้

ปริมาณวิเคราะห์ใน CE

การทำปริมาณวิเคราะห์ใน CE จะไม่สามารถใช้พื้นที่ใต้พีค (peak area, A) ในการหาปริมาณได้โดยตรง เนื่องจากใน CE สารตัวอย่างแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากัน (ขึ้นอยู่กับค่า μ) ดังนั้นสารที่เคลื่อนที่ได้ช้าจะใช้เวลานานกว่าจะเคลื่อนผ่านเครื่องตรวจวัด จึงทำให้ได้พีคที่กว้างกว่าสารที่เคลื่อนที่ได้เร็วซึ่งจะใช้เวลาน้อย ดังนั้นใน CE จะใช้ค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับไมเกรชันไทม์ ซึ่งจะเรียกว่า พื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (corrected peak area, A_{corr}) ในการทำปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งจะช่วยแก้ไขปัญหาการเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากันได้ เพราะสารที่มีปริมาณเท่ากันและมี analyte response เท่ากัน สารที่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าทำให้มีพื้นที่ใต้พีคมากกว่า แต่จะมี A_{corr} ที่เท่ากัน ดังนั้น

$$A_{corr} = \frac{A}{t_m} \tag{3.0}$$

โดยทั่วไปของการทำปริมาณวิเคราะห์จะใช้วิธีการทำกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ส่วนมากมักใช้ 5 ความเข้มข้นที่ต่างกัน) นำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE และหาค่า A และ t_m จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง A_{corr} (แกน y) กับความเข้มข้นต่าง ๆ (แกน x) จะได้กราฟเส้นตรง (y = mx + c) สำหรับการหาปริมาณสารตัวอย่าง ทำโดยนำค่า A_{corr} ของพีคสารตัวอย่าง มาคำนวณหาความเข้มข้นจากสมการเส้นตรง

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือ

1) เครื่องคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส บริษัท Beckman รุ่น MDQ

2) เครื่องวัดพีเอช บริษัท Mettler Toledo

3) เครื่อง sonication บริษัท ultrasonic ster-cleaner

3.2 สารเคมี

1) di-Sodiumtetrabroratedecahydrate ($Na_2B_4O_7{\cdot}10H_2O$, มวลโมเลกุล = 381.37 g/mol) ของบริษัท AnalaR

2) Sodium phosphate monobasic monohydrate ($H_2NaPO_4{\cdot}H_2O$, มวลโมเลกุล= 137.99 g/mol) ของบริษัท Sigma-Aldrich

3) Tetradecyltrimethylammoniumbromide (TTAB, มวลโมเลกุล = 336.4 g/mol) ของบริษัท Sigma-Aldrich

4) Sodium oxalate ($Na_2C_2O_4$, มวลโมเลกุล = 134 g/mol) ของบริษัท Baker analyzed

5) Citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7{\cdot}H_2O$, มวลโมเลกุล = 210.14 g/mol) ของบริษัท Riedel deHaen

6) L-(–)-malic acid ($C_4H_6O_5$, มวลโมเลกุล = 134.09 g/mol) ของบริษัท Sigma-Aldrich
7) L-Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$, มวลโมเลกุล = 176.13 g/mol) ของบริษัท AnalaR

8) Sodium hydroxide (NaOH, มวลโมเลกุล= 40.00 g/mol) ของบริษัท Emsure

9) Phosphoric acid (H_3PO_4, มวลโมเลกุล = 97.995 g/mol) ของบริษัท Merck

10) น้ำ Milli Q ของบริษัท Progard

ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 mM ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL เตรียมได้จากการชั่ง di-Sodium tetrabroratedecahydrate 9.5343 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

3.3.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 500 mM ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL เตรียมได้จากการชั่ง Sodium phosphate monobasic monohydrate 6.8995 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

3.3.3 สารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ความเข้มข้น 1000 mg/L ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL เตรียมได้จากการชั่ง sodium oxalate, citric acid monohydrate, L-(–)-malic acid และ L-ascorbic acid 0.0381, 0.0250, 0.0250 และ 0.0250 g ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q โดยเตรียมแยกกันสำหรับสารแต่ละชนิด

3.3.4 สารละลาย TTAB ความเข้มข้น 5 mM ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL เตรียมได้จากการชั่ง TTAB 0.1682 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

3.3.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 M ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL เตรียมได้จากการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อใช้หาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต

3.4.1 ภาวะของเครื่อง CE ที่ใช้วิเคราะห์ ได้แก่

รูปแบบ/ภาวะที่ใช้	รายละเอียด
เครื่อง CE	Beckman รุ่น MDQ
คะพิลลารี	Uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ยาว 60.2 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด)
การบรรจุสาร	ใช้ความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที
การตรวจวัด	UV-Vis ช่วง 200-400 nm เลือกตรวจวัดที่ 195 nm

รูปแบบ/ภาวะที่ใช้	รายละเอียด
การ rinse คะพิลลารีคอลัมน์	ก่อนการทดลองครั้งแรกแต่ละวัน rinse ด้วย 1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M เวลา 15 นาที 2. สารละลายบัฟเฟอร์ 15 นาที ระหว่างการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งก่อนการบรรจุสารตัวอย่างในคะพิลลารีต้องล้างด้วย 1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M เวลา 1 นาที 2. สารละลายบัฟเฟอร์ 2 นาที หลังจากการทดลองในแต่ละวันต้องล้างด้วย 1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M เวลา 15 นาที 2. น้ำ Milli Q 15 นาที
อุณหภูมิของคะพิลลารี	25 °C

3.4.2 ศึกษาผลของชนิด ความเข้มข้น และ pH ของบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการแยกสารออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต

3.4.2.1 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายบัฟเฟอร์ผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสารละลายบัฟเฟอร์ผสม (บอเรตและฟอสเฟต) เตรียมโดยปิเปตสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 mM และ/หรือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 500 mM ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL ปริมาตรที่ปิเปตแสดงในตารางที่ 3.1 และในแต่ละขวด ปิเปตสารละลาย TTAB ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 2.5 mL (ความเข้มข้นสุดท้ายของ TTAB เท่ากับ 0.5 mM) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำ milli Q

ตารางที่ 3.1 ปริมาตรและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

ชนิดของบัฟเฟอร์	ความเข้มข้นบอเรต (mM)	ปริมาตรบอเรตความเข้มข้น 100 mM ที่ปิเปต (mL)	ความเข้มข้นฟอสเฟต (mM)	ปริมาตรฟอสเฟตความเข้มข้น 500 mM ที่ปิเปต (mL)
บอเรต	20	5.0	-	-
	40	10.0	-	-
	60	15.0	-	-
	80	20.0	-	-
	100	25.0	-	-
ฟอสเฟต	-	1.0	20	-
	-	2.0	40	-
	-	3.0	60	-
	-	4.0	80	-
บอเรตผสมฟอสเฟต	10	2.5	10	0.5
	10	2.5	20	1.0
	10	2.5	30	1.5
	10	2.5	40	2.0
	10	2.5	50	2.5
	10	2.5	60	3.0
	10	2.5	70	3.5
	10	2.5	80	4.0
	20	5.0	10	0.5
	20	5.0	20	1.0
	20	5.0	30	1.5
	20	5.0	40	2.0
	20	5.0	50	2.5
	20	5.0	60	3.0
	20	5.0	70	3.5
	30	7.5	10	0.5
	30	7.5	20	1.0
	30	7.5	30	1.5

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) ปริมาตรและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

ชนิดของบัฟเฟอร์	**ความเข้มข้นบอเรต (mM)**	**ปริมาตรบอเรตความเข้มข้น 100 mM ที่ปิเปต (mL)**	**ความเข้มข้นฟอสเฟต (mM)**	**ปริมาตรฟอสเฟตความเข้มข้น 500 mM ที่ปิเปต (mL)**
บอเรตผสมฟอสเฟต	30	7.5	40	2.0
	30	7.5	50	2.5
	40	10.0	10	0.5
	40	10.0	20	1.0
	40	10.0	30	1.5
	40	10.0	40	2.0
	50	12.5	10	0.5
	50	12.5	20	1.0
	50	12.5	30	1.5

จากนั้นนำสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิค CE เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สามารถแยก ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตได้อย่างสมบูรณ์

3.4.2.2 ศึกษา pH ที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในการแยกสาร

เลือกชนิด และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมและให้ค่าการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ดีที่สุด (ค่าการแยกมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5) และปรับ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยใช้ 0.1 M H_3PO_4 หรือ 1 M NaOH จากนั้นนำมาวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ผสมรวมกัน เพื่อเลือก pH ที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ที่ให้ค่าการแยกดีที่สุดและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่เหมาะสม

3.4.3 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่มีผลต่อการแยกสาร

เลือกชนิด ความเข้มข้น และ pH ของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมและให้ค่าการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ดีที่สุด และเปลี่ยนค่าศักย์ไฟฟ้าในการแยกสารเป็น -15 kV -20 kV และ -25 kV เพื่อหาศักย์ไฟฟ้าที่สามารถให้ค่าการแยกที่ดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานจนเกินไป

3.4.4 ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์

เลือกชนิด ความเข้มข้น pH ของบัฟเฟอร์ และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมและให้ค่าการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ดีที่สุด และเติมตัวทำละลายอินทรีย์คือสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายเมทานอลที่สามารถให้ค่าการแยกที่ดีขึ้น

3.5 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

3.5.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์

ขีดจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (limit of quantitation, LOQ) หาได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ผสมรวมกัน โดยแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 25, 20, 15, 10, 8, 5 และ 3 mg/L จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม และวัดอัตราส่วนของสัญญานต่อสัญญาณรบกวน (signal to signal ratio, S/N) ที่ให้ค่าใกล้เคียงกับ 3 และ 10 ทำการคำนวณขีดจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ ด้วยสมการที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

$$LOD = \frac{3}{S/N} \times C_{\mathbf{diluted}} \quad (3.1)$$

$$LOQ = \frac{10}{S/N} \times C_{\mathbf{diluted}} \quad (3.2)$$

เมื่อ C_{diluted} คือ ความเข้มข้นของสาร (mg/L)

3.5.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

สร้างกราฟมาตรฐานได้จากการโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q โดยปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ต้องปิเปตแสดงดังตารางที่ 3.2 และ 3.3 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิด CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม และสร้างกราฟโดยกำหนดให้แกน x คือ ความเข้มข้นของสาร แกน Y คือ พื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (Corrected Area, A_{corr}) ซึ่ง A_{corr} สามารถหาได้ดังสมการที่ 3.0

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจาก stock solution ความเข้มข้น 1000 mg/L

ขวดที่	**ความเข้มข้นของสารละลาย (mg/L)**				**ปริมาตรของสารละลาย stock solution 1000 mg/L ที่ใช้ (µL)**			
	ออกซาเลต	**ซิเทรต**	**มาเลต**	**แอสคอร์เบต**	**ออกซาเลต**	**ซิเทรต**	**มาเลต**	**แอสคอร์เบต**
1	10	25	25	25	250	625	625	625
2	30	100	100	50	750	2,500	2,500	1,250
3	50	250	250	100	1,250	6,250	6,250	2,500

ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจาก stock solution ความเข้มข้น 2000 mg/L

ขวดที่	**ความเข้มข้นของสารละลาย (mg/L)**				**ปริมาตรของสารละลายstock solution 2000 mg/L ที่ใช้ (µL)**			
	ออกซาเลต	**ซิเทรต**	**มาเลต**	**แอสคอร์เบต**	**ออกซาเลต**	**ซิเทรต**	**มาเลต**	**แอสคอร์เบต**
4	70	350	350	150	875	4,375	4,375	1,875
5	100	500	500	200	1,250	6,250	6,250	2,500

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.3 ความเที่ยง (Precision)

3.5.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ผสมรวมกัน ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเพื่อหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ขวดที่	**ความเข้มข้นของสารละลาย (mg/L)**				**ปริมาตรของสารละลายstock solution 1000 mg/L ที่ใช้ (µL)**			
	ออกซาเลต	**ซิเทรต**	**มาเลต**	**แอสคอร์เบต**	**ออกซาเลต**	**ซิเทรต**	**มาเลต**	**แอสคอร์เบต**
1	20	30	30	30	500	750	750	750
2	90	180	180	180	2,250	4,500	4,500	4,500

3.5.3.2 นำสารละลายมาตรฐานจากตารางที่ 3.4 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ดังหัวข้อที่ 3.4.2 ทำการทดลองภายในวันเดียว (intraday precision) โดยทำการวิเคราะห์ 10 ครั้ง ในหนึ่งวัน และทำการวิเคราะห์ต่างวันเป็นเวลา 3 วัน (Interday precision) เพื่อหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

3.5.4 ความแม่น (Accuracy)

คำนวนได้จากการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงในตัวอย่างชาพร้อมดื่ม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE เพื่อคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป ขั้นตอนการเตรียมสารละลายและการหาค่าความแม่นทำได้ดังนี้

3.5.4.1 เตรียมตัวอย่างชาพร้อมดื่มที่เจือจาง 2 เท่าโดยทำการกรองชาตัวอย่างด้วยด้วย syringe filter ขนาด 0.45 µm จากนั้นปิเปตมา 2,500 µL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL ผสมและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ปริมาตร 5,000 µL

3.5.4.2 เตรียมตัวอย่างชาพร้อมดื่มเจือจาง 2 เท่าที่เติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต โดยปิเปตชาพร้อมดื่ม (ตัวอย่างเดียวกับ 3.5.4.1) 5,000 µL ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2,000 mg/L ปริมาตร 125 µL (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 25 mg/L) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จากนั้นทำการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 µm

3.5.4.3 หาปริมาณออกซาเลต มาเลต และแอสคอร์เบต ในชาพร้อมดื่มตัวอย่างที่เตรียมในหัวข้อที่ 3.5.4.1 และ 3.5.4.2 ด้วยเทคนิค CE โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างชาพร้อมดื่มชนิดละ 10 ครั้ง

3.5.4.4 คำนวณหาร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ของสารละลายมาตรฐานผสมออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เติมลงไป โดยนำค่าพื้นที่ใต้พีคปรับค่า (corrected peak area, A_{corr}) ที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตจากกราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นในหัวข้อ 3.5.2 จะได้ปริมาณความเข้มข้นของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างชาพร้อมดื่มที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน (จากสารละลายในหัวข้อ 3.5.4.1) และความเข้มข้นของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างชาพร้อมดื่มรวมกับสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เติมลงไป (จากสารละลายในหัวข้อ 3.5.4.2) จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เติมลงไป ดังสมการที่ 3.3

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป}} \times 100 \qquad (3.3)$$

3.6 วิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในตัวอย่างชาพร้อมดื่มโดยวิธี CE ที่พัฒนาขึ้น

นำชาพร้อมดื่มตัวอย่างที่เจือจาง 2 เท่าด้วยน้ำ Milli Q มาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม ตามหัวข้อที่ 3.4.2 จากนั้นคำนวน A_{corr} ของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์-เบต แล้วนำมาคำนวณความเข้มข้นของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต จากกราฟมาตรฐานที่ได้ทำขึ้นในหัวข้อที่ 3.5.2 จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ดังนี้

$$y = mx + c \qquad (3.4)$$

y คือ พื้นที่ใต้พีคแก้ไข (corrected peak area, A_{corr}) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์

m คือ ความชันของกราฟ

x คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ (mg/L)

c คือ จุดตัดแกน y ของกราฟ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

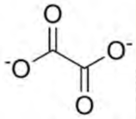
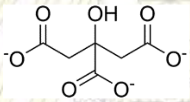
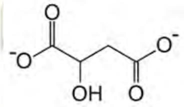
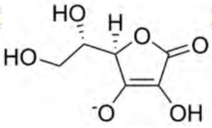
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล

CE เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า โดยสารจะเคลื่อนที่ได้เนื่องจากค่า μ ของสารเองรวมกับ EOF ในภาวะปกติของ CE คือการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบขั้วปกติ (normal polarity) ซึ่งคะพิลลารีด้านบรรจุสารตัวอย่างเข้า (inlet) เป็นขั้วบวก (anode) ส่วนด้านปลายออกหรือด้านเครื่องตรวจวัด (outlet) เป็นขั้วลบ (cathode) ลำดับการออกของสารจะเป็นดังนี้ สารที่เป็นไอออนบวกจะสามารถแยกออกมาได้ก่อนตามด้วยสารที่เป็นกลางและสารเป็นไอออนลบ โดยอิทธิพลความแรงของ EOF จะช่วยให้สารที่เป็นกลางและสารที่เป็นไอออนลบสามารถเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจวัดได้ แต่หากสารตัวอย่างมีประจุลบมาก เช่น ในกรณีของ ออกซาเลต มาเลต แอสคอร์เบต ที่มีประจุ 2 ลบ และซิเทรตที่มีประจุ 3 ลบ ซึ่งมีค่า μ สูง ทำให้ต้านแรงของ EOF ได้มาก ทำให้สารออกมาช้า หรือ EOF อาจไม่สามารถพาสารออกมาได้ ดังนั้นจึงต้องใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reversed polarity) โดยที่คะพิลลารีด้านบรรจุสารตัวอย่างเข้าเป็นขั้วลบและด้านปลายออกหรือด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก เพื่อให้สารที่มีประจุลบมาก (μ สูง) เคลื่อนที่ไปยังด้านเครื่องตรวจวัดที่เป็นขั้วบวกได้ แต่อาจใช้เวลาในการแยกสารนานเนื่องจาก EOF ยังมีทิศทางการเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบซึ่งสวนทางกับสารที่เป็นไอออนลบ ดังนั้นจึงต้องกลับทิศของ EOF (reversed EOF) โดยเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดแคทไอออนลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ดังนั้นสารตัวอย่างที่เป็นไอออนลบจึงสามารถเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดได้เร็วขึ้น โดยในการทดลองนี้เลือกใช้ เตตระเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (tetradecyltrimethylammonium bromide, TTAB) ที่ความเข้มข้น 0.5 mM ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้ในการกลับทิศของ EOF เนื่องจากมีราคาถูก

กรดออกซาลิก (oxalic acid, $C_2H_2O_4$) สามารถแตกตัวให้ประจุลบ มีค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) 2 ค่า คือ 1.23 และ 4.28 นั่นคือกรดออกซาลิกสามารถแตกตัวได้ 2 ครั้งและให้ประจุ 2 ลบ กรดซิทริก (citric acid, $C_6H_8O_7$) มีค่าคงที่การแตกตัว 3 ค่า คือ 3.13, 4.67 และ 6.40 นั่นคือ กรดซิทริกสามารถแตกตัวได้ 3 ครั้งและให้ประจุ 3 ลบ กรดมาลิก (malic acid, $C_4H_6O_5$) มีค่าคงที่การแตกตัว 2 ค่า คือ 3.40 และ 5.2 นั่นคือกรดมาลิกสามารถแตกตัวได้ 2 ครั้งและให้ประจุ 2 ลบ และกรดแอสคอร์บิก

(ascorbic acid, $C_6H_8O_6$) มีค่าคงที่การแตกตัว 2 ค่าคือ 4.17 และ 11.57 นั่นคือกรดแอสคอร์บิกสามารถแตกตัวได้ 2 ครั้งและให้ประจุ 2 ลบ แสดงดังตารางที่ 4.1 สำหรับปฏิกิริยาการแตกตัวของกรดอ่อน (HA) แสดงดังสมการที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงโครงสร้างของสารเมื่อแตกตัวเป็นประจุลบ

	โครงสร้าง	**ค่าคงที่การแตกตัว (p*K*$_a$)**		
		p*K*$_{a1}$	**p*K*$_{a2}$**	**p*K*$_{a3}$**
Oxalic acid		1.23	4.28	-
Citric acid		3.13	4.67	6.40
Malic acid		3.40	5.20	-
Ascorbic acid		4.17	11.57	-

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^- \quad (4.1)$$

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับขั้นการแตกตัว (degree of ionization, **α**) สามารถหาได้จากสมการที่ 4.2 จะเห็นว่าระดับขั้นการแตกตัวของสารมีความสัมพันธ์กับค่า pH และ pK_a ของสาร ดังแสดงในสมการที่ 4.3 กล่าวคือที่ pH เท่ากับ pK_a ดีกรีการแตกตัวจะเท่ากับ 0.5 หรือสารสามารถแตกตัวได้ 50% เท่านั้น แต่หากต้องการให้สารแตกตัวได้เกือบ 100% จะต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH มากกว่า pK_a ของสารอย่างน้อย 2 หน่วย จึงจะทำให้สารเกิดการแตกตัวได้เกือบ 100% และในการศึกษานี้ได้เลือกบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟตสำหรับการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต เนื่องจากบอเรตมีค่า pK_a 3 ค่า

คือ 9.14 12.74 และ13.80 และฟอสเฟตมีค่า pK_a 3 ค่าคือ 2.12 7.21 และ 12.32 จึงสามารถใช้เป็นบัฟเฟอร์ได้ทั้งในช่วงที่เป็นกรด กลาง และเบส โดยบอเรตและฟอสเฟตมีค่า pK_a ที่เหมาะสำหรับการแยกสารเนื่องจากครอบคลุมค่า pK_a ของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ต้องการวิเคราะห์ สำหรับการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลต มาเลต ซิเทรต และแอสคอร์เบตด้วยเทคนิค CE ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-]+[HA]} \quad (4.2)$$

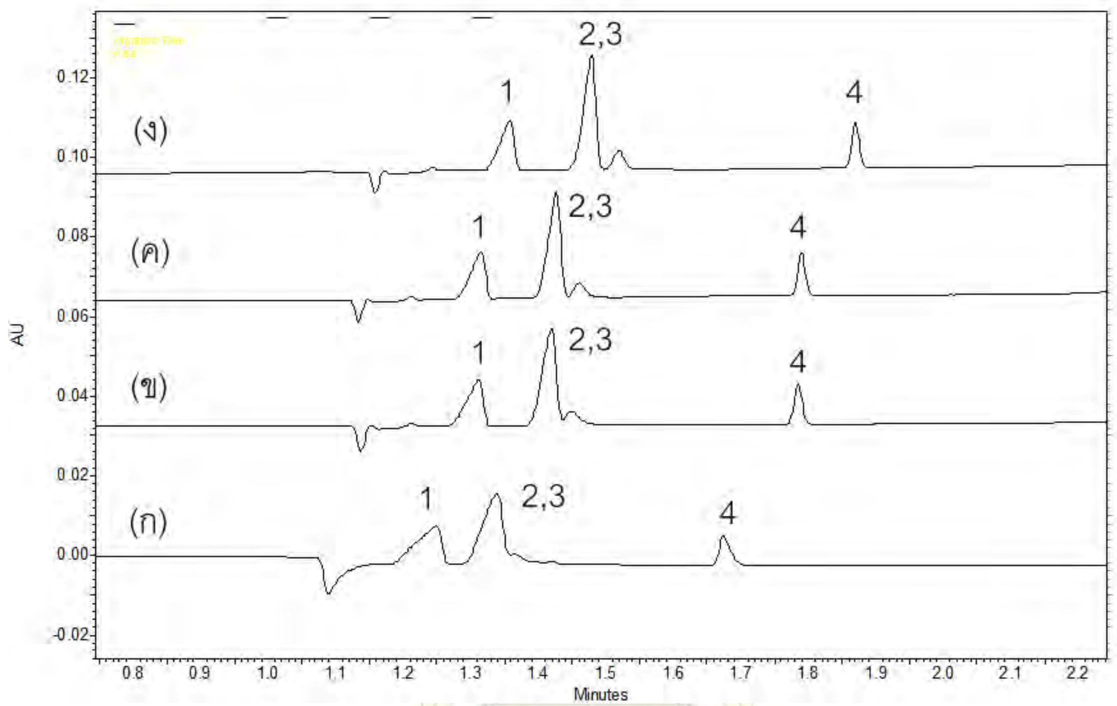
$$\alpha = \frac{1}{1+10^{(pKa-pH)}} \quad (4.3)$$

4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตด้วยเทคนิค CE

4.1.1 ผลของชนิดและพีเอชของบัฟเฟอร์

4.1.1.1 บอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer)

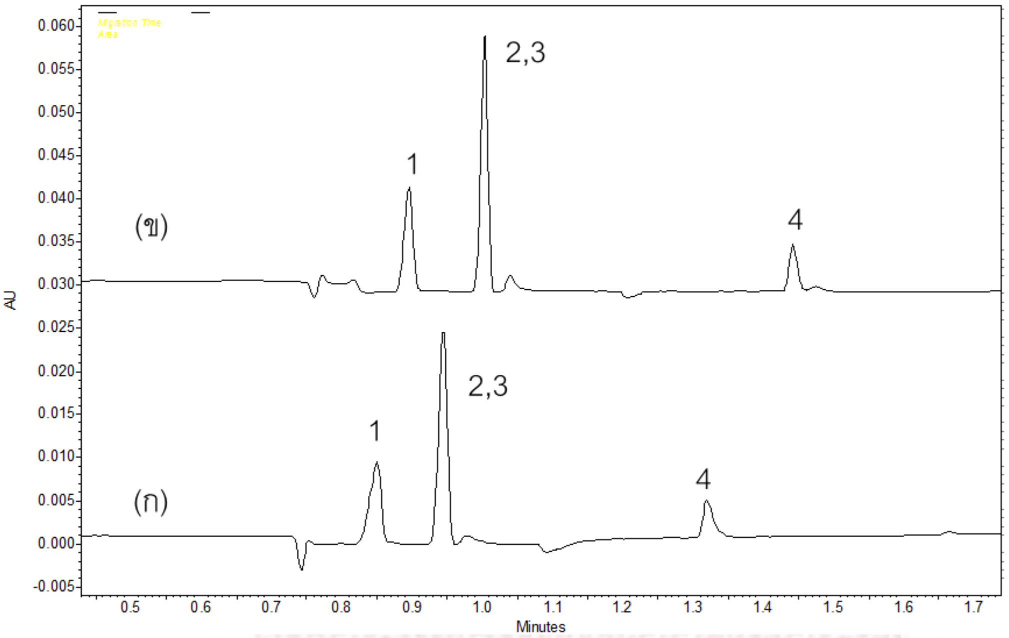
เนื่องจากบอเรตบัฟเฟอร์มีค่า pK_a เท่ากับ 9.14 จึงสามารถใช้ได้ในช่วง pH 8.0-10.0 ซึ่งจะทำให้กรดออกซาลิก ซิทริก มาลิก และแอสคอร์บิก แตกตัวให้เป็นไอออนลบ บอเรตเป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้เมื่อต้องการ pH ในช่วงที่เป็นเบส เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่ายโดยการชั่งโซเดียมเตตระบอเรตเดคะไฮเดรต ($Na_2B_4O_7{\cdot}10H_2O$) นำมาละลายน้ำ จะได้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่มี pH ประมาณ 9.2 โดยไม่ต้องปรับ pH จากนั้นเติม TTAB ความเข้มข้น 0.5 mM เพื่อลองแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.2 ซึ่งจะเห็นว่าซิเทรตและมาเลตไม่สามารถแยกออกจากกันได้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จะทำให้มีไอออนในสารละลายมากและเคาน์เตอร์ไอออนจากบัฟเฟอร์อาจล้อมรอบสารตัวอย่าง ทำให้สารมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้ค่า μ ของสารลดลงจึงเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง แต่จะเห็นว่าสารใช้เวลา (ไม่ถึง 2 นาที) ในการเคลื่อนที่ออกมาเร็วมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก pH ของบอเรตบัฟเฟอร์มีค่าสูง ทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนลบได้ดี ส่งผลให้มีค่า μ สูง จึงเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วจนทำให้พีคซิเทรตและมาเลตไม่สามารถแยกออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จะทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาช้าลง แต่ในกรณีนี้พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์มากกว่า 100 mM จะทำให้ให้กระแสไฟฟ้าที่ได้มีค่าสูง (ใกล้ 200 μA) ซึ่งจะเสี่ยงต่อการหยุดทำงานของเครื่อง CE



รูปที่ 4.2 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตความเข้มข้น 100 mg/L โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น (ก) 20 (ข) 60 (ค) 80 และ (ง) 100 mM พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต ภาวะของ CE ที่ใช้คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 µm ยาว 60.2 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ศักย์ไฟฟ้า -20 kV บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 195 nm

4.1.1.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการแยกด้วยเทคนิค CE ในช่วง pH 6.2-8.2 เนื่องจากฟอสเฟตมี pK_a ค่าหนึ่งที่ 7.22 นอกจากนี้ฟอสเฟตยังช่วยป้องกันการเกิดอันตรกิริยาของสารกับผนังคะพิลลารีได้ ทำให้สารเกิดการแยกได้ดีขึ้น ในการทดลองนี้จึงศึกษาความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์โดยปรับความเข้มข้นเป็น 20 และ 60 mM ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 ซึ่งซิเทรตและมาเลตไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะเห็นว่าสารเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง อาจเป็นผลมาจากค่าความแรงไอออนิกในสารละลายที่มีค่ามากขึ้น ทำให้สารตัวอย่างมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากไอออนที่มาล้อมรอบมีจำนวนมากขึ้น สารจึงมีค่า μ ลดลง อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์สูงกว่า 100 mM จะทำให้กระแสไฟฟ้ามีค่าสูงเกิน 200 μA นั่นคือ การใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ยังไม่สามารถแยกพีคของซิเทรตและมาเลตได้

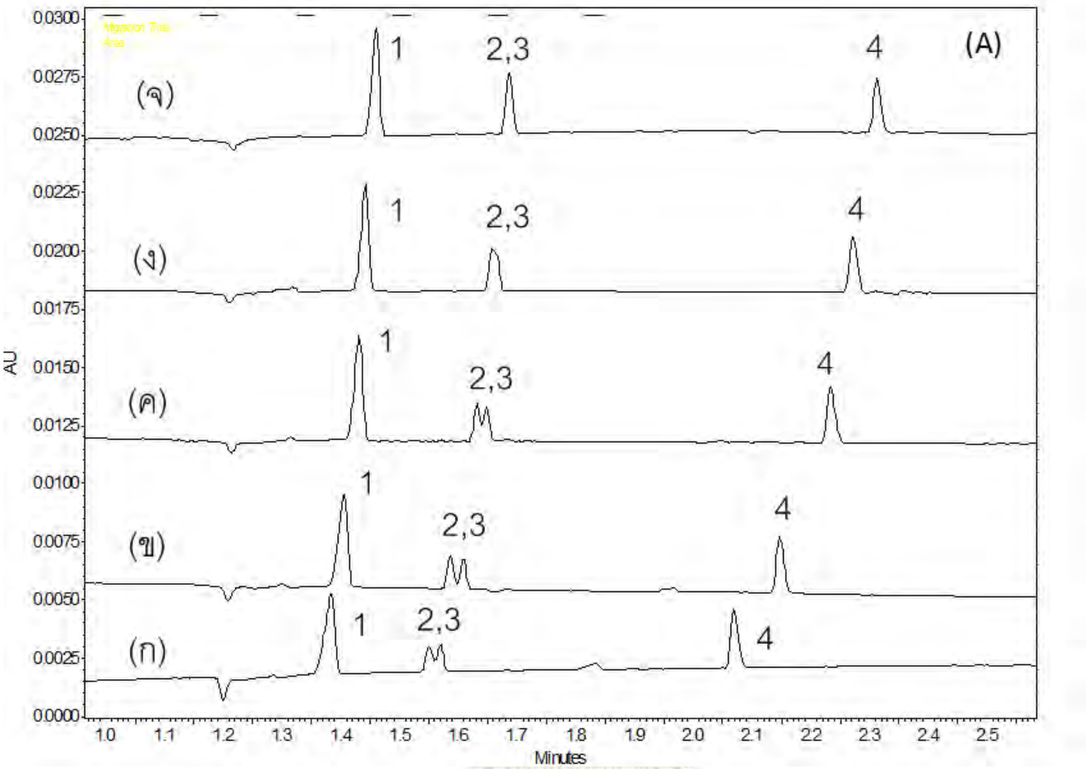


รูปที่ 4.3 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เป็นสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 mg/L โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น (ก) 20 และ (ข) 60 mM พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 4.2

4.1.1.3 บัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตและฟอสเฟต

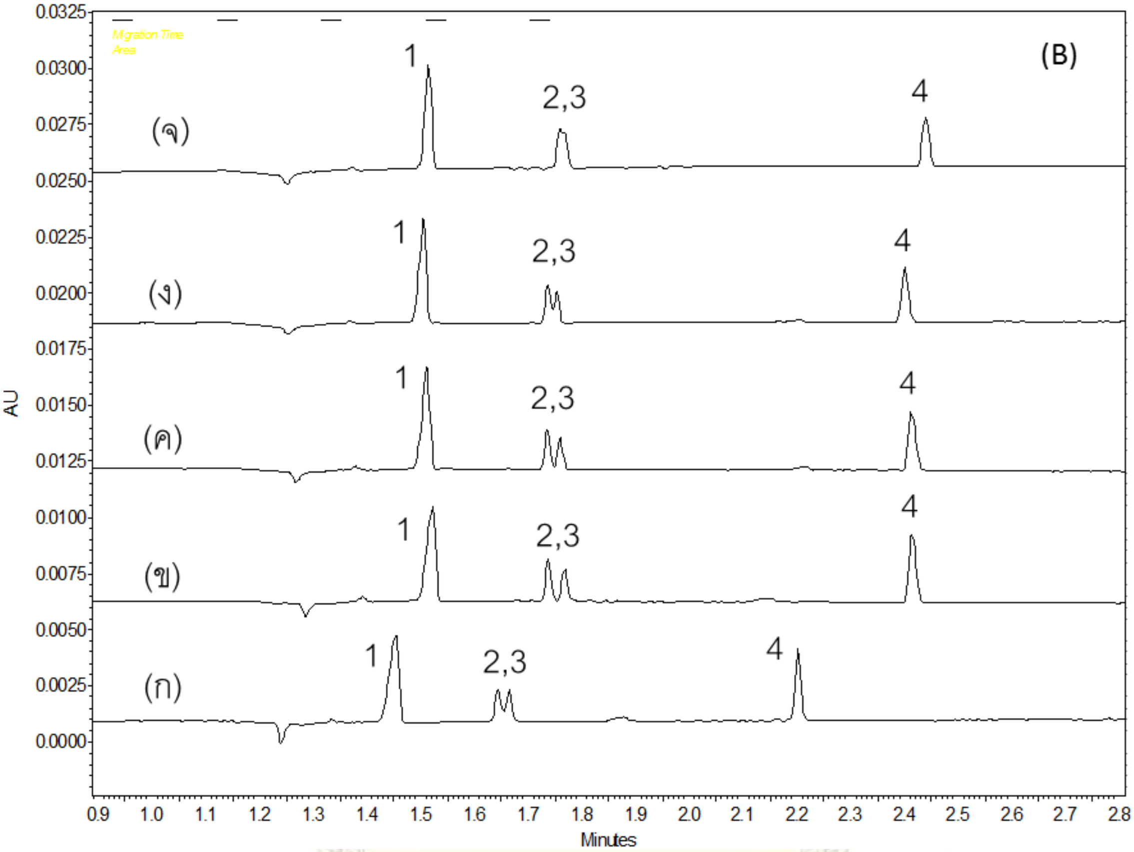
เนื่องจากบัฟเฟอร์เพียงชนิดเดียวยังไม่สามารถแยกซิเทรตและมาเลตได้ ดังนั้นจึงได้ทดลองใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟต เนื่องจากบัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดมีค่า pK_a ครอบคลุม pK_a ของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟตที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลต ซิเทรต กรดมาเลต และแอสคอร์เบต โดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้นรวมของบัฟฟเฟอร์ผสมที่ 20-120 mM ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 (ก) และ 4.4(ข) จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมทำให้สารเคลื่อนที่มายังเครื่องตรวจวัดได้ช้าลง เนื่องจากค่าความแรงไอออนิกในสารละลายที่มีค่ามากขึ้น ทำให้สารตัวอย่างมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากไอออนที่มาล้อมรอบมีจำนวนมากขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารลดลง จากรูปที่ 4.4(ก) พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตความเข้มข้น 20 mM โดยปรับความเข้มข้นของฟอสเฟตเป็น 20 40 60 80 และ 100 mM พบว่ายังไม่สามารถแยกพีคของซิเทรตและมาเลตออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ จากรูปที่ 4.4(ข) เมื่อใช้บอเรตความเข้มข้น 30 mM และปรับความเข้มข้นของฟอสเฟตเป็น 20 40 60 80 และ 100 mM พบว่าบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตความเข้มข้น 30 mM กับฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM สามารถแยกพีคของซิเทรตและมาเลตออกจากกันได้แต่ยังไม่ดีนัก โดยให้ค่าการแยก (R_s) เท่ากับ 0.87 (R_s น้อยกว่า 1.5)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 (A) อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟตต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ที่เป็นสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 mg/L โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตความเข้มข้น 20 mM กับฟอสเฟตที่ปรับความเข้มข้น (ก) 20 (ข) 40 (ค) 60 (ง) 80 และ (จ) 100 mM พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 4.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

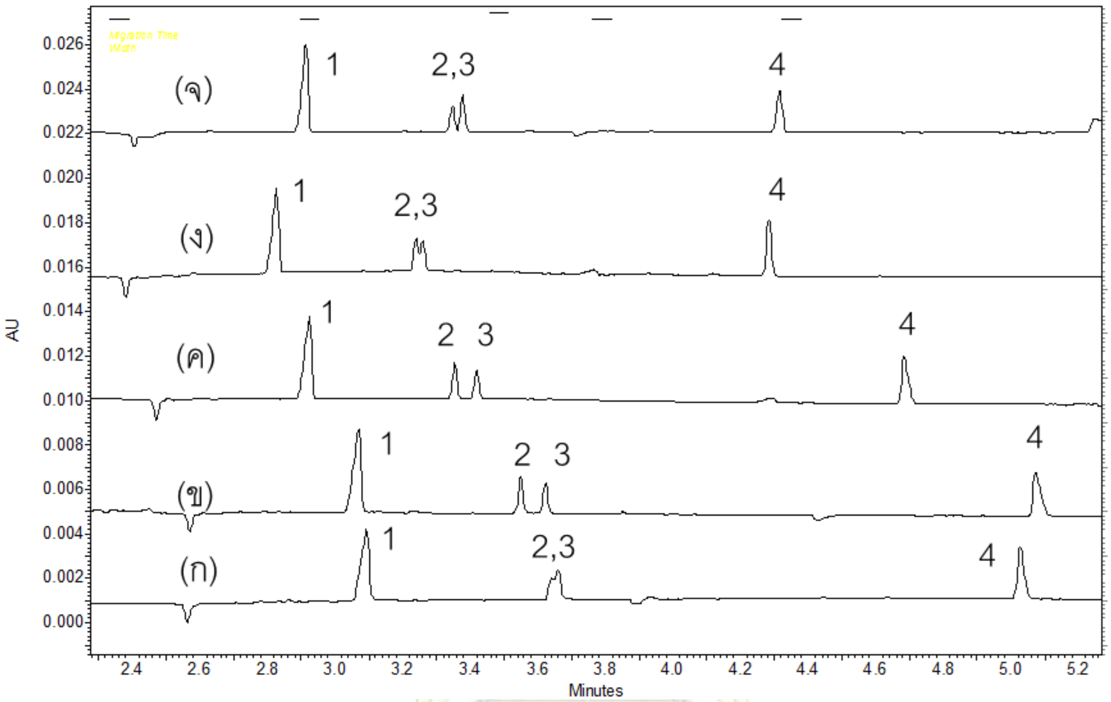


รูปที่ 4.4 (B) อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟตต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เป็นสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 mg/L โดยใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตเข้มข้น 30 mM กับฟอสเฟตที่ปรับความเข้มข้นเป็น (ก) 20 (ข) 40 (ค) 60 (ง) 80 และ (จ) 100 mM พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 4.2

4.1.2 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟต

เนื่องจากในการทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์สารที่เป็นประจุลบ ซึ่งบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ในการทดลองนี้คือบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟตที่ความเข้มข้นของบอเรตเท่ากับ 30 mM ผสมกับฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM เนื่องจากสามารถแยกพีคของซิเทรตกับมาเลตออกจากกันได้แต่ยังไม่ดีนัก โดยให้ค่าการแยก (R_s) เท่ากับ 0.87 จึงต้องทำการศึกษา pH ของบัฟเฟอร์ โดยศึกษาค่า pH ดังนี้คือ pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 ซึ่งเป็นช่วงที่ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตแตกตัวได้เกือบ 100% ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.5 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มค่า pH ของบัฟเฟอร์ จะทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น เนื่องจากค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่สูงจะส่งผลให้สารที่เป็นกรดอ่อนมีดีกรีการแตกตัวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารมีค่าเพิ่มขึ้นสารจึงเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟตที่ pH 7 โดยสามารถแยกพีคของซิเทรตและมาเลตออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์และให้ค่าการแยกเท่ากับ 2.58

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



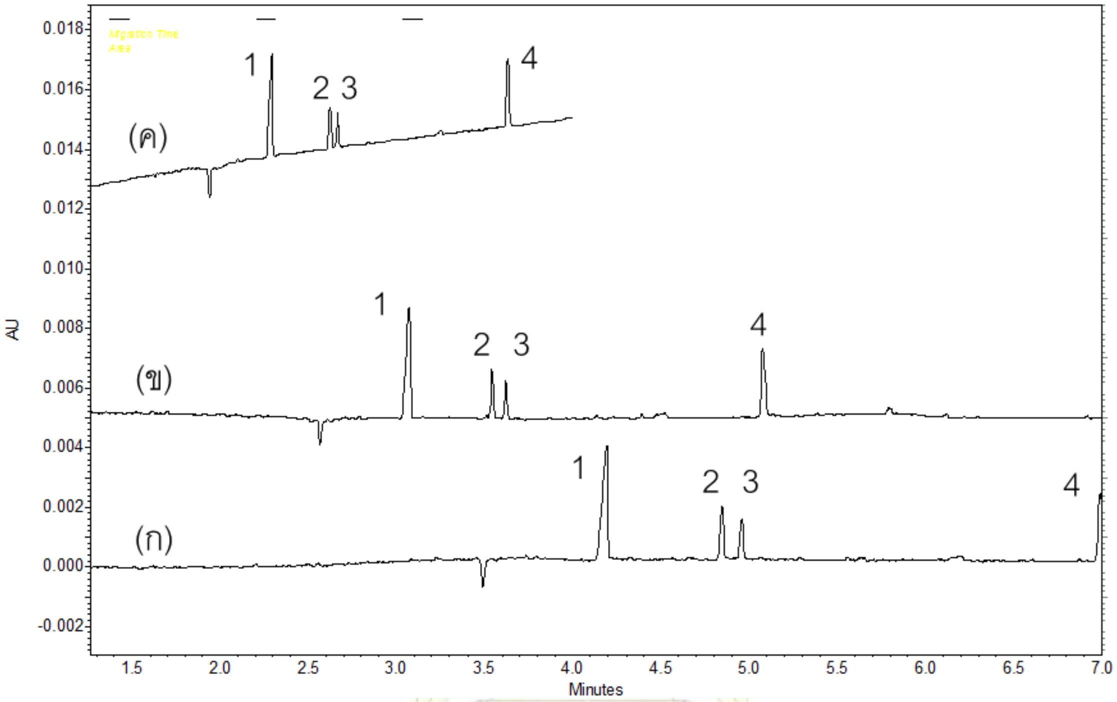
รูปที่ 4.5 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ผสมของบอเรตความเข้มข้น 30 mM และฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เป็นสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 mg/L โดยปรับพีเอชของบัฟเฟอร์ผสมเป็น (ก) pH 6.0 และ (ข) pH 7.0 (ค) pH 8.0 (ง) pH 9.0 และ (จ) pH 10.0 พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูปที่ 4.2

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้า

หลังจากได้ความเข้มข้น และ pH ของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตกับฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตแล้ว ต่อมาได้ศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกเพื่อให้ค่าการแยกที่ดีที่สุดของสารทั้งสี่ชนิด โดยปรับค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เป็น -15, -20 และ -25 kV ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.6 จะเห็นว่าเมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้สูงขึ้นทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น เนื่องจากการเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้านั้นทำให้เกิดความเข้มของสนามไฟฟ้า (*E*) ที่มากขึ้นและส่งผลให้ไอออนของสารเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจวัดได้เร็วขึ้น โดยพบว่าเมื่อใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าเป็น -15 kV พีคของซิเทรตและมาเลต จะแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์โดยมีค่าการแยกเท่ากับ 3.45 แต่เวลาที่สารเคลื่อนที่ออกมาจะช้า ในขณะที่เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าเป็น -25 kV พีคของซิเทรตและมาเลตแยกออกจากกันได้ไม่ดีนักโดยมีค่าการแยกเท่ากับ 1.39 ดังนั้นจึงเลือกใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ -20 kV เนื่องจากพีคของซิเทรตและมาเลตสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีค่าการแยกเท่ากับ 2.63 ทั้งสารยังใช้เวลาในการเคลื่อนที่ออกมาเร็วกว่าการใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ -15 kV

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

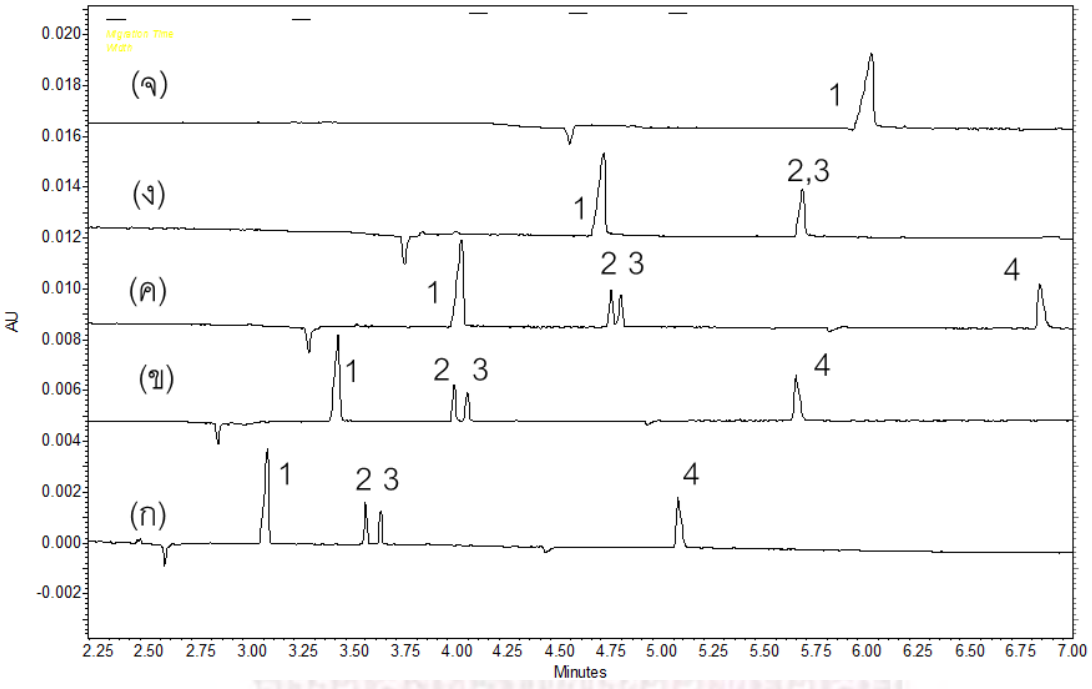


รูปที่ 4.6 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เป็นสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 mg/L โดยปรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น (ก) -15 kV (ข) -20 kV และ (ค) -25 kV พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูป 4.2

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

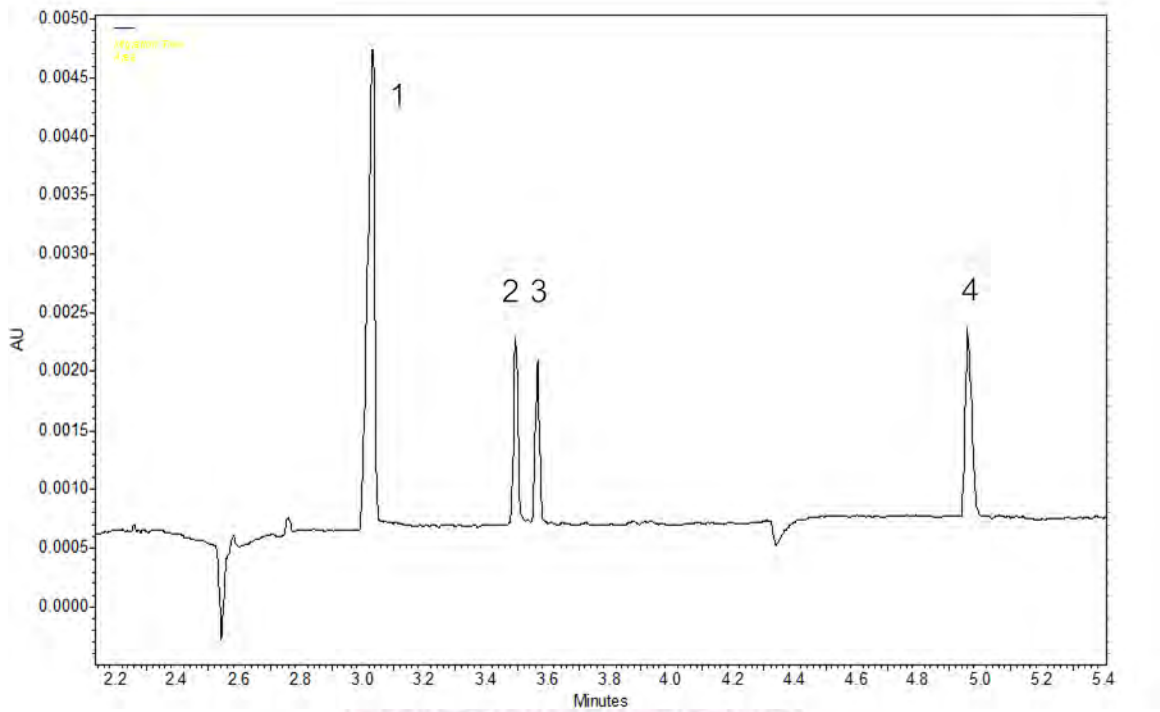
4.1.4 ผลของการเติมตัวทำละลายอินทรีย์

เพื่อให้ได้ภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต จึงทำการศึกษาผลของการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเติมสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเมทานอลสารจะเคลื่อนที่ออกมาช้าลง เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะทำให้สารละลายบัฟเฟอร์มีความหนืดมากขึ้น ทั้งยังทำให้สารที่เป็นกรดอ่อนแตกตัวได้น้อยลง ส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารลดลง สารจึงเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง โดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงในสารละลายบัฟเฟอร์นั้นไม่ช่วยให้ค่าการแยกของพีคซิเทรตและมาเลตดีขึ้น



รูปที่ 4.7 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงผลของการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความสามารถในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เป็นสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 mg/L โดยเติมเมทานอลและปรับความเข้มข้นเป็น (ก) ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ (ข) 5% (ค) 10% (ง) 15% และ (จ) 20% พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูป 4.2

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลต มาเลต ซิเทรต และแอสคอร์เบตด้วยเทคนิค CE พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่าการแยกที่ดีที่สุดคือ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตความเข้มข้น 30 mM และฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM ที่ pH 7 และใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าในการแยกสารเท่ากับ -20 kV ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งพบว่าภายใต้ภาวะนี้พีคของซิเทรตและมาเลตสามารถแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ที่สุด โดยให้ค่าการแยกของพีคซิเทรตและมาเลตเท่ากับ 2.63 และใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 5 นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้ภาวะนี้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในตัวอย่างชาพร้อมดื่ม



รูปที่ 4.8 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่เป็นสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 mg/L โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตความเข้มข้น 30 mM และฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM ปรับ pH ของบัฟเฟอร์ผสมเป็น 7.0 และใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าในการแยกสารเท่ากับ -20 kV พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของ CE แสดงในรูป 4.2

4.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

จากการทดลองในหัวข้อ 4.1 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ได้แก่ บอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 30 mM ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 mM pH 7.0 และ TTAB ความเข้มข้น 0.5 mM ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เท่ากับ -20 kV จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่เลือก โดยหาค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.2.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (Limit of detection, LOD and limit of Quantitation, LOQ)

ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น และวัดอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) จนกระทั่งได้ค่าสัญญาณใกล้เคียง 3 สำหรับ LOD และ 10 สำหรับ LOQ และคำนวนค่า LOD และ LOQ ตามสมการที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1

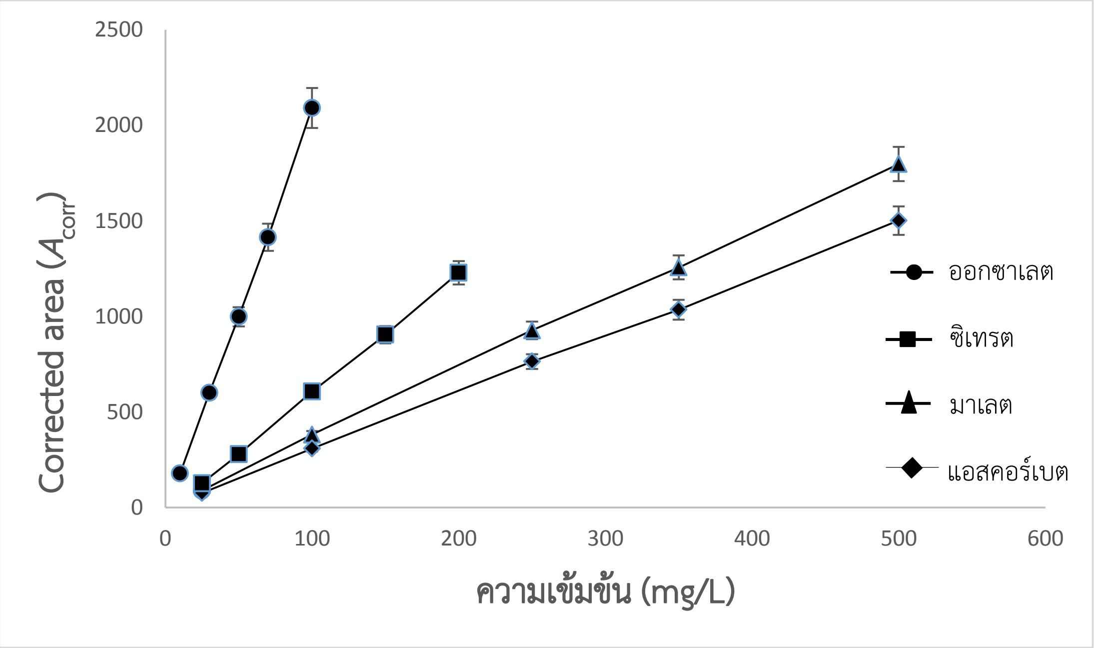
ตารางที่ 4.2 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ

สารมาตรฐาน	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
ออกซาเลต	3	10
ซิเทรต	5	8
มาเลต	10	25
แอสคอร์เบต	15	20

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 กราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve)

ก่อนการวิเคราะห์ ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในแต่ละวัน จะทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 3.2 และ3.3 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้นโดยทำการวิเคราะห์ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคปรับค่า (corrected area, A_{corr}) และนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคแก้ไข จะได้ดังรูปที่ 4.9 ซึ่งสามารถหาค่าสมการเส้นตรงได้ดังตารางที่ 4.2 จากการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง A_{corr} และความเข้มข้นของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต มีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงสูง จะเห็นได้ว่าค่า R^2 ของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต มีค่า 0.9994, 0.9996, 0.9997 และ 0.9998 ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 กราฟเทียบมาตรฐานของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในสารตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค CE ภาวะที่ใช้คือสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ประกอบด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 30 mM ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 mM และเตตระเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 mM ที่ pH 7 ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า -20 kV ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บรรจุด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 195 nm

ตารางที่ 4.3 สมการเชิงเส้นตรงของกราฟสอบเทียบของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต

กราฟสอบเทียบ	ช่วงความเข้มข้น (mg/L)	สมการเชิงเส้นตรง		
		ความชัน	จุดตัดแกน y	R^2
ออกซาเลต	10-100	21.126	42.068	0.9994
ซิเทรต	25-500	3.5721	-14.905	0.9996
มาเลต	25-500	2.9821	-6.4151	0.9997
แอสคอร์เบต	25-500	6.2857	30.896	0.9998

4.2.3 ความเที่ยง (Precision)

การหาความเที่ยงของการทดลองทำได้โดยเตรียมสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ที่ความเข้มข้นดังตารางที่ 3.4 ในเมทริกซ์ที่เป็นน้ำ (วิธีการเตรียมแสดงในหัวข้อ 3.5.3) จากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง เพื่อหาความเที่ยงในวันเดียวกัน (intraday) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่า %RSD ของไมเกรชั่นไทม์ของสารมาตฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต มีค่าน้อยกว่า 1% ซึ่งถือว่ามีความเที่ยงสูงมาก ส่วนพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) มี %RSD ของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่มีความเข้มข้นสูงจะมีค่าต่ำกว่า 5% ซึ่งมีความเที่ยงสูง แต่ที่ความเข้มข้นต่ำมี %RSD อยู่ในช่วง 2.3 - 7.53% ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้สำหรับความเข้มข้น 20 และ 30 mg/L (13) (ตามเกณฑ์ %RSD 8–11.3% ที่ความเข้มข้น 10-100 mg/L) ยกเว้นแอสคอร์เบตมี %RSD เท่ากับ 15.58% เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำแอสคอร์เบตสลายตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับแสงและความร้อน จึงทำให้ความเที่ยงต่ำลง ดังนั้นในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องเตรียมสารและทำการทดลองในทันที และในตารางที่ 4.4 แสดงถึงการทดสอบความเที่ยงระหว่างวันโดยทำการวิเคราะห์ติดกัน 3 พบว่า %RSD ของไมเกรชั่นไทม์ของสารมาตฐานทุกชนิดมีค่าน้อยกว่า 5% ซึ่งถือว่ามีความเที่ยงระหว่างวันสูง และพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต และมาเลต มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.59-8.11 (13) ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ และแอสคอร์เบต มีค่า %RSD 13.58 - 18.22

ซึ่งมีความเที่ยงต่ำ เนื่องจากแอสคอร์เบตสามารถสลายตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับแสงและความร้อน เมื่อทำการวิเคราะห์แอสคอร์เบตจะได้รับความร้อนเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ทำให้การวิเคราะห์แต่ละครั้งมีความเข้มข้นลดลง ทำให้ความเที่ยงต่ำลง ดังนั้นในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องเตรียมสารและทำการทดลองในทันที

ตารางที่ 4.4 ความเที่ยงของไมเกรชั่นไทม์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (จำนวนการวิเคราะห์ n = 10)

สารมาตรฐาน	**ความเข้มข้น (mg/L)**	**t_m หรือ A_{corr}**	**%RSD (mean ± SD)**		
			วันที่ 1	**วันที่ 2**	**วันที่ 3**
ออกซาเลต	20	t_m	0.1 (2.990 ± 0.003)	0.2 (3.056 ± 0.005)	0.2 (3.054 ± 0.007)
		A_{corr}	2 (349 ± 8)	6 (335 ± 19)	7 (333 ± 22)
	90	t_m	0.1 (2.993 ± 0.003)	0.1 (3.075 ± 0.003)	0.2 (3.062 ± 0.007)
		A_{corr}	2 (1880 ± 40)	2 (1655 ± 30)	3 (1685 ± 56)
ซิเทรต	30	t_m	0.1 (3.469 ± 0.004)	0.2 (3.579 ± 0.007)	0.3 (3.567 ± 0.093)
		A_{corr}	5 (100 ± 5)	6 (115 ± 7)	5 (114 ± 6)
	180	t_m	0.1 (3.452 ± 0.003)	0.1 (3.578 ± 0.004)	0.2 (3.556 ± 0.007)
		A_{corr}	4 (776 ± 27)	2 (756± 13)	3 (651 ± 18)

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความเที่ยงของไมเกรชั่นไทม์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (จำนวนการวิเคราะห์ n = 10)

สารมาตรฐาน	**ความเข้มข้น (mg/L)**	**t_m หรือ A_{corr}**	**%RSD (mean ± SD)**		
			วันที่ 1	**วันที่ 2**	**วันที่ 3**
มาเลต	30	t_m	0.1 (3.535 ± 0.005)	0.2 (3.657 ± 0.006)	1.3 (3.637 ± 0.048)
		A_{corr}	4 (93 ± 3)	5 (91 ± 5)	8 (89 ± 7)
	180	t_m	0.1 (3.523 ± 0.003)	0.1 (3.666 ± 0.005)	0.2 (3.643 ± 0.078)
		A_{corr}	4 (668 ± 24)	2 (579 ± 9)	3 (566 ± 14)
แอสคอร์เบต	30	t_m	0.4 (5.839 ± 0.021)	0.3 (5.322 ± 0.017)	0.4 (5.230 ± 0.019)
		A_{corr}	9 (111 ± 1811)	16 (146 ± 23)	9 (113 ± 10)
	180	t_m	0.1 (4.907 ± 0.003)	0.2 (5.289 ± 0.009)	0.2 (5.237 ± 0.012)
		A_{corr}	4 (1,085± 40)	3 (1,119± 31)	4 (826 ± 33)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ความเที่ยงของไมเกรชั่นไทม์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐาน ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการวิเคราะห์ติดกัน 3 วัน (*n* = 3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (mg/L)	%RSD ของ t_m (mean ± SD)	%RSD ของ A_{corr} (mean ± SD)
ออกซาเลต	30	1.0 (3.034 ± 0.031)	5 (339 ± 18)
	90	1.2 (3.043 ± 0.037)	6 (1740 ± 110)
ซิเทรต	30	1.3 (3.536 ± 0.047)	2 (4 ± 0)
	180	1.6 (3.528 ± 0.056)	8 (728 ± 59)
มาเลต	30	1.7 (3.611 ± 0.061)	6 (91 ± 5)
	180	1.8 (3.611 ± 0.064)	8 (604 ±49)
แอสคอร์เบต	30	4.6 (5.482 ± 0.251)	18 (124± 23)
	180	3.4 (5.144 ± 0.172)	14 (1010 ± 137)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.4 ความแม่น (Accuracy)

การหาความแม่นสามารถหาได้จากการทดลองตอนที่ 3.5.4 โดยทำการวิเคราะห์สารมาตรฐาน ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่ความเข้มข้น 25 mg/L ที่เติมลงในชาพร้อมดื่มตัวอย่างด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้น ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง และนำค่า A_{corr} ที่ได้มาคำนวนมาหาปริมาณ ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 4.9 และคำนวนหาร้อยละการกลับคืน (%recovery) โดยใช้สมการที่ 3.3 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่า ชาพร้อมดื่ม Ichiton (Oolong) มีร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐาน ออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตเท่ากับ 72.49%, 102.21%, 91.60% และ 58.19% ตามลำดับ ซึ่งร้อยละการกลับคืนของซิเทรตและมาเลตเป็นช่วงที่ยอมรับได้ (13) (อยู่ในช่วง 80-110%) แต่สำหรับออกซาเลตและแอสคอร์เบตมีค่าร้อยละการกลับคืนต่ำ เนื่องจากออกซาเลตและแอสคอร์เบตสามารถสลายตัวได้เมื่อสัมผัสกับแสงแดดและความร้อน ส่วนชาพร้อมดื่ม Tesco (No sugar) มีร้อยละการกลับคืนของออกซาเลตคือ 67.97% โดยออกซาเลตมีร้อยละการกลับคืนต่ำ อาจเนื่องมาจากการสลายตัว ส่วนซิเทรตมีค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 113.03 % ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ยอมรับ สำหรับแอสคอร์เบตมีค่าร้อยละการกลับคืน 83.31 % เป็นช่วงที่ยอมรับได้ โดยภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ออกจากกันได้สมบูรณ์

ตารางที่ 4.6 ความแม่นของการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่เติมลงในชาพร้อมดื่มตัวอย่าง (วิเคราะห์ซ้ำ n = 10)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	%Recovery (±SD)	
		ชาตัวอย่าง Ichiton (Oolong)	ชาตัวอย่าง Tesco (No sugar)
ออกซาเลต	25	72.49 ± 7.48	67.97 ± 7.91%
ซิเทรต	25	102.21 ± 13.21	113.03 ± 26.80
มาเลต	25	91.60 ± 8.54	-
แอสคอร์เบต	25	58.19 ± 13.39	83.31 ± 18.08

4.3 การวิเคราะห์สารตัวอย่างชาพร้อมดื่ม

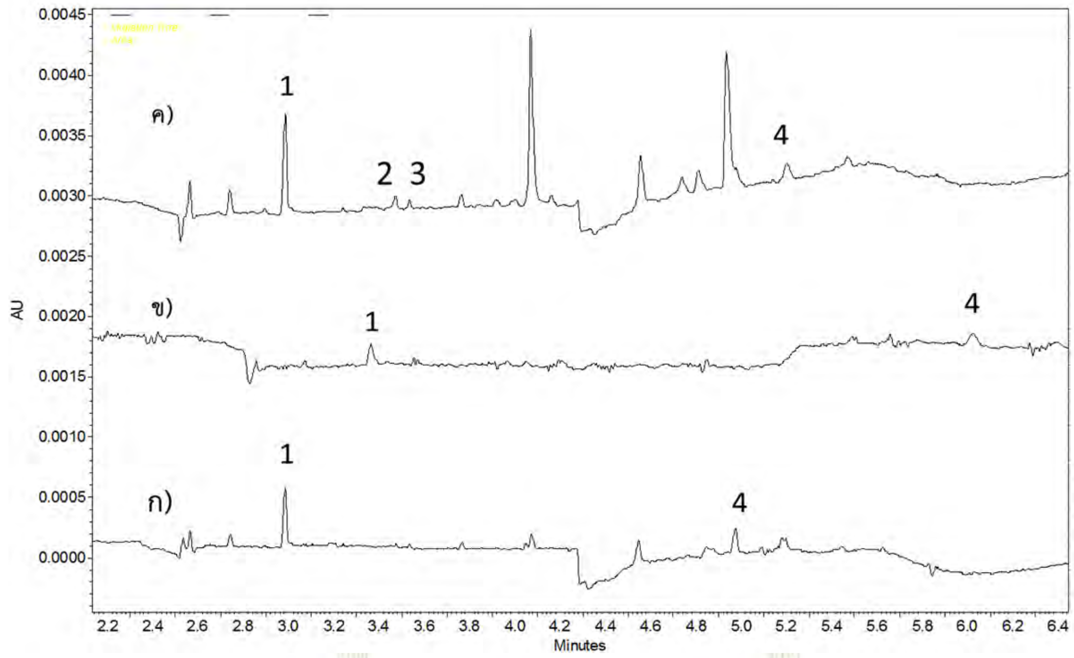
นำภาวะการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มตัวอย่างด้วยเทคนิค CE และหาค่า A_{corr} จากพีคของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มตัวอย่าง โดยนำค่า A_{corr} ที่ได้ไปแทนในสมการของกราฟเทียบมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.6 โดยสามารถยืนยันชนิดของสารได้โดยพิจารณาจากค่าไมเกรชั่นไทม์ และการใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานลงไปในสารตัวอย่าง (spiking technique) รูปที่ 4.10 แสดงอิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตของชาพร้อมดื่มตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นของชาพร้อมดื่มชนิดต่าง ๆ

ชาพร้อมดื่มตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่วัดได้ (mg/L) (±SD)			
	ออกซาเลต	ซิเทรต	มาเลต	แอสคอร์เบต
Ichiton (Oolong)	27.06 (± 0.25)	14.66 (± 0.89)	N/A	62.41 (±0.23)
Tesco (No Sugar)	18.79 (± 0.22)	250.52 (± 1.65)	-	23.37 (± 0.41)
Fuji (Tasty)	41.40 (± 0.42)	4.53 (± 0.28)	N/A	463.82 (± 4.92)
Puriku (Chrysanthemum)	6.70 (± 0.09)	N/A	N/A	25.21 (± 1.00)
Lipton (Ice Green Tea)	14.96 (± 0.38)	673.99 (± 5.82)	-	62.58 (± 0.50)
Pokka (No Sugar)	23.77 (± 0.28)	-	-	51.60 (± 0.17)
Unift (Honey Lemon)	21.59 (± 0.29)	1,283.78 (± 16.71)	-	34.60 (± 0.17)
Tea Plus (Oolong)	26.97 (± 1.41)	N/A	N/A	126.39 (± 1.94)
Manobu (Original)	11.72 (± 2.73)	-	-	26.39 (± 0.38)

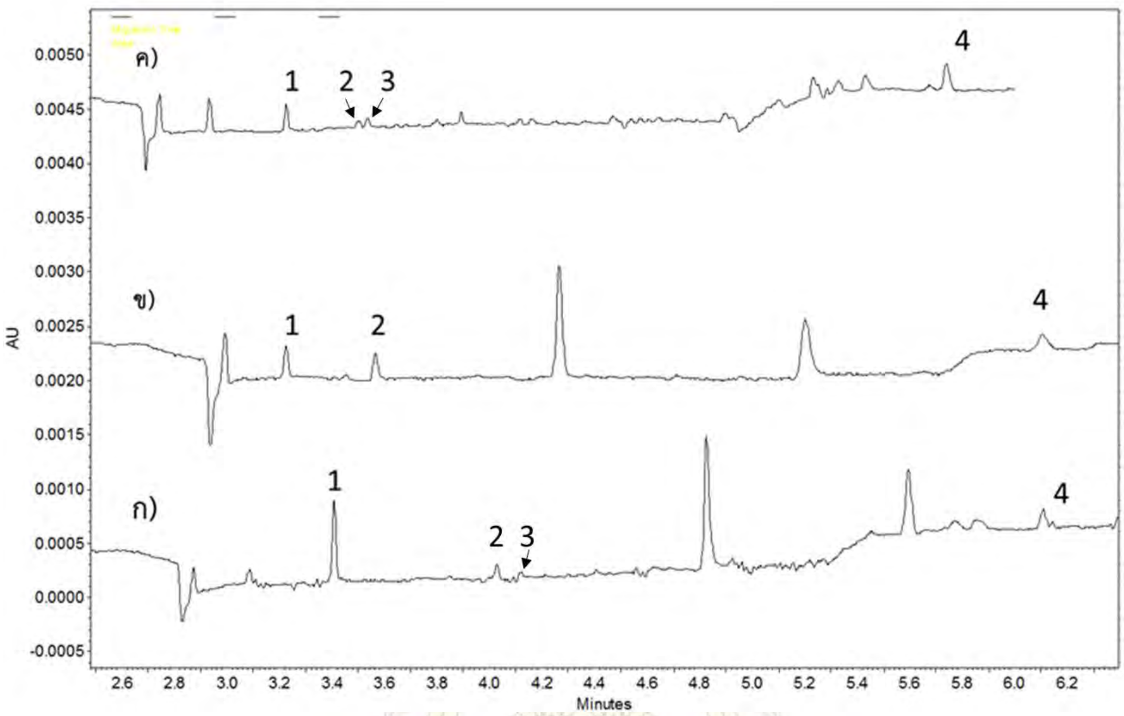
หมายเหตุ N/A มีอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก (< LOD)

จากการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มตัวอย่างด้วยเทคนิค CE ดังตารางที่ 4.6 พบว่ามีปริมาณออกซาเลตอยู่ในช่วง 6.70 - 41.40 mg/L ปริมาณซิเทรตอยู่ในช่วง 4.53 – 1,283.78 mg/L โดยปริมาณซิเทรตที่สูงมีอยู่ในชาพร้อมดื่มประเภทที่ผสมมะนาว เนื่องจากมะนาวประกอบด้วยซิเทรต มีปริมาณมาเลตน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ และมีปริมาณแอสคอร์เบตอยู่ในช่วง 23.37 – 463.82 mg/L โดยพบปริมาณแอสคอร์เบตสูงในชาพร้อมดื่มประเภทที่มีการเติมวิตามินซีเพื่อเพิ่มรสชาติ



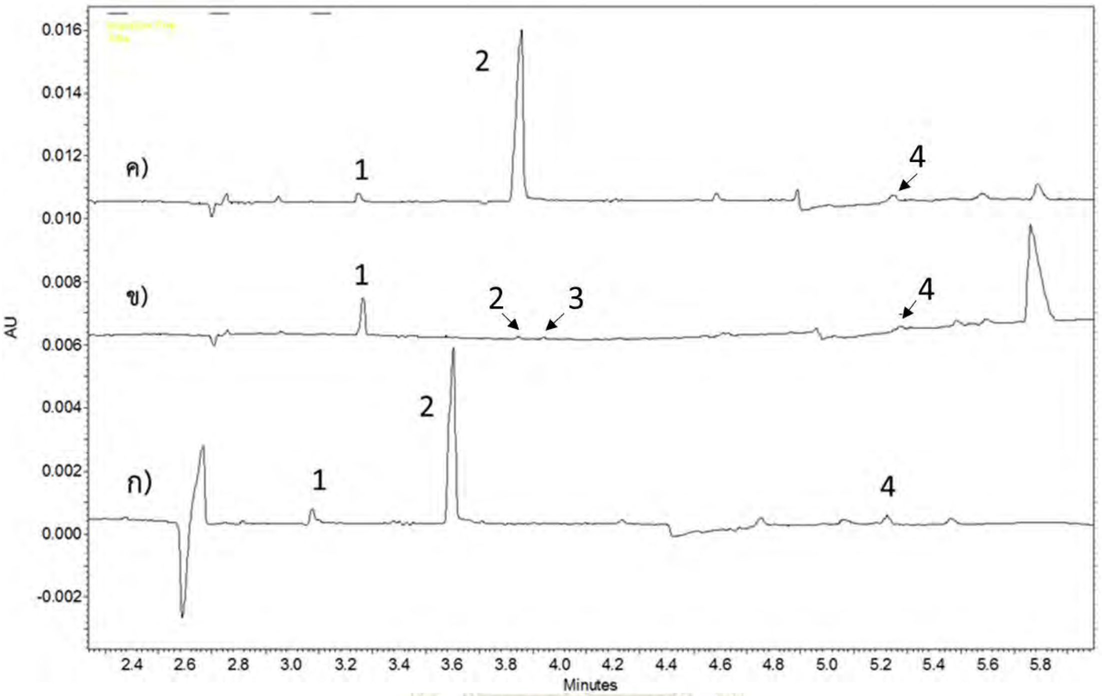
รูปที่ 4.10 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่มีอยู่ในชาพร้อมดื่มตัวอย่างโดย (ก) ชา Manobu (ข) ชา Pokka (ค) ชา Tea Plus พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในรูป 4.9

.



รูปที่ 4.11 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่มีอยู่ในชาพร้อมดื่มตัวอย่างโดย (ก) คือชา Ichiton (ข) คือชา Tesco (ค) คือชา Puriku พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในรูป 4.9

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 อิเล็กโทรเฟอโรแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตที่มีอยู่ในชาพร้อมดื่มตัวอย่างโดย (ก) คือชา Unift (ข) คือชา Fuji (ค) คือชา Lipton พีค 1 คือ ออกซาเลต พีค 2 คือ ซิเทรต พีค 3 คือ มาเลต และพีค 4 คือ แอสคอร์เบต สำหรับภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในรูป 4.9

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานทดลองนี้ได้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค CE สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่ม โดยเริ่มต้นจากการศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ซึ่งพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ BGE ที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ผสมของบอเรตความเข้มข้น 30 mM ผสมกับฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM และเติม TTAB ความเข้มข้น 0.5 mM ที่ pH 7.0 โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -20 kV และใช้ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 µm ความยาว 60.2 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่าง 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 195 nm จากการใช้ภาวะของ CE ดังกล่าวพบว่าอิเล็กโทรเฟอโรแกรมของพีคออกซาเลต ซิเตรต มาเลต และแอสคอร์เบตสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ กล่าวคือ มีค่าการแยก (R_s) สำหรับพีคซิเตรตและมาเลตเท่ากับ 2.63 และใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 5 นาที

จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือสำหรับออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตเท่ากับ 3, 5, 10 และ 15 mg/L ตามลำดับ และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องมือของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตเท่ากับ 10, 8, 25 และ 20 mg/L ตามลำดับ ผลการทดลองทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธีที่พัฒนาขึ้นภายในวันเดียวกัน (ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ) และระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน (ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ) ผลการทดสอบพบว่ามีค่าร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตมีค่า 72.49 ± 7.48% ซิเทรตมีค่า 102.21 ± 13.21 % มาเลตมีค่า 91.60 ± 8.54% และแอสคอร์เบตมีค่า 58.19 ± 13.39% สำหรับชาพร้อมดื่มตัวอย่างชนิดที่ 1 ซึ่งร้อยละการกลับคืนของซิเทรต และมาเลตเป็นช่วงที่ยอมรับได้ (13) (ช่วงที่ยอมรับได้ 80 - 110%) แต่สำหรับออกซาเลตและแอสคอร์เบต มีค่าร้อยละการกลับคืนต่ำ เนื่องจากออกซาเลตและแอสคอร์เบตสามารถสลายตัวได้เร็วเมื่อสัมผัสกับแสงแดดและความร้อน ส่วนชาพร้อมดื่มตัวอย่างชนิดที่ 2 มีร้อยละการกลับคืนของออกซาเลตคือ 67.97 ± 7.91% โดยออกซาเลตมีร้อยละการกลับคืนต่ำ อาจเนื่องมาจากการสลายตัวของออกซาเลต ส่วนซิเทรต มีค่าร้อยละการกลับคืน คือ 113.03 ± 26.80% ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ยอมรับได้และแอสคอร์เบตมีค่า 83.31 ± 18.08% เป็นช่วงที่ยอมรับได้

โดยภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถแยกออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต ออกจากกันได้สมบูรณ์ มี %RSD ภายในวันเดียวกันของไมเกรชั่นไทม์ของสารมาตรฐานออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต มีค่าน้อยกว่า 1% ซึ่งถือว่ามีความเที่ยงสูงมาก ส่วนพื้นที่ใต้พีคที่ปรับค่า (A_{corr}) มี %RSD ของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และ แอสคอร์เบตที่มีความเข้มข้นสูงจะมีค่าต่ำกว่า 5% ซึ่งมีความเที่ยงสูงมาก แต่ที่ความเข้มข้นต่ำมี %RSD อยู่ในช่วง 2.3-7.5% ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้สำหรับความเข้มข้น 20 และ 30 mg/L (ตามเกณฑ์ %RSD 8-11.3% ที่ความเข้มข้น 10-100 mg/L) โดยที่แอสคอร์เบตมี %RSD เท่ากับ 15.58% ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการสลายตัว จึงทำให้ความเที่ยงต่ำลง ดังนั้นในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องเตรียมสารและทำการทดลองในทันที และความเที่ยงระหว่างวันโดยทำการวิเคราะห์ติดกัน 3 วัน พบว่า %RSD ของไมเกรชั่นไทม์ของสารมาตฐานทุกชนิดมีค่าน้อยกว่า 5% ซึ่งถือว่ามีความเที่ยงระหว่างวันสูง สำหรับกราฟมาตรฐานของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9994, 0.9996, 0.9997 และ 0.9998 ตามลำดับ

จากนั้นนำภาวะที่เหมาะสมมาประยุกต์กับตัวอย่างชาพร้อมดื่มจริง การยืนยันอิเล็กโทรเฟอโรแกรมของพีคออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบต จะพิจารณาจากค่าไมเกรชันไทม์ร่วมกับการเติมสารละลายมาตรฐาน (spiking technique) พบว่าในชาพร้อมดื่มตัวอย่างชนิดต่าง ๆ มีปริมาณออกซาเลต ซิเทรต และแอสคอร์เบต อยู่ในช่วง 6.70-41.40 mg/L, 4.53-1,283.78 mg/L และ 23.37-463.82 mg/L ตามลำดับ โดยมาเลตมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้

จากงานวิจัยพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่หาได้ สามารถนำมาประยุกต์หาปริมาณออกซาเลต ซิเตรต มาเลต และแอสคอร์เบตในตัวอย่างชาพร้อมดื่มได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องตรวจวัดราคาแพง เช่น ฟลูออเรสเซนซ์ หรือแมสสเปกโทรมิเตอร์ แต่ปัญหาที่พบในการทดลองนี้คือสภาพไว (sensitivity) ของเทคนิค CE จึงทำให้มีปัญหาในการตรวจวัดโดยเฉพาะออกซาเลต และแอสคอร์บิก เนื่องจากสารทั้งสองสลายตัวได้ง่าย ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างจะช่วยปรับปรุงขีดจำกัดการตรวจวัด เพื่อช่วยให้การตรวจวัดสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่ต่ำทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ การพัฒนาวิธีเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในเทคนิค CE อาจทำได้โดยการใช้วิธีเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างภายในคอลัมน์ (on-line preconcentration) ก่อนที่จะทำการแยก

นอกจากนี้ยังพบว่าการหาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มตัวอย่างนั้นมีค่าไมเกรชั่นไทม์ของออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตเคลื่อนออกจากค่าไมเกรชั่นไทม์ที่วิเคราะห์จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 mg/L เนื่องจากในชาพร้อมดื่มนั้นมีการรบกวนจากเมทริกซ์อื่น ซึ่งอาจจะเคลือบที่ผนังคอลัมน์ทำให้พีคสารที่ได้จึงมีค่าไมเกรชั่นไทม์ที่เคลื่อนออกไป ดังนั้นหลังการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มตัวอย่างจึงต้องทำการล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M 15 นาที ตามด้วยน้ำ milli Q อีก 15 นาทีและเมื่อเริ่มการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มตัวอย่างต้องทำการคอนดิชั่นคอลัมน์ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 20 นาที โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 Mและ 0.1 M อย่างละ 20 นาที และตามด้วยน้ำ milli Q 30 นาที ตามลำดับ และชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตความเข้มข้น 30 mM และฟอสเฟตความเข้มข้น 40 mM อีก 10 นาที เพื่อเป็นการปรับสภาพคอลัมน์ให้พร้อมใช้งานก่อนทำการหาปริมาณออกซาเลต ซิเทรต มาเลต และแอสคอร์เบตในชาพร้อมดื่มตัวอย่าง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Onakpoya, I.; Spencer, E.; Heneghan, C.; Thompson, M. The Effect of Green Tea on Blood Pressure and Lipid Profile: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Nure. Metab. Cardiovas.* **2014**, *24*, 823-836.

2. Wang, Q.; Gong, Q.; Yan, J.; Zhu, J.; Tang, J.; Wang, M.; Yang, Z.; Wang, L. Association Between Green Tea Intake and Coronary Artery Disease in a Chinese Population. *Circulation J.* **2010**, *74*, 294-300.

3. Yang, H.; Yang, S.; Chao, J; Chen, J. Beneficial Effects of Catechin-rich Green Tea and Inulin on the Body Composition of Overweight Adults. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 749-754.

4. Oxalate & goitrogen [online].2014 Available

From: http://www.aqua-medical.com/article/article14.htm

5. โรคนิ่วไต [online].2015 Available
From: http://www.bmbmd.research.chula.ac.th/knrenal.htm

6. Wu, F.; He, Z.; Luo, Q.; Zeng Y. High-performance Liquid Chromatographic Determination of Oxalic Acid in Tea Using Tris(1,10-phenanthroline)-ruthenium(II) Chemiluminescence. *J. Anal Sci.* **1998**, *14*, 971-973.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

7. Honow, R.; Reinhold, G.K.; Hesse, A.; Siener, R. Oxalate Content of Green Tea of Different origin, Quality, Preparation and Time of Harvest. *Urol Res.* **2010**, *38*, 377–381.

8. Morita, A.; Tuji M. Nitrate and Oxalate Contents of Tea Plants (*Camellia sinensis L.*) with Special Reference to Types of Green Tea and Effect of Shading. *Soil Sci. Plant Nutr.* **2002**, *48*, 547-553.

9. Horie, H.; Yamauchi, Y.; Kohata, K. Analysis of Organic Anions in Tea Infusions using Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1998**, *817*, 139-144.

10. ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE [online].2015 Available

http://what-when-how.com/forensic-sciences/capillary-electrophoresis-in-forensic-science/

11. Double layer ที่ผนังคะพิลลารี [online].2015 Available

http://spie.org/x91382.xml

12. Reversed EOF [online].2015 Available

http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12G%3A_Electrophoresis

13. Taverniers, I.; Loose, M.; Bockstaele, E. Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance. *Trends Anal Chem.* **2004**, *23*, 535-552.

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวสวรรยา โอชวิช เกิดเมื่อวันที่ 9 มกราคม พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนเบญจมราชาลัย ในพระบรมราชูปถัมภ์ แขวงสำราษฎร์ เขตพระนคร กรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 45/71 หมู่ที่ 7 ตำบลคลองข่อย อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120

นางสาวธนาภา ชัยสถิตย์ เกิดเมื่อวันที่ 20 พฤศจิกายน พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดเพชรบูรณ์ สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนวิทยานุกูลนารี อำเภอเมืองเพชรบูรณ์ จังหวัดเพชรบูรณ์ เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 187/15 ถนนสนามชัย ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย