การพัฒนาวิธีการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณซัลโฟนาไมด์ในน้ำเสียบำบัดจากอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลตนเอง

Development of sample preparation method for analysis of sulfonamides in treated water from pharmaceutical and personal care product manufacturing

โดย

นางสาว สุวพัชร ใยบัวเทศ

นางสาว กันต์ธีรา คำภีระ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

เรื่อง การพัฒนาวิธีการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณซัลโฟนาไมด์ในน้ำเสียบำบัดจากอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลตนเอง

โดย นางสาว สุวพัชร ใยบัวเทศ

นางสาว กันต์ธีรา คำภีระ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. ปรีชา เลิศปรัชญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผศ.ม.ล. ศิริพัสตร์ ไชยันต์)

..... กรรมการ

(อ. ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รศ. ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. .....

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ซัลโฟนาไมด์ในน้ำเสียบำบัดจากอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลตนเอง

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวสุวพัชร ใยบัวเทศ เลขประจำตัว 533 31323 23

นางสาวกันต์ธีรา คำภีระ เลขประจำตัว 533 30586 23

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ม.ล. ศิริพัสตร์ ไชยันต์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

ซัลโฟนาไมด์เป็นตัวยาสำคัญที่ใช้กันแพร่หลายในอุตสาหกรรมยาและผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลตนเอง เป็นสารปนเปื้อนที่มักพบในแหล่งน้ำธรรมชาติ งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค dispersive liquid-liquid microextraction มาประยุกต์ในการเพิ่มความเข้มเข้นซัลโฟนาไมด์ 6 ชนิด ได้แก่ sulfadimethoxine (SDM), sulfamethoxazole (SMZ), sulfamethoxypyridine (STP), sulfamethazine (SMT), sulfathiazole (STZ) และ sulfadiazine (SDZ) ในน้ำ เพื่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC/DAD โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด ได้แก่ ชนิดและปริมาณของตัวทำละลายสกัด ชนิดและปริมาณของตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย ความเข้มข้นของเกลือในน้ำตัวอย่าง ค่า pH ของน้ำตัวอย่าง และเวลาที่ใช้ในการสกัด สภาวะที่เหมาะสมคือ ตัวทำละลายสกัดคือ dichloromethane ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร, ตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายที่เหมาะสมคือ ethanol ปริมาตร 1500 ไมโครลิตร, ปรับ pH ของน้ำตัวอย่างเป็น 4, เติมเกลือจนมีความเข้มข้นเป็น 0.04 g/ml สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วยเทคนิค HPLC คือ คอลัมน์ Agilent Zorbax eclipse plus C18 (4.6×100 มิลลิเมตร, 3.5 ไมโครเมตร), อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ isocratic คือ 25% acetonitrile : 75% กรดฟอร์มิคเข้มข้น 1%, อัตราการไหลวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.7ml/min, ปริมาตรการฉีด 10 ไมโครลิตรและเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array ที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้วิเคราะห์สารได้ในช่วง 0.2-10 ppm โดยมีค่าต่ำสุดการวิเคราะห์ของเทคนิคอยู่ในช่วง 20-40 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าต่ำสุดการวิเคราะห์เชิงปริมาณอยู่ในช่วง 100-300 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยวิธีการมีขีดความจำเพาะในการตรวจวัดสารและความเที่ยงในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพของการสกัดพบว่าวิธีการให้ผลได้กลับคืน 40-75 % (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 3-9 %) พบว่าวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นสารตัวอย่างได้ 2-4 เท่า

Title Development of sample preparation method for analysis of sulfonamides in treated water from pharmaceutical and personal care product manufacturing

Student names Miss. Suwapat Yaibuathes ID 533 31323 23

Miss. Kantheera Kumpeera ID 533 30586 23

Advisor Assistant Professor M.L. Siripastr Jayanta

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

Abstract

Sulfonamides, active ingredients used in pharmaceutical and personal care products (PPCPs) industries, are recently found in natural water resources. This research applied dispersive liquid-liquid microextraction to enrich six representative sulfonamides: sulfadimethoxine (SDM), sulfamethoxazole (SMZ), sulfamethoxypyridine (STP), sulfamethazine (SMT), sulfathiazole (STZ), and sulfadiazine (SDZ) in water for HPLC/DAD analysis. DLLME extraction parameters: types and amount of extraction solvent, types and amount of disperser solvent, concentration of salt in the water samples, pH of water samples, and extraction time were optimized. The overall optimum procedure is as followed; DLLME conditions: extraction solvent: dichloromethane 1000 µl; disperser solvent: ethanol 1500µl; aqueous phase pH = 4; NaCl 0.04 g/ml. HPLC conditions: column: Agilent Zorbax eclipse plus C18 (4.6´100 mm, 3.5 µm); mobile phase: isocratic 25:75 ACN:0.1% formic acid, flow rate 0.7 ml/min; injection volume 10 µl, photo diode array detector (λ_{max} 269 nm). The optimized DLLME procedure coupled to HPLC/DAD was validated from 0.2-10 mg/l (R2 > 0.9900). Overall method's LOD ranges 20-40 µg/l, LOQ 100-300 µg/l, with acceptable values of method selectivity and sensitivity. The recoveries ranged from 40-75 % (%RSD 3-9) and can enrich the analyte concentrations 2-4 folds.

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำงานวิจัยครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความช่วยเหลือจากหลายฝ่ายและผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หม่อมหลวง ศิริพัสตร์ ไชยันต์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้ให้คำแนะนำทั้งยังให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ที่จำเป็นต่างๆ ในงานวิจัยครั้งนี้ รวมถึงเป็นกำลังใจให้ทางผู้จัดทำมาตลอดระยะเวลาที่ได้ทำโครงการ

นอกจากนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา เลิศปรัชญา ที่ได้ให้เกียรติเป็นประธานการสอบและ อาจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล ที่ได้ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบในครั้งนี้ ทั้งยังสละเวลาในการตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้อันมีค่า ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้มอบทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจสำคัญ สุดท้ายขอขอบพระคุณพี่ๆ นิสิตปริญญาเอก ปริญญาโทและเพื่อนๆในภาคเคมีทุกคนที่ได้ให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือมาตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ง
กิตติกรรมประกาศ		จ
สารบัญรูป		ช
สารบัญตาราง		ญ
บทที่ 1 บทนำ		1
1.1	มูลเหตุจูงใจ	1
1.2	ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
1.3	วัตถุประสงค์ของโครงการ	12
บทที่2 ทฤษฎี		13
2.1	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	13
2.2	การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)	22
บทที่ 3 การทดลอง		27
3.1	เครื่องมือและอุปกรณ์	28
3.2	สารเคมี	28
3.3	การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการทดลอง	29
3.4	ขั้นตอนการทดลอง	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง		37
4.1	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐาน sulfonamides ด้วยเทคนิค HPLC	37
4.2	สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) และหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสารทั้ง 4 ชนิด	46
4.3	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำตัวอย่างด้วยเทคนิค DLLME	49
4.4	ตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค (method validation)	53

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 57
5.1 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC 57
5.2 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่าง 58
5.3 ตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค 59

เอกสารอ้างอิง 60
ภาคผนวก 62
ประวัติผู้วิจัย 73

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC	14
รูปที่ 2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ isocratic elution	15
รูปที่ 2.3	ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ gradient elution	15
รูปที่ 2.4	ท่อทางเดินของลิ้นในตำแหน่ง (wait) ก และตำแหน่งฉีด (inject) ข	17
รูปที่ 2.5	Bonded phase ที่มีหมู่ฟังก์ชัน (n-Octadecyl และ n-Octyl) เกิดพันธะอยู่กับซิลิกา	18
รูปที่ 2.6	ภาพจำลองแสดงกลไกการหน่วงเหนี่ยวตัวถูกละลาย Solvophobic Model และ Partioning Model	20
รูปที่ 2.7	แผนภาพแสดงการสกัด	22
รูปที่ 2.8	ขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค DLLME	24
รูปที่ 4.1	โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่ใช้คอลัมน์ Kinetex phenomenex และ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ isocratic	37
รูปที่ 4.2	โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่ใช้คอลัมน์ Kinetex phenomenex และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient	38
รูปที่ 4.3	โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่ใช้คอลัมน์ Kinetex phenomenex และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient	39
รูปที่ 4.4	โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่ใช้คอลัมน์ Waters AccQ·Tag และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient	39
รูปที่ 4.5	โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient	40
รูปที่ 4.6	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน SDZ ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient	41
รูปที่ 4.7	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน STZ ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient	41

รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน SMT ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient 41

รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน STP ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient 42

รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน SDZ ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient 42

รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน SDM ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient 42

รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 5 ชนิดที่ใช้คอลัมน์ Agilent Zorbax eclipse plus C18 และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient 43

รูปที่ 4.13 ผลการทดลองแยกสารซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC, Agilent Zorbax eclipse plus C18 (4.6×100 mm., 3.5 μm) อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ isocratic, acetonitrile : 0.1% formic acid เท่ากับ 25:75 และ flow rate 0.7 ml/min ภายในเวลา 13 นาที 45

รูปที่ 4.14 กราฟช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด STZ ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array 47

รูปที่ 4.15 กราฟช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด STP ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array 48

รูปที่ 4.16 กราฟช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด SMZ ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array 48

รูปที่ 4.17 กราฟช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด SDM ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array 49

รูปที่ 4.18 ผลการทดลองศึกษาผลการใช้เกลือ (sodium chloride) และความเข้มข้นของเกลือ (sodium chloride) ในน้ำตัวอย่างที่เหมาะสม 50

รูปที่ 4.19 ผลการทดลองศึกษา pH ของน้ำตัวอย่างที่เหมาะสม 51

รูปที่ 4.20 ผลการทดลองศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่า 52

รูปที่ 4.21 ผลการทดลองศึกษาผลการได้กลับคืน 54

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	รายชื่อสารปนเปื้อนในกลุ่ม PPCPs ที่ควบคุมตามมาตรการของ EPA	2
ตารางที่ 1.2	โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสารกลุ่ม sulfonamide 6 ชนิด ที่ทำการศึกษา	8
ตารางที่ 3.1	ชนิดและปริมาณตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย	32
ตารางที่ 4.1	ผลการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด โดยเทคนิค HPLC, Agilent Zorbax eclipse plus C18 (4.6×100 mm., 3.5 μm)	44
ตารางที่ 4.2	ผลการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด โดยเทคนิค HPLC, Agilent Zorbax eclipse plus C18 (4.6×100 mm., 3.5 μm)	45
ตารางที่ 4.3	ผลการทดลองการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สาร ซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array	46
ตารางที่ 4.4	ผลการทดลองการศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดสารของสาร ซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC แสดงโดยค่า SD ของ retention time สารแต่ละชนิด	53
ตารางที่ 4.5	ผลการทดลองศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดการวิเคราะห์ และขีดจำกัดต่ำสุด ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด	55
ตารางที่ 5.1	สรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC	58
ตารางที่ 5.2	สรุปผลการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่าง เพื่อศึกษาสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยอาศัยหลักการของ DLLME	58
ตารางที่ 5.3	สรุปผลการทดลองการตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิคในการวิเคราะห์ สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด	59

บทที่ 1
บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจ

ปัจจุบันแหล่งน้ำสะอาดที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของมนุษย์ ในประเทศไทยมีการปนเปื้อนของสารเคมีจากแหล่งต่างๆ จึงเป็นปัญหาสำคัญอันดับต้นๆที่ควรมีการประเมินอย่างถูกต้อง สารเคมีตกค้างที่พบในแหล่งน้ำส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เภสัชกรรมและผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลตนเอง (pharmaceuticals and personal care products, PPCPs) เช่น ยาปฏิชีวนะ อาหารเสริม ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เครื่องหอม และ ผลิตภัณฑ์ในการทำความสะอาดร่างกาย เป็นต้น การปนเปื้อนมักเกิดขึ้นโดยอ้อม เช่น การบริโภคเนื้อสัตว์ที่ได้รับสารเร่งการเจริญเติบโตแล้วเกิดการถ่ายเทสารเหล่านั้นลงสู่แหล่งน้ำ การใช้ผลิตภัณฑ์ในการทำความสะอาดร่างกายบริเวณแหล่งน้ำ การขับถ่ายอย่างไม่ถูกสุขลักษณะ เป็นต้น ในปัจจุบันสังคมยังขาดความเข้าใจที่ถูกต้องถึงผลกระทบอันเกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของสารกลุ่ม PPCPs ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากระบบบำบัดน้ำเสียในปัจจุบันทั้งในระบบอุตสาหกรรมและชุมชนขาดขั้นตอนการบำบัด PPCPs ส่งผลให้เกิดการตกค้างของสารกลุ่ม PPCPs อย่างรวดเร็ว และในปริมาณที่น่าตกใจ ปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลอันตรายต่อมนุษย์ พืช สัตว์ และ สิ่งแวดล้อม [1]

ปัจจุบันสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อม (U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA) หน่วยงานระดับประเทศหรือระดับรัฐบาลกลางของประเทศสหรัฐอเมริกาและองค์กรต่างๆ ที่มีหน้าที่ปกป้องสิ่งแวดล้อมได้ให้ความสำคัญของการของการปนเปื้อนของสารกลุ่ม PPCPs ในแหล่งน้ำมากขึ้นและเริ่มมีการควบคุมสารปนเปื้อนกลุ่ม PPCPs ดังแสดงในตารางที่ 1.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.1 รายชื่อสารปนเปื้อนในกลุ่ม PPCPs ที่ควบคุมตามมาตรการของ EPA

Method 1694: 74 Pharmaceuticals or Personal Care Products in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HPLC/MS/MS		
PPCP	**CAS #**	**Classification**
Ibuprofen	15687-27-1	Analgesic
Cimetidine	51481-61-9	Anti-acid reflux
Ranitidine	66357-35-5	Anti-acid reflux
Albuterol	18559-94-9	Antiasthmatic
Warfarin	81-81-2	Anticoagulant
Carbamazepine	298-46-4	anticonvulsant
Metformin	657-24-9	anti-diabetic drug
Miconazole	22916-47-8	antifungal agent
Diphenhydramine	58-73-1	antihistamine
Diltiazem	42399-41-7	antihypertensive
Gemfibrozil	25812-30-0	antilipemic
Triclocarban	101-20-2	antimicrobial, disinfectant
Triclosan	3380-34-5	antimicrobial, disinfectant
Acetaminophen	103-90-2	antipyretic, analgesic
1,7-Dimethylxanthine	611-59-6	antispasmodic, caffeine metabolite
Digoxin	20830-75-5	cardiac glycoside
Cefotaxime	63527-52-6	cephalosporin antibiotic

(ต่อ)

Method 1694: 74 Pharmaceuticals or Personal Care Products in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HPLC/MS/MS		
Anhydrochlortetracycline (ACTC)	13803-65-1	chlorotetracycline degradate
Anhydrotetracycline (ATC)	4496-85-9	chlorotetracycline degradate
4-Epianhydrotetracycline (EATC)	4465-65-0	chlorotetracycline degradate
4-Epichlortetracycline (ECTC)	14297-93-9	chlorotetracycline degradate
Isochlortetracycline (ICTC)	514-53-4	chlorotetracycline degradate
Sarafloxacin	98105-99-8	fluoroquinolone antibiotic
Thiabendazole	148-79-8	fungicide and parasiticide
Norgestimate	35189-28-7	hormonal contraceptives
Digoxigenin	1672-46-4	immunohistochemical marker steroid
Lincomycin	154-21-2	lincosamide antibiotic
Azithromycin	83905-01-5	macrolide Antibiotic
Clarithromycin	81103-11-9	macrolide antibiotic
Erythromycin	114-07-8	macrolide antibiotic
Ormetoprim	6981-18-6	macrolide antibiotic
Roxithromycin	80214-83-1	macrolide antibiotic

(ต่อ)

Method 1694: 74 Pharmaceuticals or Personal Care Products in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HPLC/MS/MS		
Tylosin	1401-69-0	macrolide antibiotic
Virginiamycin	11006-76-1	macrolide antibiotic
Erythromycin anhydrate	59319-72-1	macrolide antibiotic
Cotinine	486-56-6	nicotine metabolite
Dehydronifedipine	67035-22-7	nifedipine metabolite
Naproxen	22204-53-1	non-steroidal anti-inflammatory drug
Codeine	76-57-3	opiate
	14206-58-7	oxytetracycline degradate
Trimethoprim	738-70-5	pyrimidine antibiotic
Ciprofloxacin	85721-33-1	quinoline antibiotic
Clinafloxacin	105956-97-6	quinoline antibiotic
Enrofloxacin	93106-60-6	quinolone antibiotic
Flumequine	42835-25-6	quinolone antibiotic
Lomefloxacin	98079-51-7	quinoline antibiotic
Norfloxacin	70458-96-7	quinoline antibiotic
Ofloxacin	82419-36-1	quinoline antibiotic
Oxolinic acid	14698-29-4	quinolone antibiotic
Carbadox	6804 07 05	quinoxaline Antibiotic
Ampicillin	69-53-4	β-lactam antibiotics
Cloxacillin	61-72-3	β-lactam antibiotics
Oxacillin	66-79-5	β-lactam antibiotics

(ต่อ)

Method 1694: 74 Pharmaceuticals or Personal Care Products in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HPLC/MS/MS		
Penicillin V	87-08-1	β-lactam antibiotics
Penicillin G	61-33-6	β-lactam antibiotics
Fluoxetine	54910-89-3	SSRI Antidepressant
Caffeine	58-08-2	stimulant
Sulfachloropyridazine	80-32-0	sulfonamide antibiotic
Sulfadiazine	68-35-9	sulfonamide antibiotic
Sulfadimethoxine	122-11-2	sulfonamide antibiotic
Sulfamerazine	127-79-7	sulfonamide antibiotic
Sulfamethazine	57-68-1	sulfonamide antibiotic
Sulfamethoxazole	723-46-6	sulfonamide antibiotic
Sulfanilamide	63-74-1	sulfonamide antibiotic
Sulfathiazole	72-14-0	sulfonamide antibiotic
Sulfamethizole	144-82-1	sulfonamide antibiotic
Chlortetracycline (CTC)	57-62-5	tetracycline antibiotic
Demeclocycline	127-33-3	tetracycline antibiotic
Doxycycline	564-25-0	tetracycline antibiotic
Minocycline	10118-91-8	tetracycline antibiotic
Oxytetracycline (OTC)	79-57-2	tetracycline antibiotic
Tetracycline (TC)	60-54-8	tetracycline antibiotic

(ต่อ)

Method 1698: 27 Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HRGC/HRMS		
Steroid/Hormone	**CAS #**	**Classification**
Androstenedione	63-05-8	anabolic agent
Androsterone	53-41-8	hormone metabolite
Equilenin	517-09-9	hormone replacement
Equilin	474-86-2	hormone replacement
17a-Ethynyl estradiol (EE2)	57-63-6	ovulation inhibitor
Desogestrel	54024-22-5	ovulation inhibitor
Mestranol	72-33-3	ovulation inhibitor
Norethindrone	68-22-4	ovulation inhibitor
Norgestrel	6533-00-2	ovulation inhibitor
Campesterol	474-62-4	phytosterol (plant sterol)
β-Sitosterol	83-46-5	phytosterol (plant sterol)
Stigmasterol	83-48-7	phytosterol (plant sterol)
β-Stigmastanol	83-45-4	phytosterol (plant sterol)
17a-Estradiol	57-91-0	sex hormone
17b-Estradiol (E2)	50-28-2	sex hormone
Estriol (E3)	50-27-1	sex hormone
Estrone (E1)	53-16-7	sex hormone
Progesterone	57-83-0	sex hormone
Testosterone	58-22-0	sex hormone
17a-Dihydroequilin	651-55-8	sterol
Cholestanol	80-97-7	sterol
Cholesterol	57-88-5	sterol

(ต่อ)

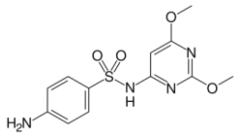
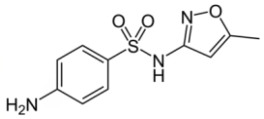
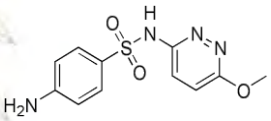
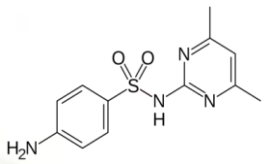
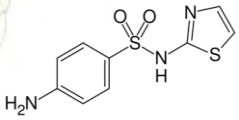
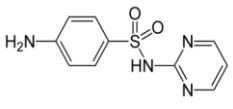
1698: 27 Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HRGC		
Desmosterol	313-04-2	sterol
Ergosterol	57-87-4	sterol
b-Estradiol-3-benzoate	50-50-0	sterol
Coprostanol	360-68-9	sterol
Epi-Coprostanol	516-92-7	sterol

ที่มา http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/ppcp/index.cfm

ข้อมูลในตารางที่ 1 แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนสารกลุ่ม PPCPs ในปัจจุบัน ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคการตรวจวัดที่จำเพาะและไว เช่น HPLC/MS/MS หรือ GC/MS/MS ในการควบคุมปริมาณสารกลุ่มนี้ในแหล่งน้ำตามค่า maximum concentration limit, MCL นอกจากนั้นแล้ว U.S. EPA ยังได้ตีพิมพ์บทความทางวิชาการที่ระบุถึงอันตรายของสารกลุ่ม PPCPs ต่อสิ่งแวดล้อมแม้มีการปนเปื้อนในปริมาณต่ำ เช่น estrogens และการก่อให้เกิดอาการ ดื้อยา และผลสัมฤทธิ์ของการใช้ยาต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นต้น [2]

การวิเคราะห์สารกลุ่ม PPCPs ตามมาตรการของ U.S. EPA นี้จำเป็นต้องมีการ เตรียมตัวก่อนการวิเคราะห์ โดยในปัจจุบันใช้วิธีการสกัดวัฏภาคของแข็ง (solid phase extraction, SPE) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณสูง มีหลายขั้นตอน ผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญสูง ในการปรับสภาวะการสกัดให้เหมาะสม นอกจากนั้นแล้วอุปกรณ์ SPE ยังมีราคาสูงอีก ด้วยงานวิจัยนี้เสนอการวิเคราะห์สารกลุ่ม PPCPs โดยเทคนิค dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย ใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดน้อย รวดเร็ว ถูก และให้เปอร์เซ็นต์ผลคืนได้กลับมากในการเพิ่มความเข้มข้นของสารจากตัวอย่างน้ำ การวิเคราะห์สามารถใช้ HPLC ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีประจำห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยจะพัฒนาการสกัดและวิเคราะห์สารกลุ่ม PPCPs ประเภทยาปฏิชีวนะกลุ่ม sulfonamide 6 ชนิด ได้แก่ sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfamethazine (SMT), sulfamethoxypyridine (STP), sulfamethoxazole (SMZ) และ sulfadimethoxine (SDM) ซึ่งมีการตกค้างในแหล่งน้ำต่างๆ โดยผู้วิจัยคาดว่าการสกัดโดยเทคนิค DLLME จะสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารทั้ง 6 ชนิด ให้อยู่ในเกณฑ์ที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยเทคนิค HPLC ที่ระดับ ไมโครกรัมต่อลิตร (µg/L)

ตารางที่ 1.2 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสารกลุ่ม sulfonamide 6 ชนิด ที่ทำการศึกษา

ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	มวลโมเลกุล (g/mol)	pK_a	Log K_{ow}	โครงสร้าง
Sulfadimethoxine (SDM)	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$	310.33	6.2	1.63	
Sulfamethoxazole (SMZ)	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253.28	5.7	0.9	
Sulfamethoxy pyridine (STP)	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$	280.30	6.7	0.32	
Sulfamethazine (SMT)	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	278.33	7.4	0.89	
Sulfathiazole (STZ)	$C_9H_9N_3O_2S_2$	255.32	7.1	0.72	
Sulfadiazine (SDZ)	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	250.28	6.5	-0.09	

หมายเหตุ K_{ow} คือค่า octanol-water distribution constant

1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Aroyo-Manzanares และคณะ [3] ได้ศึกษาเทคนิค dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) และเทคนิค QuEChERS ในการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณซัลโฟนาไมด์ 9 ชนิดในนม ซึ่งทั้งสองเทคนิคเป็นเทคนิคในการเตรียมสารตัวอย่างที่ง่าย ใช้ตัวทำละลายที่น้อย มีประสิทธิภาพสูง และใช้เทคนิค high performance liquid chromatrography (HPLC) ที่มีตัวตรวจวัดคือ fluorescence detection พบว่าได้ร้อยละผลได้กลับของซัลโฟนาไมด์ 90.8 - 104.7 และ 83.6 – 104.8 สำหรับเทคนิค DLLME และเทคนิค QuEChERS ตามลำดับและค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบต่ำกว่า 1.21 ไมโครกรัมต่อลิตรและ 2.73 ไมโครกรัมต่อลิตรสำหรับเทคนิค DLLME และเทคนิค QuEChERS ตามลำดับ

Herrera-Herrera และคณะ [4] ได้ศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) ร่วมกับเทคนิค Ultra-high performance liquid chromatography และใช้ตัวตรวจวัดคือ diode-array detection ในการพัฒนาเทคนิคเพื่อระบุสารปฏิชีวนะจำนวน 25 ชนิดซึ่งเป็นสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์จำนวน 11 ชนิดคือ sulfanilamide, sulfacetamide, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimidin, sulfamethoxypyridazine, sulfadoxine, sulfamethoxazole, sulfisoxazole, sulfadimethoxine และ sulfaquinoxaline และสารกลุ่มควิโลโนนจำนวน 14 ชนิดคือ pipemidic acid, marbofloxacin, fleroxacin,levofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, difloxacin,moxifloxacin, oxolinic acid และ flumequine ในน้ำแร่และน้ำทิ้งโดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ในเทคนิค DLLME คือ ใช้น้ำตัวอย่างจำนวน 5 ml ที่ค่าความเป็นกรด 7.6, สารละลายเกลือ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 20 % g/ml, สารละลายที่ใช้ในการสกัดคือ คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) จำนวน 685 ไมโครลิตรและตัวทำละลายอะซิโตรไนไตร์ (ACN) จำนวน 1250 ไมโครลิตร ซึ่งผลการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานได้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบ เท่ากับ 0.35 - 10.5 ไมโครกรัมต่อลิตรและได้ร้อยละผลได้กลับคือ 78 และ 117

Pamreddy และคณะ [5] ได้ศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์เพื่อระบุปริมาณเททระไซคลินและซัลโฟนาไมด์ในตะกอนจากน้ำเสียโดยใช้เทคนิคการสกัด pressurized liquid extraction (PLE) ร่วมกับกรดซิตริก (citric acid) ที่ค่าความเป็นกรดเท่ากับ 3 และใช้เทคนิค solid phase extraction (SPE) เพื่อสกัดสารตัวอย่างทำให้สารมีความบริสุทธิ์ขึ้นและใช้เทคนิค liquid chromatography–tandem mass spectrometry ในการวิเคราะห์หาปริมาณและพบว่าได้ร้อยละผลได้กลับของซัลโฟนาไมด์เป็น 90.4 - 99.9 และของเททระไซคลินเป็น 96.2 - 100.9 และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบของซัลโฟนาไมด์เท่ากับ 0.6 - 4.2 นาโนกรัมต่อกรัมและของเททระไซคลินเท่ากับ 3.2 - 13 นาโนกรัมต่อกรัม

Brausch และคณะ [6] ได้ศึกษาผลกระทบของผลิตภัณฑ์ยาตกค้างในแหล่งน้ำ แต่กลับพบปริมาณการตกค้างของสารผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลตนเองในปริมาณที่สูงกว่ายาตกค้าง โดยผู้วิจัยอธิบายว่าการตกค้างเกิดจากการปล่อยสารกลุ่ม PPCPs สู่สภาวะแวดล้อมอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการควบคุมและการบำบัดที่ถูกต้อง นอกจากนั้นสารในกลุ่มนี้บางชนิดมีความคงทนและมีผลทางชีวภาพ เช่น ไตรโคซาน และ ไตรโคคาร์บาน ปริมาณที่พบมีความเป็นพิษสูงและอาจก่อให้เกิดปัญหาทั้งแบบเฉียบพลัน (acute) และแบบเรื้อรังในสิ่งแวดล้อม

Pedrouzo และคณะ [7] นำเทคนิคการสกัดสารในระดับไมโครลิตรคือเทคนิค stir-bar sorptive extraction (SBSE) ซึ่งเป็นเทคนิคการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายน้อยร่วมกับเทคนิคโครมาโทรกราฟีทั้ง GC และ LC ในการวิเคราะห์การตกค้างขององค์ประกอบของ PPCPs ที่เป็นสารอินทรีย์ที่มีอันตรายสูงในแหล่งน้ำ เช่น สารถนอมอาหาร (พาราเบน) สารยับยั้งจุลินทรีย์ (ไตรโคซาน) น้ำหอมหรือแม้แต่ยาฆ่าแมลง (N,N-ไดเอทิล-เมตา-โทลูเอมายด์ หรือ DEET) และไซโลเซน (เดคะ-เมทิลไซโคลเพนตะไซโลเซน) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่พบได้ทั่วไปใน ครีมบำรุงผิว เจล เครื่องสำอาง อาหาร ผงซักฟอก

Sun และคณะ [8] ได้ศึกษาเทคนิคในการวิเคราะห์ปริมาณซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิดในน้ำคือ sulfamethoxazole , sulfamethoxydiazine , sulfadimethoxineและ sulfaquinoxaline โดยใช้เทคนิคThe magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction (MMHSPE) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย ง่ายและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งพบว่าเทคนิคนี้ได้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบ (limit of detection *LOD*) ของ SMX, SMD, SDM และ SQX เท่ากับ 0.026, 0.024, 0.033 and 0.030 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ พบว่าได้ร้อยละผลได้กลับของซัลโฟนาไมด์เป็น 70 - 102

Che-Yi และคณะ [9] ได้ศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณซัลโฟนาไมด์ 8 ชนิดในน้ำ คือ sulfacetamide, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamerazine, sulfadimidine, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole และ sulfaquinoxaline โดยใช้เทคนิคliquid–liquid–liquid microextraction (LLLME) ร่วมกับเทคนิค high-performance liquid-chromatography-ultraviolet absorbance detection (HPLC/UV) ซึ่งในตอนแรกซัลโฟนาไมด์จะถูกสกัดอยู่ในชั้นของสารละลายอินทรีย์ในระดับไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร พบว่าได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (relative standard deviation, RSD) เท่ากับ 2.6–5.3% , ค่าความเป็นเส้นตรง (R^2) เท่ากับ 0.9972–0.9999 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบ (limit of detection, *LOD*) อยู่ในช่วง 0.11 - 0.77 ng/ml และพบว่าได้ร้อยละผลได้กลับของซัลโฟนาไมด์เป็น 86.2 - 108.7

Raich-Montiu และคณะ [10] ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์เพื่อระบุปริมาณซัลโฟนาไมด์จำนวน 6 ชนิดในน้ำเสียและดินจากอุตสาหกรรมการผลิตยาโดยใช้เทคนิค solid-phase extraction (SPE) ร่วมกับเทคนิคhigh performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ตัวตรวจวัดคือ fluorometric ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าในน้ำได้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบอยู่ในระดับนาโนกรัมต่อลิตรและพบว่าได้ร้อยละผลได้กลับของซัลโฟนาไมด์ 70 - 104 และในดินพบว่าได้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบอยู่ในช่วง 1 - 6 นาโนกรัมต่อลิตรและได้ ร้อยละผลได้กลับของซัลโฟนาไมด์ 60 - 98

Rezaee และคณะ [11] ได้ศึกษาเป็นการพัฒนาเทคนิค DLLME ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือสารละลาย C_2Cl_4 จำนวน 8.0 ไมโครลิตร และสารละลายที่ช่วยในการกระจายในสารละลายอะซิโตนจำนวน 1.0 ml ซึ่งจะถูกฉีดเข้าสู่สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข็มจะเกิดการแยกชั้นของสารละลายออกเป็น 2 ชั้น และนำไปเขย่าเพื่อให้เกิดการแยกของสารและนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค gas chromatography และใช้ตัวตรวจวัดคือ flame ionization detection เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) นอกจากนี้เทคนิค DLLME และยังวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบอินทรีย์ กลุ่มออร์กาโนคลอรีน, สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและสารประกอบเบนซีน (เบนซีน ,โทลูอีน, เอทิลเบนซีนและไซลีน) อีกด้วย

Aaberg และคณะ [12] ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารมีขั้วในแหล่งน้ำโดยใช้ผลิตภัณฑ์ polar weathering จากน้ำมันดิบ Ekofish เพื่อทำการสกัดด้วยของเหลวและพบปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดดังนี้คือ pH, ชนิดตัวทำละลาย และ ธรรมชาติของสารที่จะสกัด โดยผู้วิจัยรายงานว่าการสกัดอย่างต่อเนื่องโดยเอทิลอะซิเตทจะให้ร้อยละผลคืนได้กลับสูงถึงร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำเสียด้วยเทคนิค dispersive liquid-liquid microextraction เพื่อนำมาวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ นำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการหาปริมาณซัลโฟนาไมด์ในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลตนเองเพื่อวิเคราะห์ดูแนวโน้มปริมาณการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม
2. ฝึกกระบวนการคิดวิเคราะห์วางแผนทำงานวิจัย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

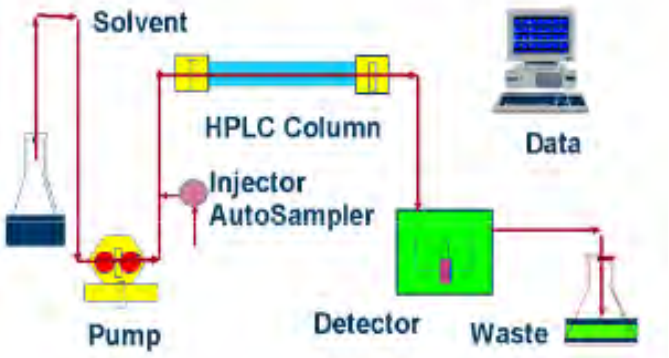
เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง หรือ high performance liquid chromatography, HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจในตัวอย่าง กระบวนการแยกในสถานะของเหลว และเกิดขึ้นระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาคคือวัฏภาคอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ (column) กับวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ในปัจจุบันมีการพัฒนาวัฏภาคอยู่กับที่ให้มีขนาดอนุภาคเล็กลง เนื่องจากพบว่ายิ่งอนุภาคของวัฏภาคอยู่กับที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์มีขนาดเล็กลงเท่าใด สมรรถนะในการแยกสารจะเพิ่มขึ้น สารแต่ละชนิดจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ตามความสามารถในการละลายของสารนั้นๆ ในวัฏภาคที่เคลื่อนที่หรือในวัฏภาคอยู่กับที่ ตัวอย่างเช่น สารประกอบที่ละลายได้ดีในวัฏภาคที่เคลื่อนที่ก็จะเคลื่อนออกมาจากคอลัมน์ในอัตราที่เร็วกว่า ส่วนสารที่ละลายไม่ดีในวัฏภาคที่เคลื่อนที่แต่ละลายได้ดีในวัฏภาคอยู่กับที่จะเคลื่อนที่ได้ช้าในคอลัมน์ทำให้ออกจากคอลัมน์ทีหลัง เทคนิค HPLC จำเป็นต้องใช้เครื่องสูบหรือปั๊มเป็นอุปกรณ์ที่สำคัญในการพาวัฏภาคเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์ กระบวนการแยกในเทคนิค HPLC มีอยู่หลายประเภท แต่ที่นิยมใช้มากสุด ได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบรีเวิรส์วัฏภาค (reversed phase HPLC) ซึ่งใช้วัฏภาคอยู่กับที่เป็นสารที่มีหมู่ฟังก์ชันประเภทมีสภาพขั้วต่ำ (C-18) กว่าขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ (ของผสมระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายได้ในน้ำ)

ในการแยกและวิเคราะห์ของผสมรวมโดยเทคนิค HPLC นั้น สารที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์จะผ่านตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) เพื่อบันทึกสัญญาณที่มีความสัมพันธ์กับชนิดและปริมาณสาร สัญญาณที่ได้นี้จะถูกบันทึกต่อหน่วยเวลา โดยทั่วไปจะแปลงไปให้อยู่ในหน่วยพื้นที่สามเหลี่ยม (พีค) หรือโครมาโตแกรม (chromatogram) เมื่อพิจารณาพื้นที่ต่อหน่วยเวลา การแสดงผลจะอยู่ในรูปกราฟความสัมพันธ์ของเวลา (แกนนอน) กับสัญญาณการตรวจวัด (แกนตั้ง) เทคนิค HPLC สามารถนำมาใช้ได้ทั้งเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) โดยเปรียบเทียบ t_R กับสารมาตรฐานที่สภาวะการวิเคราะห์เดียวกันและเชิงปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) โดยการเตรียมกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความ

เข้มข้น เทคนิค HPLC นี้เหมาะสมในการวิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (low volatile substation) หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight compounds)

เทคนิค HPLC นี้เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมอาหาร และด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่ง เทคนิค HPLC สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้ในระดับส่วนในล้านส่วน (ppm หรือ mg/L) หรือส่วนในพันล้านส่วน (ppb หรือ µg/L) ได้โดยการเลือกใช้คอลัมน์, เครื่องตรวจวัดให้เหมาะสม เครื่อง HPLC มีส่วนประกอบที่สำคัญดังแสดงในรูปที่ 2-1

<u>หน้าที่และองค์ประกอบของเครื่อง HPLC</u>



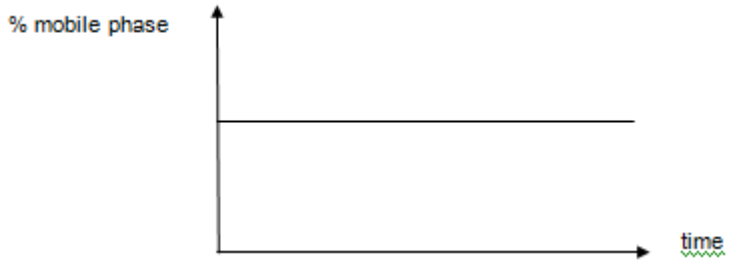
รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

1. วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase / solvent reservoir)

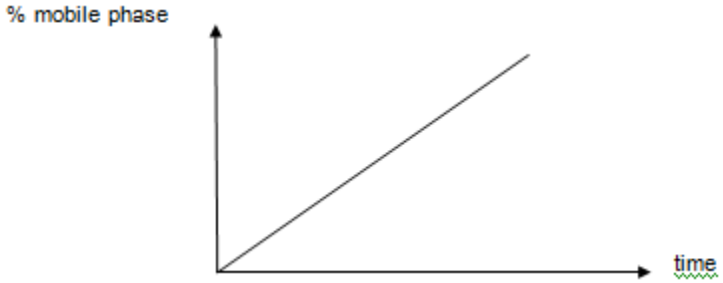
ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่างเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่วัฏภาคที่อยู่กับที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ โดยสารละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่อาจมีความจำเพาะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก แต่ควรมีคุณสมบัติพื้นฐานที่เหมือนกันคือ มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากสิ่งเจือปน และไม่ทำปฏิกิริยากับวัฏภาคอยู่กับที่ คอลัมน์ ตัวฉีด ตัวตรวจวัดและสารที่ต้องการแยกจนทำให้สารที่ต้องการเสื่อมสภาพไป นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความหนืดและความปลอดภัยของวัฏภาคเคลื่อนที่ด้วย การเลือกใช้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ เป็นไปได้ 2 ลักษณะคือ

1.1 Isocratic elution เป็นการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เพียง 1 ชนิดในการแยกสารต่างๆออกจากคอลัมน์



รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ isocratic elution

1.2 Gradient elution เป็นการใช้ตัวทำละลายมากกว่า 1 ชนิด หรือใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวแต่มีความเข้มข้นต่างๆ กันเพื่อแยกสารออกจากคอลัมน์ วิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการแยกสารสูงกว่าวิธีที่ 1.1



รูปที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ gradient elution

เครื่องมือที่ใช้ในการควบคุมการผสมสารละลายสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1.2.1 แบบ Low pressure mixing เป็น gradient elution ที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายภายใต้ความดันบรรยากาศก่อนที่จะส่งเข้าสู่เครื่องสูบฉีดของเหลวแล้วเพิ่มความดันให้สูงขึ้นตามที่ต้องการก่อนผ่านเข้าสู่คอลัมน์

1.2.2 แบบ High pressure mixing ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะเข้าสู่เครื่องสูบฉีดของเหลวให้ผ่านเข้ามาและผสมกันภายใต้ความดันสูงก่อนที่จะผ่านคอลัมน์

2. เครื่องสูบฉีดของเหลว (Pump)

ทำหน้าที่ ดึงตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC ด้วยอัตราเร็ว 0.5-10 ml/min และรักษาให้คงที่ในช่วงอัตราเร็วช่วงใดช่วงหนึ่งโดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 2 ของปริมาตรที่สูบ สำหรับความดันสูงที่อัดเข้าไปในคอลัมน์จะมีค่าตั้งแต่ 1000-6000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เครื่องสูบที่นิยมใช้มี 3 ชนิดคือ

2.1 ชนิดไซริงก์ (syringe type) นิยมใช้กับคอลัมน์ขนาดเล็กเพราะมีขีดจำกัดในการดูดของเหลวปริมาณมากๆ ควบคุมปริมาตรการสูบด้วยการควบคุมการเคลื่อนที่ของลูกสูบในไซริงก์โดยการหมุนของสกรูก้านลูกสูบซึ่งควบคุมด้วยจำนวนรอบของการหมุนของมอเตอร์

2.2 ชนิดแทนที่ของเหลว (reciprocating piston type) ควบคุมปริมาตรโดยการควบคุมระยะชักของลูกสูบหรือควบคุมความเร็วของมอเตอร์ที่หมุนก้านลูกสูบ ซึ่งทำให้เครื่องสูบชนิดนี้สามารถดูดของเหลวในปริมาณมากได้ โดยการทำงานในระยะชักลูกสูบจะดูดของเหลวจากตัวเก็บสารละลายเข้ามาในกระบอกสูบและปล่อยสารละลายเข้าไปในคอลัมน์ในระยะอัดของลูกสูบ และทำงานเป็นวงรอบต่อเนื่องกันไปจนกว่าจะปิดเครื่องสูบ

2.3 ชนิดความดันคงที่ (constant pressure pump) ควบคุมการไหลของของเหลวเข้าสู่คอลัมน์โดยการใช้ความดันของแก๊สเฉื่อยที่คงที่ดันให้ของเหลวไหลไปในคอลัมน์อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา

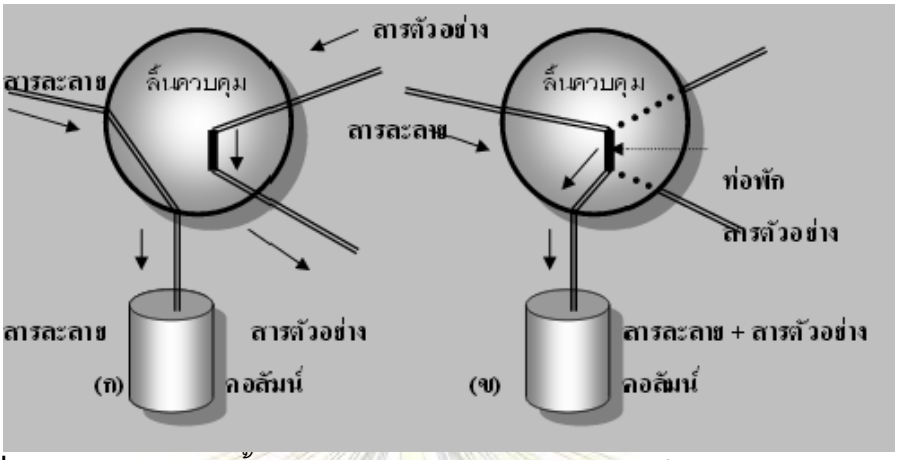
3. Injector / Autosampler

ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC ส่วนใหญ่จะอยู่ช่วง 0.5-10 ไมโครลิตร สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ

3.1 ชนิดไซริงก์ เป็นชนิดที่ใช้ไซริงก์ขนาดเล็กดูดสารตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการฉีดผ่านเยื่อกั้น (septum) ซึ่งมักเป็นยางซิลิโคนด้านบนคอลัมน์ ตัวฉีดชนิดนี้อาจมีการรั่วบริเวณรูฉีดเพราะคอลัมน์มีความดันสูง

3.2 ชนิดโรตารี่ (rotary type) เป็นชนิดที่ใช้ลิ้นควบคุมการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์โดยในขั้นตอนแรกจะใช้ไซริงก์ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ (fixed loop injector) รูปที่ 2-4 ก หลังจากนั้นจึงหมุนลิ้นให้สารละลายซึ่งเป็นวัฏภาคอยู่กับที่ไล่ของเหลวทั้งหมดลงสู่คอลัมน์ รูปที่ 2-4 ข นอกจากนี้ยังสามารถดูดสารตัวอย่างเข้าไปในปริมาตรที่ต้องการฉีดเข้าไปในท่อพัก

สารตัวอย่างซึ่งมีสารละลายอยู่ก่อนแล้วบางส่วน เมื่อหมุนลิ้นไปที่ตำแหน่งฉีด สารละลายจะพาสารตัวอย่างทั้งหมดเข้าไปในคอลัมน์ (syringe loop injector)



รูปที่ 2.4 ท่อทางเดินของลิ้นในตำแหน่ง (wait) ก และตำแหน่งฉีด (inject) ข

4. Precolumn

เครื่องมือ HPLC บางเครื่องต้องมีคอลัมน์เพิ่มขึ้นอีก 1 อันเรียกว่า precolumn มีสารบรรจุอยู่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้งานแต่ขนาดของสารที่บรรจุอยู่ใหญ่กว่าเพื่อไม่ให้ความดันของตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์นี้ลดลง คอลัมน์นี้มีหน้าที่แยกเอามลทินที่ติดอยู่ในตัวทำละลายออกไป หรือทำให้ตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวอีลูทที่บริสุทธิ์ขึ้น

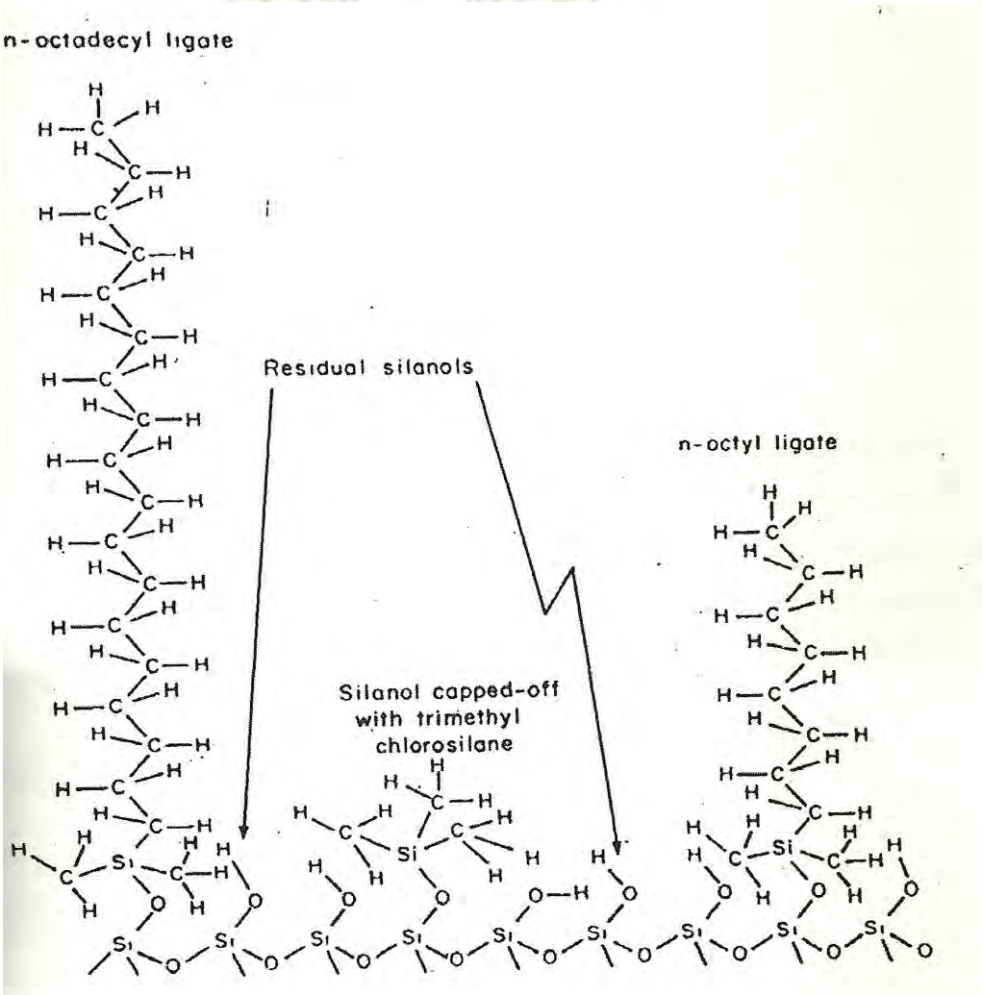
5. คอลัมน์

ภายในบรรจุด้วยวัฏภาคที่อยู่กับที่มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจลทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจโดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างวัฏภาคที่เคลื่อนที่กับวัฏภาคที่อยู่กับที่ มีความยาวในการใช้งานตั้งแต่ 10-150 เซนติเมตร กรณีมีความยาวมากมักพบว่าประสิทธิภาพในการแยกสารลดลง มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่น้องกว่า 1 มิลลิเมตรจนถึงหลายมิลลิเมตรสามารถทนแรงดันสูงได้ถึง 6000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ แบ่งเป็น

5.1 Normal Phase อนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์จะมีสภาพขั้วสูง ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่จะมี สภาพขั้วต่ำกว่า สมบัติดังกล่าวจะใช้ในการแยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าโดยมากจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ สมบัติดังกล่าวจะใช้ในการแยกสารที่สภาพขั้วต่ำถึงปานกลาง หลักการแยกอาศัยสภาพขั้ว (polarity) คือถ้าสารหนึ่งมีสภาพขั้วสูงกว่าจะถูกเหนี่ยวในคอลัมน์นานกว่า เนื่องจากจะถูกอนุภาคในคอลัมน์จับยึดเอาไว้ด้วยสภาพขั้วที่เหมือนกัน ส่วนสารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าจะถูกจัดยึดด้วยอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ได้น้อย โดยวัฏภาคเคลื่อนที่จะพาสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกมาก่อน การเพิ่ม

สภาพขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่จะลดการหน่วงเหนี่ยวของสารในคอลัมน์ ตัวอย่างคอลัมน์ประเภทนี้ ได้แก่ ซิลิกา และ ไซยาไน เป็นต้น

5.2 Reversed Phase เป็นเทคนิคที่นิยมมากสุดในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC Reversed Phase มีความหมายตรงข้ามกับ Normal Phase คือจะใช้วัฏภาคคงที่ที่ไม่มีสภาพขั้ว เช่น C-18 และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วสูง โดยทั่วไปจะใช้น้ำและตัวทำละลายที่ละลายในน้ำ วัฏภาคคงที่ในระบบนี้ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลวที่เกิดพันธะเกาะบนวัสดุค้ำจุน เช่น ซิลิกา และพอลิเมอร์ เป็นต้น ซิลิกาจัดเป็นวัสดุค้ำจุนที่นิยมใช้แพร่หลาย



รูปที่ 2.5 Bonded Phase ที่มีหมู่ฟังก์ชัน (n-Octadecyl และ n-Octyl) เกิดพันธะอยู่กับซิลิกา[14]

กลไกการหน่วงเหนี่ยว

กลไกการหน่วงเหนี่ยวในโครมาโทกราฟี แบบ reversed-phase เกิดจากอันตรกริยา nonpolar-nonpolar การแยกในระบบนี้สัมพันธ์กับสมบัติทางกายภาพของโมเลกุลที่ต้องการจะแยกด้าน hydrophobicity และ ionic character ทฤษฎีที่ใช้ในการอธิบายกลไกการแยกบนวัฏภาคคงที่ชนิดมีขั้วมี 2 ทฤษฎี คือ

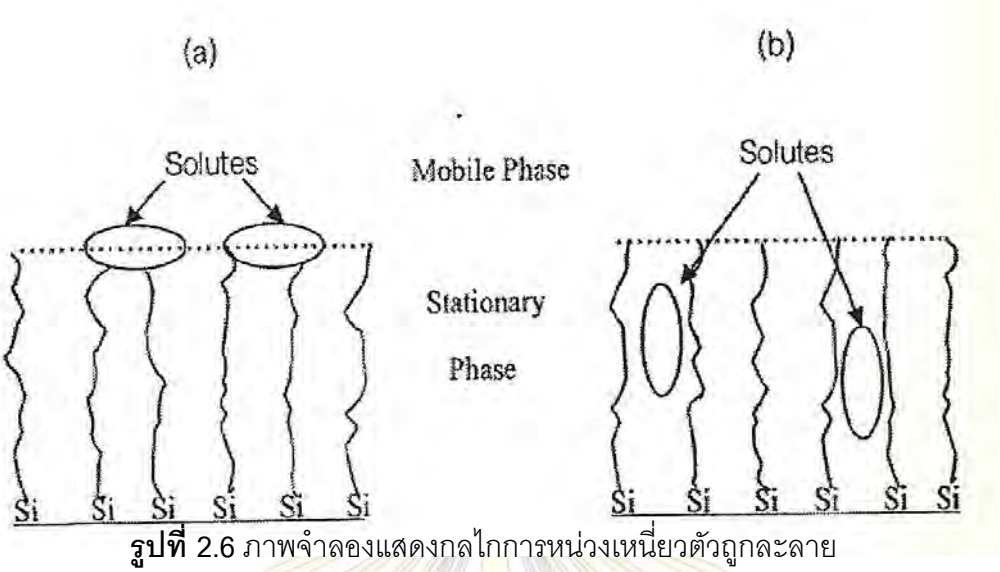
5.2.1 Partition Theory

ทฤษฎีกล่าวว่า สารตัวอย่างจะฝังตัวอยู่ในสายโซ่ของวัฏภาคคงที่แทนที่จะเป็นการยึดเกาะบนพื้นผิวเหมือนในทฤษฎี solvophobic แม้ว่ากลไกการแยกสารยังไม่เป็นที่แน่ชัดแต่ก็เป็นที่ยอมรับว่า ความยาวของสายโซ่ของวัฏภาคคงที่นั้นมีผลต่อค่าช่วงค้าง (retention time) ของสาร โดยถ้าสายโซ่ยาวเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ก็จะใกล้เคียงกับการเกิด partition และถ้าสายโซ่สั้นกลไกจะเกิดใกล้เคียงกับการดูดซับ (adsorption)

5.2.2 Solvophobic Theory

เป็นทฤษฎีใช้อธิบาย selectivity ในระบบ reversed-phase Chromatography ได้เป็นอย่างดี โดยแนวความคิดทฤษฎีคือ โมเลกุลใดๆ ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะแยกตัวออกจากตัวทำละลายที่มีขั้วแล้วเข้าสู่วัฏภาคที่เป็นไฮโดรคาร์บอน อันตรกิริยาแบบไม่ชอบน้ำนี้เกิดจากแรงผลักระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้ว สารที่ไม่มีขั้ว และวัฏภาคคงที่ ดังนั้นแรงที่ยึดสารให้อยู่บนวัฏภาคคงที่จะอ่อนลงถ้าโมเลกุลของสารถูกล้อมรอบด้วยตัวทำละลาย สารที่เข้ากันไม่ได้กับตัวทำละลายจะถูกหน่วงโดยวัฏภาคคงที่ภายในคอลัมน์ได้นานกว่า จากทั้ง 2 ทฤษฎีสามารถแสดงกลไกลการหน่วงเหนี่ยวในรูปที่ 2-6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะวิทยาศาสตร์



รูปที่ 2.6 ภาพจำลองแสดงกลไกการหน่วงเหนี่ยวตัวถูกละลาย Solvophobic Model และ Partioning Model [14]

6. Detector

เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยกเพื่อส่งให้เครื่องบันทึกผลทำการบันทึกค่าและแสดงกราฟของสารชนิดต่างๆ ตัวตรวจวัดมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่ต้องตรวจหา ตัวอย่างเช่น

6.1 ตัวไวแสง (photo detector) ใช้สำหรับการวัดสารที่มีสีหรือมีความขุ่น

6.2 ตัววัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) ใช้สำหรับวัดปริมาณสารที่สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้การตรวจวัดวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากมีความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด 2 ค่า คือ ความยาวคลื่นของแสงกระตุ้นที่สารตัวอย่าง และความยาวคลื่นเมื่อคืนสู่สภาพปกติ ข้อดีของการตรวจวัดชนิดนี้คือ ความไวและความจำเพาะเจาะจง และที่สำคัญยังให้ความสะดวกในการปรับระดับแสงพื้นฐาน (background) ให้เข้าใกล้ศูนย์ เครื่องตรวจวัดชนิดนี้เหมาะสมในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและสารในเมทริกซ์ซับซ้อน

6.3 ตัววัดดัชนีหักเห (refractive index detector) ใช้สำหรับวัดสารละลายที่ใสและมีตัวถูกละลายอยู่

6.4 ตัววัดกัมมันตภาพรังสี (radioactivity detector) ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี

6.5 เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตหรือแสงวิสิเบิล (UV-vis spectophotometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่ วางอยู่ใน

เครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ใน ตัวอย่างซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงในช่วง รังสียูวีหรือแสงขาวที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการ ดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจาก แหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ใน ตัวอย่างได้เครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเลต-วิซิเบิล มี 2 ชนิด คือ

6.5.1 เครื่องตรวจวัดอัตราไวโอเลต-วิซิเบิลชนิด fixed wavelength ซึ่งเครื่องตรวจวัดชนิดนี้สามารถติดตามความยาวคลื่นได้เพียงค่าเดียวเท่านั้น

6.5.2 เครื่องตรวจวัด visible wavelength และ photodiode array จะมีข้อดีกว่าชนิดแรกคือ ในการวิเคราะห์นั้นสามารถติดตามค่าการดูดกลืนแสงได้มากกว่าหนึ่งค่าในขณะวิเคราะห์ ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง

7. เครื่องบันทึกผล ใช้สำหรับแสดงตำแหน่งของสารที่ออกมาจากคอลัมน์เพื่อประโยชน์ในการจำแนกชนิดของสารหรือคำนวณหาปริมาณสารซึ่งสามารถคำนวณได้จากความสูงของยอดพีค (peak high) หรือพื้นที่ใต้พีค (peak area)

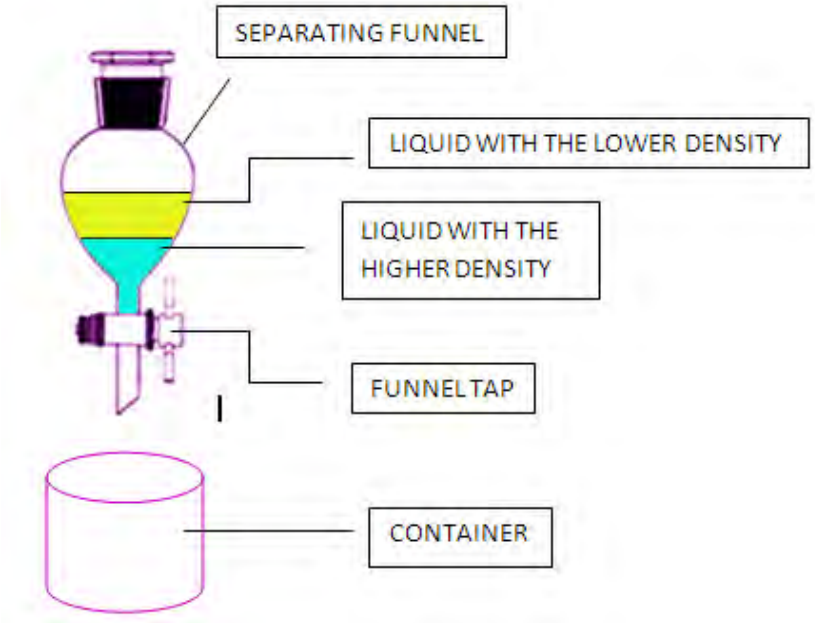
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะวิทยาศาสตร์

2.2 **การสกัดด้วยตัวทำละลาย** (Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นหนึ่งวิธีแยกสารที่นิยมใช้ เป็นวิธีที่มีประโยชน์มาก สามารถช่วยในการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้แก่สารได้ เช่น การสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมหลังทำปฏิกิริยา โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่สนใจออกจากสารผสม ซึ่งการสกัดสารด้วยตัวทำละลายนั้นมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่ solid-liquid extraction, liquid-liquid extraction และ acid-base extraction สำหรับงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงเฉพาะ liquid-liquid extraction เท่านั้น [13]

2.2.1 Liquid-liquid extraction (LLE)

Liquid-liquid extraction หรือการสกัดของเหลวด้วยของเหลว วิธีนี้นิยมทำในกรวยแยก โดยอาศัยหลักการ like dissolve like ซึ่งตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดที่ดีควรละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี มีจุดเดือดไม่สูงเพื่อที่จะกำจัดออกได้ง่าย ไม่ควรติดไฟง่าย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมหลักการสกัดคืออาศัยความแตกต่างสภาพขั้วของสารให้เกิดการถ่ายโอนของสารจากชั้นน้ำมาสู่ชั้นสารอินทรีย์ เพื่อสกัดสารที่สนใจออกมา จากนั้น ชั้นสารอินทรีย์จะแยกออกจากชั้นน้ำโดยมีสารที่สนใจละลายอยู่ในชั้นสารอินทรีย์ (organic phase) แต่สำหรับกรณีที่สารที่สนใจละลายได้ดีในน้ำ หลังสกัดสารที่สนใจก็จะละลายอยู่ในชั้นน้ำ (aqueous phase)



รูปที่ 2.7 แผนภาพการสกัด LLE

การสกัดของเหลวด้วยของเหลว สารที่สนใจจะละลายในตัวทำละลายแต่ละชั้นได้แตกต่างกันและเป็นอัตราส่วนคงที่ ณ ภาวะสมดุลที่อุณหภูมิหนึ่ง ค่าคงที่นี้เรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย หรือค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน (distribution coefficient หรือ partition coefficient, K_d) โดยสามารถเขียนสมการได้ดังนี้

$K_d = [A]_{org}/[A]_{aq}$

เมื่อ K_d = ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย

$[A]_{org}$ = ความเข้มข้นสารที่สนใจในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์

$[A]_{aq}$ = ความเข้มข้นสารที่สนใจในชั้นน้ำ

ถ้าค่า $K_d > 1$ แสดงว่าสาร A ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าตัวทำละลายน้ำ

ถ้าค่า $K_d<1$ แสดงว่าสาร A ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ไม่ดีเท่ากับตัวทำละลายน้ำ

ดังนั้นจำนวนโมลของสารที่สนใจที่ถูกสกัดจะมีค่าเท่ากับ

$n_{org} = ([A]_{org}V_{org})/([A]_{org}V_{org}+[A]_{aq}V_{aq})$

เปลี่ยนรูปสมการข้างต้นใหม่ได้ ดังนี้

$$n_{org} = 1/[1+([A]_{aq}V_{aq}/[A]_{org}V_{org})]$$
$$= 1/[1+(V_r/K_d)]$$

เมื่อ n_{org} = จำนวนโมลของสารที่สนใจที่ถูกสกัด

$[A]_{org}$, $[A]_{aq}$ = ความเข้มข้นของสารที่สนใจในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และชั้นน้ำ ตามลำดับ

V_{org}, V_{aq} = ปริมาตรตัวทำละลายอินทรีย์และตัวทำละลายน้ำ ตามลำดับ

V_r = อัตราส่วนตัวทำละลาย (V_{aq}/V_{org})

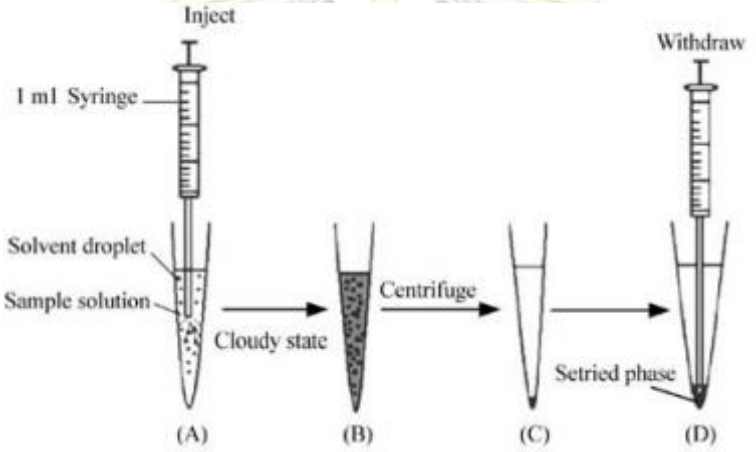
เพื่อให้ได้ปริมาณสารที่สนใจจากการสกัดปริมาณมาก ควรใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมาก และเลือกตัวทำละลายที่มีค่า K_d สูง การพัฒนาประสิทธิภาพการสกัดสามารถทำได้โดยการแบ่งตัวทำละลายอินทรีย์ออกเป็นหลายส่วนเพื่อทำการสกัดซ้ำหลายครั้ง จะได้ประสิทธิภาพการสกัดมากกว่าการสกัดเพียงครั้งเดียวและใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมาก

ถึงแม้เทคนิค LLE จะมีประโยชน์มากแต่ก็มีข้อเสียด้วยเช่น เป็นเทคนิคที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากก่อให้เกิดการสิ้นเปลืองและมีราคาแพง ต้องใช้เครื่องแก้วที่ถูกออกแบบมาเฉพาะ ได้แก่ กรวยแยก, การระเหยตัวทำละลายออกต้องใช้เวลานาน, อาจเกิดอิมัลชันปริมาณมาก ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และ ผลการได้กลับคืนที่ต่ำ

ด้วยข้อเสียของ LLE ที่กล่าวมานี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดด้วยของเหลวให้ใช้งานได้ง่ายขึ้นและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมหลายวิธีการ เช่น dispersive liquid-liquid microextraction และ solid phase microextraction เป็นต้น เทคนิคที่ผู้วิจัยสนใจนำมาใช้ในงานวิจัยนี้คือ DLLME

2.2.2 Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)

Dispersive liquid–liquid microextraction เป็นเทคนิคที่มีพื้นฐานจากเทคนิค (liquid liquid extraction,LLE) โดยในปริมาณตัวทำลายในการสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายในระดับไมโครลิตร ซึ่งต้องมีการควบคุม pH ของสารตัวอย่างซึ่งทำให้สารตัวอย่างอยู่ในสถานะที่ไม่มีประจุซึ่งแผนภาพของเทคนิคนี้เป็นดังรูป



. **รูปที่**2.8 ขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค DLLME

จากแผนภาพข้างต้นสารตัวอย่างจะถูกบรรจุอยู่ในหลอดสกัด ตามด้วยการฉีดตัวทำละลายในการสกัดที่ผสมกับตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายลงในสารตัวอย่าง เมื่อสารละลายผสมกันแล้วจะเกิดการฟุ้งกระจายของสารในหลอดสกัด และเกิดการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลายในการสกัดและสารตัวอย่างและเกิดการแพร่กระจายของสารตัวอย่างไปยังตัวทำละลายในการสกัดและเกิดสมดุลอย่างรวดเร็ว ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาในการสกัดที่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ หลังจากนั้นนำไปแยกชั้นโดยการเซนทริฟิวส์เพื่อให้สารตัวอย่างในตัวทำละลายแยกชั้นอย่างสมบูรณ์หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค HPLC

ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของ DLLME

ประสิทธิภาพการสกัดแบบ DLLME ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดตัวทำละลายสกัด ชนิดตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย และปริมาตรตัวทำละลายสกัด เป็นต้น

1) **ตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสม**

การเลือกตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสมนั้นเป็นปัจจัยหลักของการสกัดแบบ DLLME ตัวทำละลายสกัดที่ดีควรมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ เนื่องจากจะช่วย ให้แยกชั้นออกจากน้ำได้ง่ายด้วยการเซนติฟิวจ์ และควรเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการละลายสารตัวอย่างที่สนใจได้ดีและเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ ส่วนใหญ่มักจะใช้เป็น halogenated hydrocarbon เช่น chlorobenzene, chloroform, carbon tetrachloride และ tetrachloroethylene เป็นต้น

2) **ตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายที่เหมาะสม**

ตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายสามารถละลายได้ทั้งในตัวทำละลายสกัดและในน้ำ เนื่องจากสามารถช่วยให้ตัวทำละลายสกัดฟุ้งกระจายในชั้นน้ำ ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างตัวทำละลายสกัดกับน้ำเพิ่มขึ้น จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้ ตัวทำละลายสกัดที่นิยมใช้ ได้แก่ methanol, ethanol, acetonitrile, acetone และ tetrahydrofuran

3) **ปริมาตรตัวทำละลายสกัด**

ปริมาตรตัวทำละลายสกัดมีผลต่อ enrichment factor คือ เมื่อเพิ่มปริมาตรตัวทำละลายสกัดทำให้ปริมาตรของชั้นอินทรีย์มากขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นสารตัวอย่างในชั้นอินทรีย์จะลดลง และ enrichment factor ที่ลดลงด้วย ในการเลือกตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสมนั้นควรคำนึงถึง enrichment factor ที่สูงที่สุด และ มีปริมาตรเพียงพอต่อการวิเคราะห์หลังจากการสกัด

4) **ปริมาตรตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย**

ปริมาตรตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายมีผลโดยต่อการเกิด cloudy solution เพื่อปริมาณการแพร่กระจายของตัวทำละลายสกัดในชั้นน้ำ และประสิทธิภาพการสกัดที่ดี ปริมาตรตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายมักอยู่ในช่วง 0.5-1.5 ml

5) **เวลาในการสกัด**

สำหรับ DLLME เวลาในการสกัดพบว่ามีผลประทบต่อประสิทธิภาพในการสกัดเล็กน้อย เนื่องจากการที่สารตัวอย่างจากชั้นน้ำจะเข้าสู้ชั้นตัวทำละลายในการกัดอย่างรวดเร็วและสมดุลเกิดอย่างรวดเร็วและเป็นการสกัดที่ใช้เวลาน้อยในการที่สารตัวอย่างจะเกิดการแพร่กระจายเข้าสู่ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นข้อดีของเทคนิค DLLME

6) **ผลการเติมเกลือ**

ความสามารถในการละลายของสารตัวอย่าง และตัวทำละลายสกัดในน้ำจะลดลงเมื่อ ionic strength ของชั้นน้ำเพิ่มขึ้นพร้อมทั้งทำให้ได้ recovery ที่สูงอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามการที่มี ionic strength ที่มากทำให้ปริมาตรในชั้นอินทรีย์หลังการแยกชั้นมีเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในชั้นอินทรีย์ และ enrichment factor จะลดลงตามมาด้วย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ขวดปริมาตรขนาด 10, 50 และ 500 ml

3.1.2 บีกเกอร์ขนาด 25, 50, 100 และ 250 ml

3.1.3 หัวดูดสำหรับไมโครปิเปตขนาด 200, 1000 และ 2500 ไมโครลิตร

3.1.4 ไมโครปิเปตขนาด 10-100, 100-1000 และ 500-2500 ไมโครลิตร

3.1.5 หลอดหยด

3.1.6 แท่งแก้วคน

3.1.7 หลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด PP / PE ขนาด 15 ml (Hycon Plastics Inc.) สำหรับทำการสกัด

3.1.8 ขวดแก้วทรงกระบอกฝาเกลียวสำหรับตั้งระเหยสาร

3.1.9 เครื่อง Vortex Genie-2

3.1.10 เข็มฉีดยาขนาด 3 ml (Nipro Thailand Corporation, Ayutthaya, Thailand)

3.1.11 ชุดกรองสารตัวอย่างชนิด Nylon membrane ความพรุน 0.2 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร (Whatman International Ltd, Maidstone, England)

3.1.12 Waters HPLC clear glass vial ขนาด 1 ml สำหรับถาด 717 autosampler 96 ตำแหน่ง

3.1.13 Waters PE vial snap cap สำหรับ vial 1 ml

3.1.14 Waters 600 controller and pump

3.1.15 Waters 717 autosampler

3.1.16 Waters 996 photo diode array detector

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารละลายมาตรฐาน

- sulfasiazine (SDZ) purity ≥ 99.0% (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- sulfathuazole (STZ) purity ≥ 98.0% (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- sulfamethazine (SMT) purity ≥ 99.0% (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- sulfamethoxypyridine (STP) purity ≥ 99.0% (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- sulfamethoxazole (SMZ) purity ≥ 99.0% (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)
- Sulfadimethoxine (SDM) purity ≥ 99.0% (Sigma-Aldeich Chemistry, Steinheim, Germany)

3.2.2 ตัวทำละลาย

- acetonitrile (HPLC solvent for analysis), ACI Labscan, Bangkok, Thailand
- methanol (Gradient grade for liquid chromatography), Merck, Damnstadt, Geramany
- ethanol (Absolute for analysis), Merck, Damnstadt, Geramany
- distilled-chloroform (AR Grade), Merck, Damnstadt, Geramany
- distilled-dichloromethane (AR Grade), Merck, Damnstadt, Geramany
- น้ำ Milli-Q ผ่านระบบการทำน้ำให้บริสุทธิ์ที่มีความต้านทาน 18.2 MΩ. cm Milli-Q Gradient Millipak Express 40 Filter Unit, 0.22 μm, non-sterile, Millipore

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

3.2.4 สารมาตรฐาน sodium chloride (NaCl) purity ≥ 99.0% (Carlo Erba reagent, Italy)

3.3 การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการทดลอง

3.3.1 สารละลายมาตรฐาน SDZ, STZ, SMT, STP, SMZ และ SDM

3.3.1.1 สารละลายมาตรฐาน SDZ, STZ, SMT, STP, SMZ และ SDM ใน acetonitrile ความเข้มข้น 500 ppm

1) ชั่งสารมาตรฐาน SDZ, STZ, SMT, STP, SMZ และ SDM หนัก 5 mg

2) ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile ให้มีปริมาตรเป็น 10 ml

3.3.2 สารละลายมาตรฐานผสมสารกลุ่ม sulfonamide SDZ, STZ, SMT, STP, SMZ และ SDM

3.3.2.1 สารละลายมาตรฐานผสมสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 10, 7 และ 5 ppm

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานสารกลุ่ม sulfonamide แต่ละชนิดความเข้มข้น 500 ppm ปริมาตร 500, 140 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ

2) เจือจางและปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ Milli-Q อัตราส่วน 50:50 ให้มีปริมาตรเป็น 25 ml

3.3.2.2 สารละลายมาตรฐานผสมสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 3, 1, 0.6 และ 0.2 ppm

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 3 ml, 1 ml, 600 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ

2) เจือจางและปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ Milli-Q อัตราส่วน 50:50 ให้มีปริมาตรเป็น 10 ml

3.3.2.3 สารละลายมาตรฐานผสมสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 0.06 และ 0.2 ppm

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 600 และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ

2) เจือจางและปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ Milli-Q อัตราส่วน 50:50 ให้มีปริมาตรเป็น 10 ml

3.3.3 น้ำตัวอย่างสารกลุ่ม sulfonamide สำหรับใช้ในการสกัด

3.3.3.1 น้ำตัวอย่างสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 7, 5, 3, 1, 0.6, และ 0.2 ppm

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานสารกลุ่ม sulfonamide แต่ละชนิดความเข้มข้น 500 ppm ปริมาตร 700, 500, 300, 100, 60 และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ
2) เจือจางและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q ให้มีปริมาตรเป็น 50 ml

3.3.4 สารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

3.3.5 สารละลายกรด formic ความเข้มข้นประมาณ 0.1% โดยปริมาตร (pH 2-3)

1) ละลายกรด formic เข้มข้นปริมาตร 500 ไมโครลิตรในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 500 ml
2) ปรับpHด้วยกระดาษ Universal indicator ให้สารละลายมี pH ในช่วง 2-3
3) นำไปกรองด้วยชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนไนลอนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ความพรุน 0.2 ไมโครเมตร

3.3.6 acetonitrile

นำ acetonitrile บริสุทธิ์สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ใส่ขวดพร้อมใช้งาน

3.4 ขั้นตอนการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาเทคนิคในการสกัดสารในน้ำตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamide ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ SDZ, STZ, STP, SMT, SMZ และ SDM โดยอาศัยแนวความคิดจากเทคนิค DLLME มาประยุกต์ใช้ เป็นวิธีการเตรียมสารตัวอย่างแบบใหม่และวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิค HPLC ซึ่งสามารถแบ่งแผนการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่ม Sulfonamide ทั้ง 6 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างน้ำ
3. ตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

มีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้

3.4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamide ทั้ง 6 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC

เริ่มต้นสภาวะการทดลองตามงานวิจัยเรื่อง การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาสาร PPCPs กลุ่ม Sulfonamide ในน้ำ [15] ดังนี้

คอลัมน์: Kinetex phenomenex C18 column, 2.6μm, 100×4.60 mm

วัฏภาคเคลื่อนที่: A = methanol, B = 0.1% formic acid pH 2-3

อัตราการไหล: 0.5 ml/min

เครื่องตรวจวัด: Waters 996 photo diode array detector

ปริมาตรการฉีด: 10 ไมโครลิตร

3.4.1.1 อัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่

ทำการเปลี่ยนอัตราส่วนผสมของวัฏภาคเคลื่อนที่ เพื่อเปรียบเทียบว่าค่าใดเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารกลุ่ม sulfonamide ทั้ง 6 ชนิด

3.4.1.2 อัตราการไหล

ทำการเปรียบเทียบอัตราการไหลต่างๆ ควบคู่ไปกับการศึกษาอัตราส่วนของสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารกลุ่ม sulfonamide ทั้ง 6 ชนิด

3.4.1.3 ชนิดวัฏภาคเคลื่อนที่

ทำการเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ ตัวทำละลาย A ระหว่าง methanol และ acetonitrile เพื่อหาวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการทดลองนี้

3.4.1.4 สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) หาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารกลุ่ม sulfonamide

การสร้างกราฟและหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสารกลุ่ม sulfonamide ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นจากการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ นั่นคือ นำสารละลายมาตรฐานมาทำการวิเคราะห์ อาศัยตัวทำละลายคือ acetonitrile ได้สารละลายมาตรฐานในกลุ่ม sulfonamide ที่ความเข้มข้น 0.02,

0.06, 0.2, 0.6, 1, 3, 5, 7 และ 10 ppm ทำการทดลองหาความเป็นเส้นตรง 5 ครั้ง

3.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่างด้วยเทคนิค DLLME

3.4.2.1 ศึกษาชนิดและปริมาตรตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายที่เหมาะสม

1) ปิเปตน้ำตัวอย่างสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 1 ppm ใส่หลอดพลาสติกฝาเกลียวสำหรับสกัด 5 ml
2) ตรวจวัด pH น้ำตัวอย่างให้มี pH 5 ด้วย Universal indicator
3) ผสมตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายตามชนิดและอัตราส่วนปริมาตรต่างๆ ดังนี้

ตารางที่ 3.1 ชนิดและปริมาณตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย

ชนิดตัวทำละลาย		**ปริมาณ (ไมโครลิตร)**			
ตัวทำละลายสกัด	Chloroform	600	800	1000	1200
	Dichloromethane	600	800	1000	1200
ตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย	Ethanol	500	1000	1500	2000
	methanol	500	1000	1500	2000

4) ฉีดสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายลงในสารละลาย จากนั้นทำการเขย่า 10 นาที
5) เก็บสารละลายชั้นอินทรีย์ออกมาใส่ขวดแก้วทรงกระบอกปากกว้าง จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์
6) เมื่อตัวทำละลายแห้ง ปิเปต acetonitrile ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในขวดปากกว้าง ใช้เครื่อง Vortex เขย่าเพื่อช่วยในการละลาย
7) ดูดสารละลายจากขวดปากกว้างมาแล้วกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างไนลอนก่อนใส่ vial จากนั้นบรรจุสารใส่ vial
8) นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ศึกษาสภาวะที่ดีที่สุด

3.4.2.2 ศึกษาความเข้มข้นเกลือในน้ำตัวอย่างที่เหมาะสม

1) ปิเปตน้ำตัวอย่างสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 1 ppm ใส่หลอดพลาสติกฝาเกลียวสำหรับสกัด 5 ml
2) ตรวจวัด pH น้ำตัวอย่างให้มี pH 5 ด้วย Universal indicator
3) เติมเกลือ sodium chloride ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้
   - sodium chloride ความเข้มข้น 0.00 กรัมต่อมิลิลิตร
   - sodium chloride ความเข้มข้น 0.01 g/ml
     ชั่งเกลือ sodium chloride หนัก 0.05 กรัม ใส่ในน้ำตัวอย่าง 5 ml ที่ปรับ pH แล้ว
   - sodium chloride ความเข้มข้น 0.02 g/ml
     ชั่งเกลือ sodium chloride หนัก 0.1 กรัม ใส่ในน้ำตัวอย่าง 5 ml ที่ปรับ pH แล้ว
   - sodium chloride ความเข้มข้น 0.04 กรัมต่อลิตร
     ชั่งเกลือ sodium chloride หนัก 0.2 กรัม ใส่ในน้ำตัวอย่าง 5 ml ที่ปรับ pH แล้ว
   - sodium chloride ความเข้มข้น 0.06 กรัมต่อลิตร
     ชั่งเกลือ sodium chloride หนัก 0.3 กรัม ใส่ในน้ำตัวอย่าง 5 ml ที่ปรับ pH แล้ว
4) ฉีดสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายดังที่ได้จากข้อ 4.1.1
5) เขย่าหลอดสกัดเป็นเวลา 10 นาที
6) ดูดชั้นสารอินทรีย์เก็บใส่ขวดแก้วทรงกระบอกปากกว้าง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป่าช่วยการระเหยจนระเหยหมด
7) ปิเปต acetonitrile ปริมาตร 1 ml ใส่ขวดแก้วทรงกระบอกปากกว้าง ใช้เครื่อง Vortex ช่วยการละลาย
8) ดูดสารจากขวดแก้วออก แล้วทำการกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างไนลอน ก่อนใส่ vial จากนั้นบรรจุสารใส่ vial
9) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC วิเคราะห์และเลือกผลการทดลองที่ดีที่สุด

3.4.2.3 ศึกษา pH ที่เหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมน้ำตัวอย่าง

1) ปิเปตน้ำตัวอย่างสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 1 ppm ใส่หลอดพลาสติกฝาเกลียวสำหรับสกัด 5 ml
2) ปรับ pH น้ำตัวอย่างแต่ละหลอดด้วยกรด formic ให้ได้ pH เท่ากับ 2, 3, 4, และ 5
3) เติมเกลือ sodium chloride ปริมาณที่ได้จากข้อ 4.1.2
4) ฉีดสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายตามที่ได้จากข้อ 4.1.1
5) เขย่าหลอดสกัดเป็นเวลา 10 นาที
6) ดูดสารชั้นอินทรีย์เก็บใส่ขวดแก้วทรงกระบอกปากกว้าง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจนช่วยในการระเหยตัวทำละลายออกจนหมด
7) ปิเปต acetonitrile ปริมาตร 1 ml ใส่ขวดแก้วแล้วใช้ Vortex ช่วยในการละลาย
8) ดูดสารละลายออกจากขวดจากนั้นกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างก่อนนำสารใส่ vial
9) บรรจุสารใส่ vial แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC วิเคราะห์และเลือกผลที่ดีที่สุด

3.4.2.4 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการเตรียมน้ำตัวอย่าง (เขย่า) ที่เหมาะสม

1) ปิเปตน้ำตัวอย่างสารกลุ่ม sulfonamide ความเข้มข้น 1 ppm ใส่หลอดพลาสติกฝาเกลียวสำหรับสกัด 5 ml
2) ปรับ pH น้ำตัวอย่างให้ได้ตามข้อ 4.1.3
3) เติมเกลือ sodium chloride ปริมาณตามที่ได้ในข้อ 4.1.2
4) ฉีดสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายตามปริมาณที่ได้ในข้อ 4.1.1
5) เขย่าหลอดสกัดด้วยเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 5, 8, 10, 12, 15 และ 20 นาที

6) ดูดสารชั้นอินทรีย์ออกและเก็บใส่ขวดแก้วทรงกระบอกปากกว้าง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจนช่วยในการระเหยออกจนหมด

7) ปิเปต acetonitrile ปริมาตร 1 ml ใส่ขวดแก้ว ใช้เครื่อง vortex ช่วยในการละลาย

8) ดูดสารละลายออกจากขวด จากนั้นกรองด้วยชุดกรองสารตัวอย่างไนลอน ก่อนใส่ vial

9) บรรจุสารใส่ vial แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC วิเคราะห์ผล

3.4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค (method validation)

3.4.3.1 ความจำเพาะในการตรวจวัดสาร (selectivity)

ทำการสกัดสารผสมกลุ่ม sulfonamide ที่ความเข้มข้น 0.4, 3 และ 7 ppm ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง โดยเตรียมสารตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ retention time ของสารแต่ละชนิด

3.4.3.2 ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดสารเชิงปริมาณ (linearity)

ทำการสกัดสารผสมกลุ่ม sulfonamide ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6, 1, 3, 5 และ 7 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamide ด้วย HPLC ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง โดยเตรียมสารตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ผลที่ได้สร้าง calibration curve ระหว่างพื้นที่ใต้ peak (Y) และ ความเข้มข้นของสาร (X)

3.4.3.3 ความแม่นในการวิเคราะห์ (accuracy)

ทำการสกัดสารผสมกลุ่ม sulfonamide ที่ความเข้มข้น 0.4, 3 และ 7 ppm ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง โดยเตรียมสารตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC นำผลที่ได้มาคำนวณ ผลการได้กลับคืนของสาร (%recovery)

3.4.3.4 ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (precision)

ทำการสกัดสารกลุ่ม sulfonamide ที่ความเข้มข้น 0.4, 3 และ 7 ppm ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง โดยเตรียมสารตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC นำผลที่ได้ คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของพื้นที่ใต้พีคแต่ละความเข้มข้น

3.4.3.5 ขีดจำกัดค่าต่ำสุดในการตรวจวัด (limit of detection, LOD)

ทำการสกัดสารกลุ่ม sulfonamide ที่ความเข้มข้น 0.4, 3 และ 7 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง โดยเตรียมสารตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC นำผลที่ได้คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพื้นที่ใต้พีค ค่า LOD มีค่าเท่ากับ 3 เท่าของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.3.6 ขีดจำกัดค่าต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantization, LOQ)

ทำการสกัดสารกลุ่ม sulfonamide ที่ความเข้มข้น 0.4, 3 และ 7 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง โดยเตรียมสารตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC นำผลที่ได้คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของพื้นที่ใต้พีค สารแต่ละชนิด ค่า LOQ มีค่าเท่ากับ 10 เท่าของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

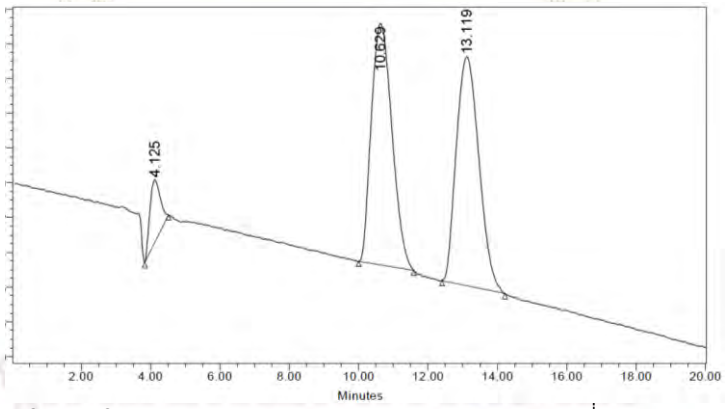
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐาน Sulfonamide ด้วยเทคนิค HPLC

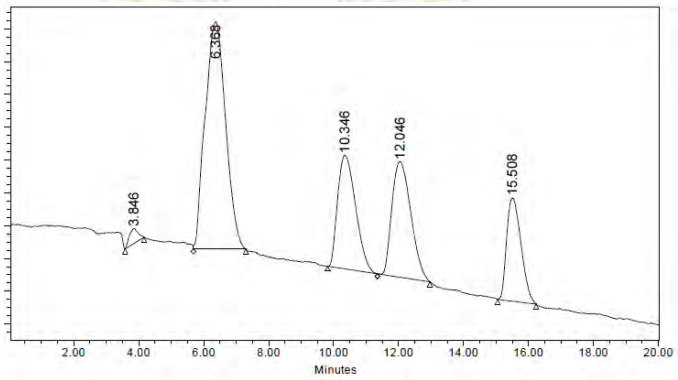
4.1.1 Kinetex phenomenex C18 column
100 × 4.60 mm, 2.6 µm

ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารกลุ่ม sulfonamides 6 ชนิด ได้แก่ SDZ, STZ, STP, SMT, SMZ และ SDM โดยเริ่มจากการศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้ methanol หรือ acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์กรดฟอร์มิก 0.1% pH 2-3 จากผลการทดลองสอดคล้องไปตามทฤษฎีคือ acetonitrile มี solvent strength สูงกว่า methanol จึงทำให้ retention time น้อยกว่า methanol เพื่อให้ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์จึงเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง acetonitrile กับ สารละลายบัฟเฟอร์กรดฟอร์มิก 0.1% pH 2-3 เริ่มทำการศึกษาอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ isocratic, acetonitrile : สารละลายบัฟเฟอร์กรดฟอร์มิก เท่ากับ 20:80 อัตราการไหลคงที่ 0.3 ml/min จากโครมาโทแกรมพบว่าไม่สามารถแยกสารซัลโฟนาไมด์ทั้ง 6 ชนิดได้



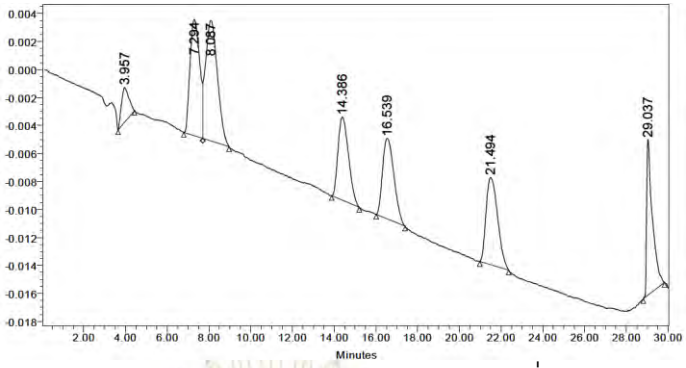
รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่สภาวะการทดลองแบบ gradient, mobile phase; acetonitrile : 0.1% formic acid(pH 2-3)= 20:80, Flow 0.3 ml/min; column: Kinetex phenomenex C18 (100 × 4.60 mm, 2.6 µm); detector : UV (λ_{max} 269 nm)

ขั้นต่อมาจึงทำการเปลี่ยนมาศึกษาอัตราส่วนแบบ gradient ได้ผลการวิเคราะห์รูปที่ 4.2 ไม่สามารถแยกสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 6 ชนิดได้ จึงได้ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่โดยเพิ่มอัตราการเพิ่มของ acetonitrile พบว่าต้องใช้เวลามากถึง 30 นาทีโครมาโทแกรมปรากฏพีคสารทั้ง 6 สาร และยังไม่สามารถแยกสารลำดับที่ 1 และ 2 ซึ่งคือ SDZ และ STZ ตามลำดับ ออกจากกันได้โดยสมบูรณ์ ดังรูปที่ 4.3 เนื่องจากค่า selectivity นั้นนอกจากจะขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายและยังขึ้นกับชนิดคอลัมน์ ทั้งหมูฟังก์ชันและ end cap ด้วย จึงได้เปลี่ยนคอลัมน์



รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่สภาวะการทดลองแบบ gradient , mobile phase; acetonitrile : 0.1% formic acid(pH 2-3)= 20:80 to 100:0; 20 min, Flow 0.3 ml/min; column: Kinetex phenomenex C18 (100 × 4.60 mm, 2.6 µm); detector : UV (λ_{max} 269 nm)

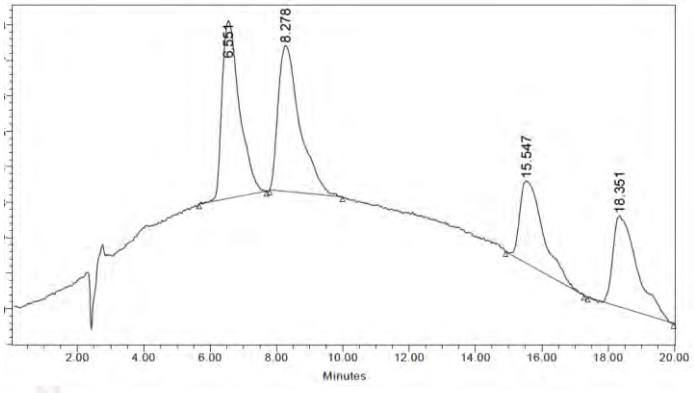
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่สภาวะการทดลองแบบ gradient , Mobile phase; acetonitrile : 0.1% formic acid(pH 2-3)= 15:85 to 40:60; 10 min, 40:60 to 100:0; 5min; Flow 0.3 ml/min; column: Kinetex phenomenex C18 (100 × 4.60 mm, 2.6 µm); detector : UV (λ_{max} 269 nm)

4.1.2 Waters AccQ·Tag Column 5 µm, 150 × 3.90 mm

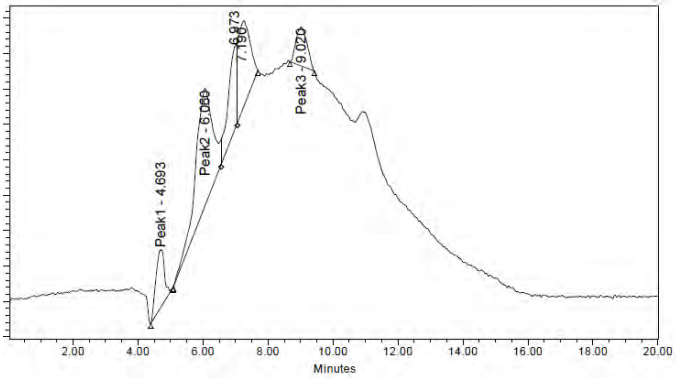
เนื่องจากค่า selectivity นั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของวัฏภาคคงที่ด้วย จึงได้ทดลองเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์เป็น Waters AccQ·Tag พบว่า selectivity ของสภาวะการแยกดีขึ้น ภายในเวลา 20 นาที แต่ไม่สามารถแยก STZ และ SDZ ออกจากกันได้ นอกจากนั้นแล้วพบว่า baseline ไม่เรียบทำให้ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมแสดงปัญหา baseline ไม่เรียบของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่สภาวะการทดลองแบบ gradient, mobile phase; acetonitrile : 0.1% formic acid(pH 2-3)= 20:80 to 100:0; 20 min; Flow 0.3 ml/min; column: Waters AccQ·Tag Column (5 µm, 150 × 3.90 mm); detector : UV (λ_{max} 269 nm)

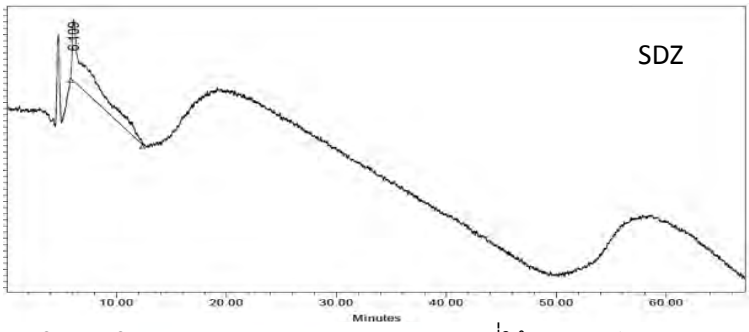
4.1.3 Hibar Merck Lichropher 100 RP-18
5 µm, 250 × 4 mm

เมื่อทำการเปลี่ยนมาใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher 100 RP-18 พบว่าค่า selectivity ของสภาวะดีขึ้น สามารถแยกสารได้ทั้ง 6 ตัว แต่ค่า resolution ของคู่ critical pair (STP และ SMT) มีค่าน้อยกว่า 1.5 ปัญหาอื่นที่พบคือ tailing

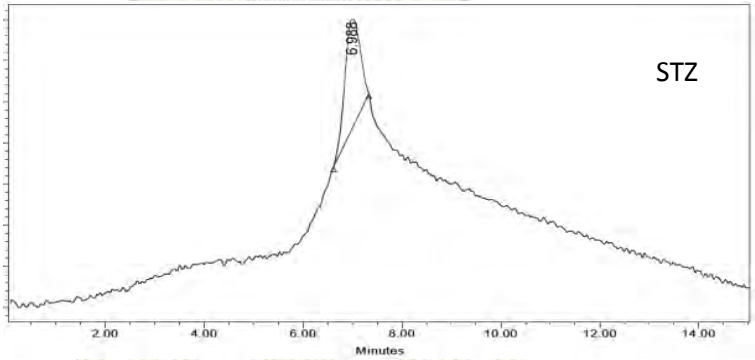


รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 6 ชนิดที่สภาวะการทดลองแบบ gradient , mobile phase; acetonitrile : 0.1% formic acid(pH 2-3)= 20:80 to 100:0; 20 min; Flow 0.3 ml/min; column: Hibar Merck Lichropher 100 RP-18 (5 µm, 250 × 4 mm); detector : UV (λ_{max} 269 nm)

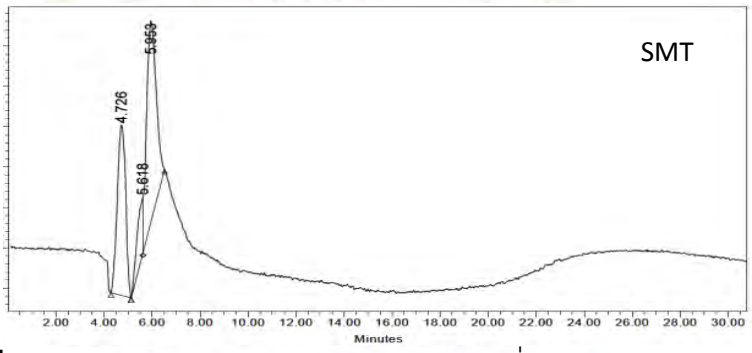
เพื่อแก้ปัญหา tailing ของพีค ได้ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานเดี่ยว เพื่อทดสอบสภาวะที่ใช้ พบว่าปัญหาเกิดจากตัวคอลัมน์ซึ่งมีการสูญเสีย bonded phase ไปจนทำให้ หมู่ silanol ทำปฏิกิริยากับสารจน tailing ขึ้น นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าสารมาตรฐาน SDZ มีการปนเปื้อน ส่งผลให้ baseline ไม่เรียบและมีลักษณะเป็นคลื่น จากผลการทดลองในขั้นนี้ทำให้ผู้วิจัยจำต้องตัดสาร SDZ ออกจากงานวิเคราะห์ ทำให้เหลือสารตัวอย่าง 5 ชนิด ได้แก่ STZ, STP, SMT, SMZ และ SDM



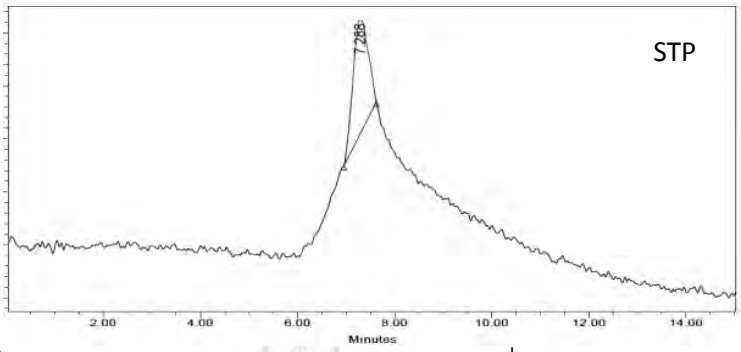
รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน SDZ ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient



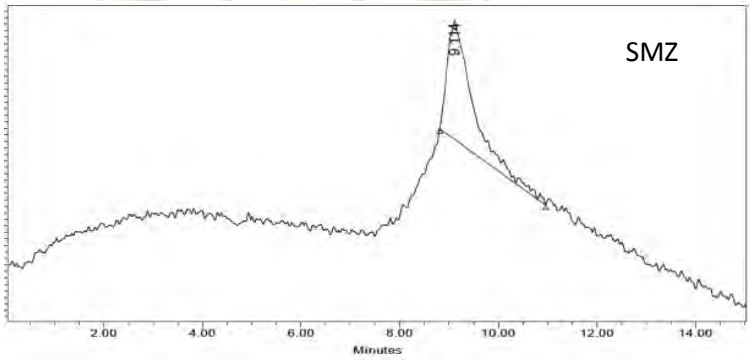
รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน STZ ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient



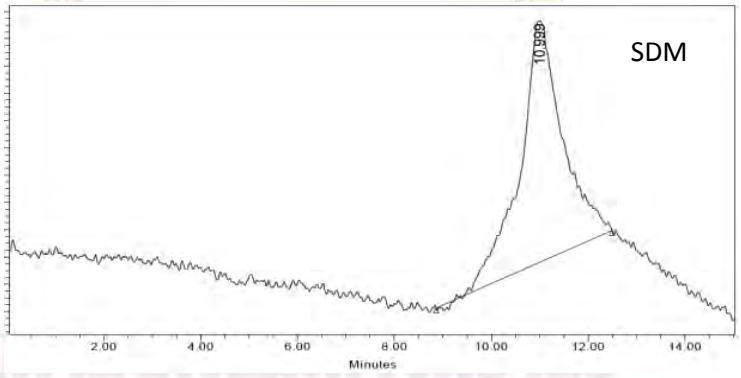
รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน SMT ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient



รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน STP ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient



รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน SDZ ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient

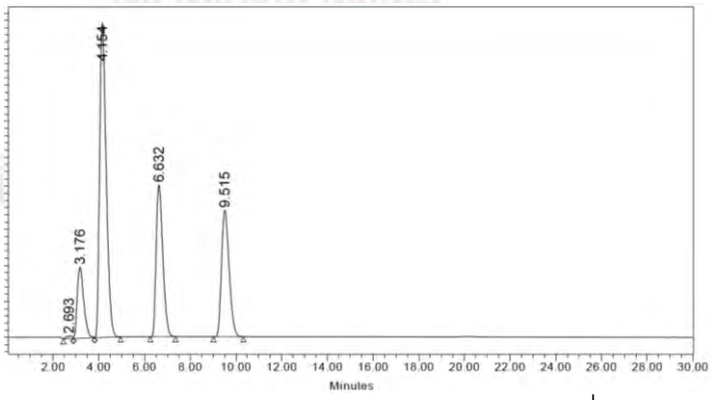


รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน SDM ที่ใช้คอลัมน์ Hibar Merck Lichropher และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient

เพื่อเป็นการยืนยันว่าปัญหา tailing นี้เกิดจากการเสื่อมสภาพของคอลัมน์จริง จึงได้ทดสอบสภาวะการแยกในคอลัมน์ใหม่ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง พบว่าพีคที่ออกมามีลักษณะของ Gausian peak โดยสมบูรณ์ จึงสรุปได้ว่าปัญหา tailing นี้เป็นผลจากการเสื่อมสภาพของ bonded phase ซึ่งส่งผลให้หมู่ silanol รบกวนการแยก

4.1.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคHPLCในการแยกสารมาตรฐาน Sulfonamide 5 ชนิด ได้แก่ STZ, SMT, STP, SMZและ SDM โดยใช้คอลัมน์ Agilent Zorbax eclipse plus C18 4.6×100 mm., 3.5 µm

1. เริ่มต้นจากการใช้ภาวะของเครื่องมือดังนี้คือ Agilent Zorbax eclipse plus C18 4.6×100 mm., 3.5 µm
   ชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยเลือกใช้ A = acetronitrile, B = 0.1% formic acid (buffer pH 2-3)
   ปริมาตรการฉีด : 10 ไมโครลิตร
   วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร
3. ทำการปรับอัตราส่วน acetronitrile : 0.1% formic acid เพื่อแยกสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิดได้ และมีลำดับการแยกคือ STZ, SMT ซึ่งรวมกับ STP, SMZ และ SDM ตามลำดับ จากผลการทดลองพีคลำดับที่ 2 และ 3 ซ้อนทับกันอยู่และซ้อนทับกันอย่างสมบูรณ์สังเกตุได้จากพีคความเข้มข้นเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับพีคอื่นๆ ดังแสดงในรูป 4.12 และได้ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อแยกพีคที่ซ้อนทับกันนั้นออกจากกัน ดังตารางที่ 4.1 แต่ไม่สามารถแยกได้และเนื่องจากระยะเวลาในการทำงานวิจัยที่จำกัดจึงตัดสาร SMT ออกจากการทดลอง

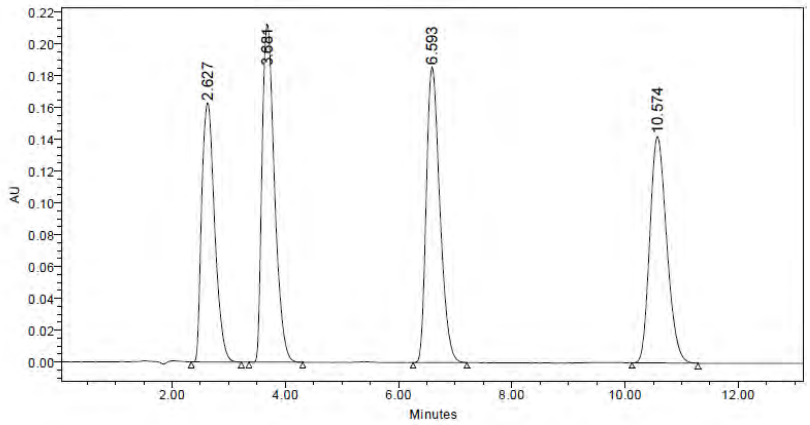


รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมของการแยกสารมาตรฐาน 5 ชนิดที่ใช้คอลัมน์ Agilent Zorbax eclipse plus C18 และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารซัลโฟนาไมด์ 5 ชนิด โดยเทคนิค HPLC, Agilent Zorbax eclipse plus C18 (4.6×100 mm., 3.5 μm)

การทดลอง	Retention time (นาที)				
	พีคที่ 1	พีคที่ 2	พีคที่ 3	พีคที่ 4	พีคที่ 5
1.isocratic : acetronitrile : 0.1% formic acid = 30:70 (%v/v),Flow rate 0.5 ml/min	3.176	4.164	4.164	6.632	9.515
2.gradient : acetronitrile : 0.1% formic acid = 25 : 75 (%v/v) เปลี่ยนเป็นอัตราส่วน 40:60 ภายในเวลา 7นาทีและเปลี่ยนไปเป็น acetonitrile 100% ภายในเวลา 8 นาที,flow rate 0.5 ml/min	3.615	4.999	4.999	9.101	14.221
3.gradient : acetronitrile : 0.1% formic acid = 20:80 (%v/v) เปลี่ยนเป็นอัตราส่วน acetronitrile : 0.1% formic acid = 35:65 (%v/v) ภายในระยะเวลา6นาที และเปลี่ยนเป็นอัตราส่วน acetronitrile 100%, Flow rate 0.5 ml/min ภายในระยะเวลา 4 นาที	4.389	6.481	6.481	13.699	18.110
4.gradient : acetronitrile : 0.1% formic acid (%v/v), เปลี่ยนเป็นอัตราส่วน acetronitrile formic acid = 40:60 (%v/v)ภายในระยะเวลา 7นาทีและเปลี่ยนเป็นอัตราส่วนacetronitrile100% ระยะเวลา 2 นาที, flow rate 0.5 ml/min	3.571	4.919	4.919	8.984	14.388

3. ทดลองปรับอัตราส่วน acetronitrile : 0.1% formic acid และอัตราการไหลวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อแยกสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 4 ชนิดได้ และมีลำดับการแยกคือ SDZ, STP, SMZ และ SDM ตามลำดับ และจากผลการทดลองแยกพีคทั้ง 4 พีค ออกจากกันได้ภายในเวลา 13 นาที โดยใช้อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนแบบ isocratic ดังนี้ acetronitrile : 0.1% formic acid = 25:75, flow rate 0.7 ml/min ดังแสดงในรูป 4.12



รูปที่ 4.13 ผลการทดลองแยกสารซัลดฟนาไมด์ 4 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC, Agilent Zorbax eclipse plus C18 (4.6×100 mm., 3.5 µm) อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ isocratic, acetonitrile : 0.1% formic acid = 25:75 และ flow rate 0.7 ml/min ภายในเวลา 13 นาที

ตารางที่ 4.2 ผลการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด โดย HPLC, Agilent Zorbax eclipse plus C18 (4.6×100 mm., 3.5 µm)

การทดลอง	Retention time (นาที)			
	พีคที่ 1	พีคที่ 2	พีคที่ 3	พีคที่ 4
1. isocratic : อัตราส่วน acetonitrile : 0.1% formic acid = 40:60, flowrate 0.5 ml/min	2.244	2.616	3.512	4.258
2. isocratic : อัตราส่วน acetonitrile : 0.1% formic acid = 35:65, flow rate 0.5 ml/min	2.404	2.922	4.265	5.535
3. isocratic : อัตราส่วน acetonitrile : 0.1% formic acid = 30:70, flow rate 0.5 ml/min	2.637	3.393	5.460	7.779
4. isocratic : อัตราส่วน acetonitrile : 0.1% formic acid = 27: 73, flow rate 0.5 ml/min	2.637	3.392	5.652	8.745

5. isocratic : อัตราส่วน acetonitrile : 0.1% formic acid = 25:75, flow rate 0.5 ml/min	3.420	4.634	8.318	13.657
6. isocratic : อัตราส่วน acetonitrile : 0.1% formic acid = 25:75, flow rate 0.7 ml/min	2.627	3.681	6.593	10.574

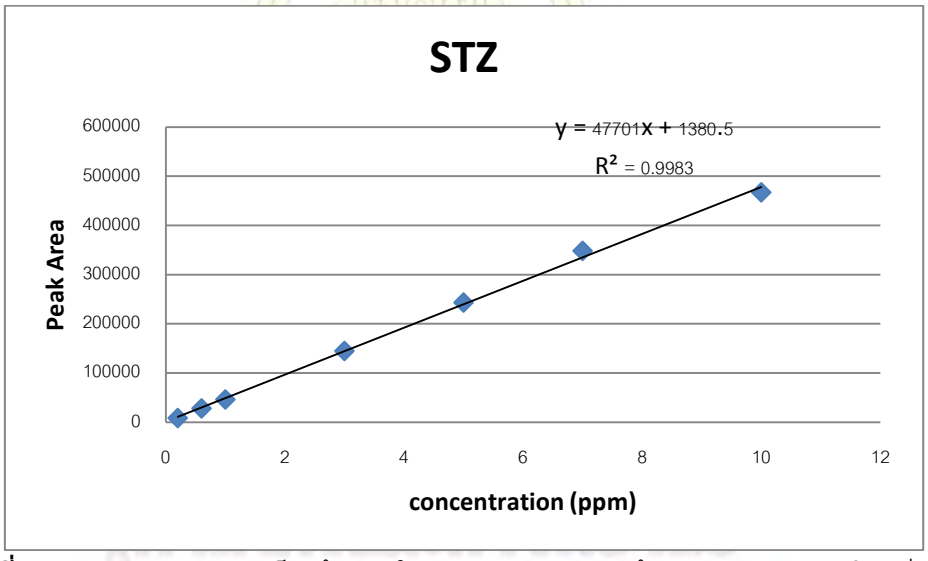
4.2 สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) และหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสารทั้ง 4 ชนิด

การวิเคราะห์หาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารกลุ่ม sulfonamides ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ STZ, STP, SMZ และ SDM ทำการทดลองโดยเลือกค่าของความเข้มข้นของสารผสมทั้งสี่ชนิดดังนี้ 0.02, 0.06, 0.2, 0.6, 1, 3, 5, 7 และ 10 ppm เมื่อเตรียมสารมาตรฐานผสมของสารทั้งสี่ชนิดตามความเข้มข้นข้างต้นแล้ว จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามสภาวะการทดลองดังนี้ วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้คือ 0.1% formic acid ผสม acetonitrile ในอัตราส่วน 75:25 ตามลำดับ flow rate ที่ใช้คือ 0.7 ml/min และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 13 นาที ผลการทดลองที่ได้พบว่าเครื่อง HPLC นี้สามารถวิเคราะห์สารทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 0.2ppm ขึ้นไป จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปสร้างกราฟเส้นตรงหรือ calibration curve โดยสารกลุ่ม sulfonamides ทั้งสี่ชนิดนั้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.2-10 ppm โดยสารแต่ละชนิดสามารถสร้างเป็นกราฟเส้นตรงได้ดังนี้

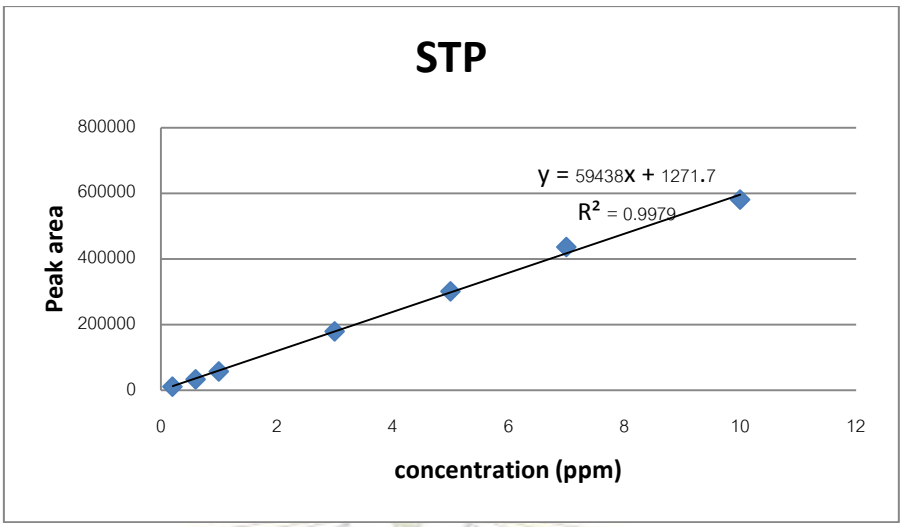
ตารางที่ 4.3 ผลการทดลองการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สารซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array

ชนิดสาร	สมการเส้นตรง	ค่า R^2
STZ	y = 47701x + 1380.5	R^2 = 0.9983
STP	y = 59438x + 1271.7	R^2 = 0.9979
SMZ	y = 59599x - 1471.5	R^2 = 0.9999
SDM	y = 55935x - 616.58	R^2 = 0.9992

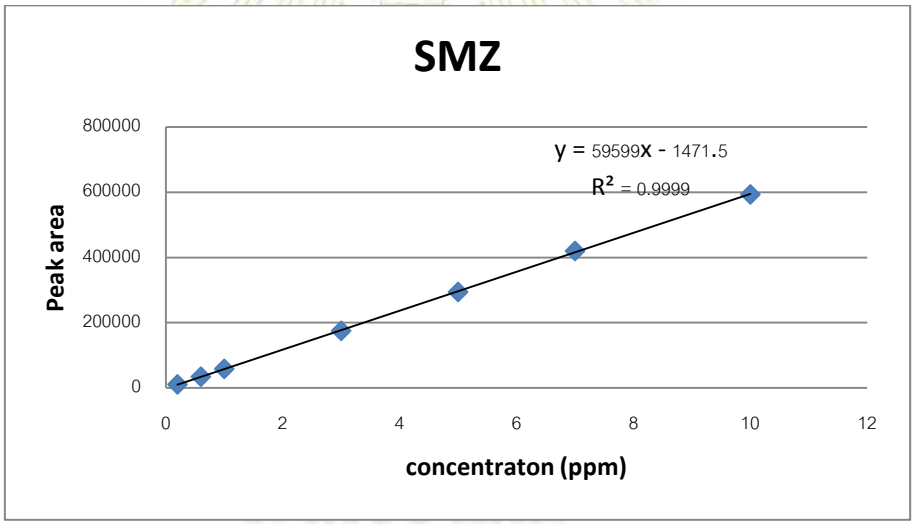
จากค่า R^2 ของความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นที่ได้ จะเห็นได้ว่าสารทั้งสี่ชนิดมีค่า R^2 มากกว่า 0.9900 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ จึงสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้เหมาะสมในการหาปริมาณ STZ, STP, SMZ และ SDM ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.2ppm – 10ppm และเนื่องจากว่าในแต่ละความเข้มข้นของสารผสมกลุ่ม sulfonamides ที่มีการวิเคราะห์ได้มีการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 5 ครั้งเพื่อศึกษาความเที่ยงของเทคนิค HPLC นี้ด้วย จากผลการคำนวณที่ได้พบว่าการวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamides ทั้งสี่ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.2 ppm มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 4-10, ความเข้มข้น 0.6 ppm ค่า %RSD อยู่ในช่วง 2-6, ความเข้มข้น 1 ppm ค่า %RSD อยู่ในช่วง 1-4, ความเข้มข้น 3 ppm ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.3-2, ความเข้มข้น 5 ppm ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.5-2, ความเข้มข้น 7 ppm ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.5-2 และความเข้มข้น 10 ppm ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.3-2 ซึ่งจากค่า %RSD ที่ได้นั้นพบว่าที่ความเข้มข้นน้อยอย่าง 0.2 ppm มีค่า %RSD ที่สูงดังนั้นหากวิเคราะห์สารที่ความเข้มข้นดังกล่าวหรือที่ความเข้มข้นต่ำจะได้ผลการทดลองที่มีความเที่ยงค่อนข้างน้อยกว่าการวิเคราะห์สารที่ค่าความเข้มข้นสูงที่จะมีความเที่ยงมากกว่านั้นเอง



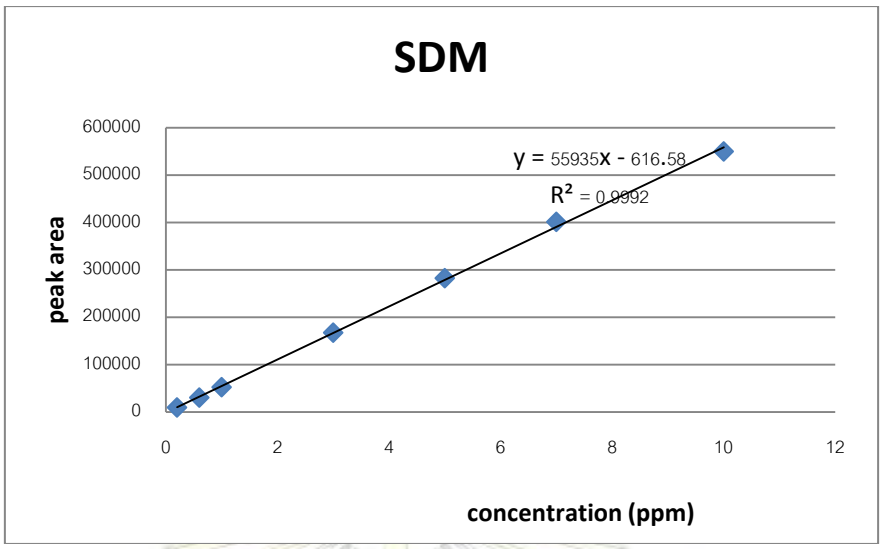
รูปที่ 4.14 กราฟช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด STZ ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array



รูปที่ 4.15 กราฟช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด STP ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array



รูปที่ 4.16 กราฟช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด SMZ ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array



รูปที่ 4.17 กราฟช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด SDM ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array

เมื่อได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะในการวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamide ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ STZ, STP, SMZ และ SDM ด้วยเทคนิค HPLC แล้ว จากนั้นผู้ทดลองจึงได้มาทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่างของสารกลุ่ม sulfonamide ต่อ

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำตัวอย่าง

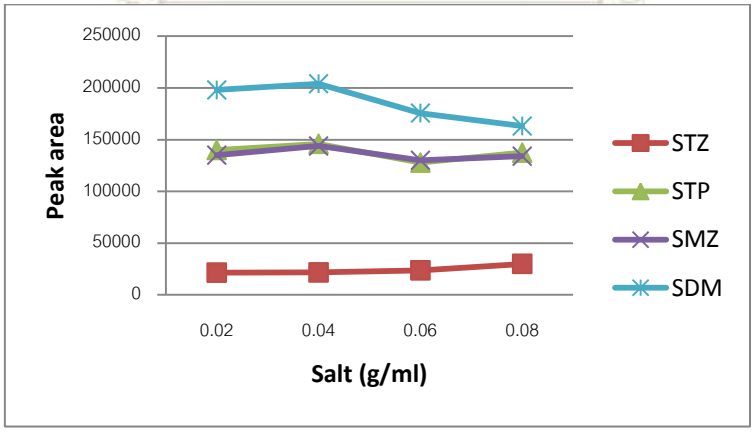
4.3.1 ศึกษาชนิดและปริมาณตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายที่เหมาะสม

ชนิดและปริมาณของทั้งตัวทำละลายสกัด (extraction solvent) และ ตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย (disperser solvent) เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการสกัดด้วยเทคนิค DLLME โดยตัวทำละลายสกัดนั้นต้องเป็นตัวทำละลายที่มีความมีขั้วต่ำ นิยมใช้สารกลุ่ม halogenated hydrocarbon ผู้ทดลองจึงทำการทดลองเปรียบเทียบตัวทำละลายสกัด 2 ชนิด ได้แก่ chloroform และ dichloromethane ร่วมกับทำการทดลองเปรียบเทียบตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย 2 ชนิดเช่นกัน ได้แก่ methanol และ ethanol โดยผู้ทดลองได้เปรียบเทียบปริมาณตัวทำละลายสกัดที่แตกต่างกันดังนี้ 600, 800, 1000 และ 1200 ไมโครลิตร พร้อมๆกับทำการทดลองเปรียบเทียบตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายปริมาณแตกต่างกันดังต่อไปนี้ 500, 1000, 1500 และ 2000 ไมโครลิตร โดยจากผลการทดลองพบว่าหากใช้ตัวทำละลายสกัดเป็น dichloromethane ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ร่วมกับตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายเป็น ethanol ปริมาตร 1500 ไมโครลิตร นั้นให้ผลการทดลองคือพื้นที่ใต้พีคที่ดีที่สุดซึ่ง

แสดงถึงปริมาณสารที่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบผลกับสภาวะอื่นๆ แต่ภายหลังการสกัดนั้นจะเกิดอิมัลชันเล็กน้อย

4.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของเกลือในน้ำตัวอย่างที่เหมาะสม

จากการทดลองในขั้นตอนการศึกษาชนิดและปริมาณตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยแพร่กระจายในข้อ 4.3.1 พบว่ามีอีมัลชันเกิดขึ้นเล็กน้อยซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้โดยการเติมเกลือ ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีว่า การเติมเกลือลงไประหว่างการสกัดจะเพิ่ม ionic strength ของวัฏภาคน้ำ ให้ให้เกิดการแยกชั้นระหว่างวัฏภาคน้ำกับวัฏภาคอินทรีย์ได้ดีขึ้นจึงสามารถแก้ปัญหาอีมัลชันได้ นอกจากนั้นแล้วการที่ ionic strength ของวัฏภาคน้ำเพิ่มขึ้นยังช่วยให้ได้สารตัวอย่างกระจายอยู่ในวัฏภาคอินทรีย์เพิ่มขึ้นอีกด้วย โดยเกลือที่ผู้ทดลองเลือกใช้คือเกลือ sodium chloride ซึ่งเป็นเกลือที่หาได้ง่าย ราคาถูก และมีอยู่แล้วภายในห้องปฏิบัติการ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบว่าความเข้มข้นของเกลือในน้ำตัวอย่างดังนี้ ความเข้มข้นเกลือ 0.01, 0.02, 0.04 และ 0.06 g/ml จากผลการทดลองพบว่าการเติมเกลือนั้นช่วยแก้ปัญหาการเกิดอิมัลชันได้จริงแม้จะมีความเข้มข้นของเกลือเพียง 0.01 g/ml แต่ในแง่ผลการสกัดนั้นพบว่าหากใช้เกลือความเข้มข้น 0.04 g/ml นั้นให้ผลการทดลองที่ดีกว่าผลการทดลองอื่นๆ ดังนั้นผู้ทดลองจึงเลือกให้ความเข้มข้นของเกลือในน้ำตัวอย่างกับ 0.04 g/ml ดังรูปที่ 4.17

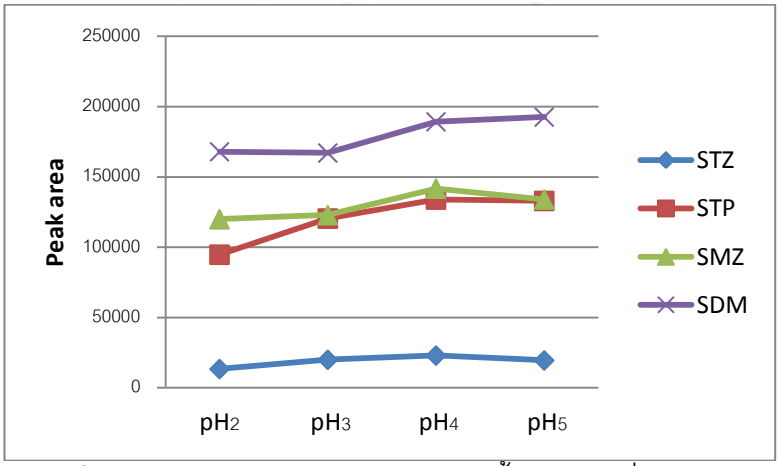


รูปที่ 4.18 ผลการทดลองศึกษาผลการใช้เกลือ (sodium chloride) และความเข้มข้นของเกลือ (sodium chloride) ในน้ำตัวอย่างที่เหมาะสม

จากรูปที่ 4.17 พบว่าผลการทดลองคือ ที่ความเข้มข้นเกลือมากกว่า 0.04 g/ml ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มลดลง ซึ่งไม่เป็นไปตามแนวโน้มที่ว่าหากเติมเกลือเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ ionic strength ในวัฏภาคน้ำเพิ่มขึ้น สารตัวอย่างจะกระจายในวัฏภาคอินทรีย์มากขึ้น หากผู้วิจัยมีเวลาเพิ่มมากขึ้นอาจจะทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงสาเหตุที่ผลการทดลองไม่เป็นไปตามแนวโน้ม หรือทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อนำผลการทดลองมาศึกษาแนวโน้มต่อไป

4.3.3 ศึกษา pH ของน้ำตัวอย่างที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่าง

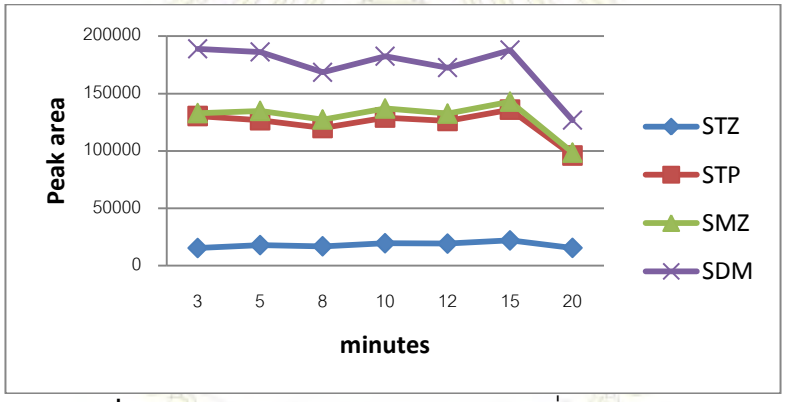
จากการศึกษาสภาวะการเตรียมน้ำตัวอย่างที่เหมาะสมที่ในหัวข้อ 4.3.1 และ 4.3.2 นั้น น้ำตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดได้มีการความคุมให้มี pH เท่ากับ 5 แล้วนั้นต่อมาผู้ทดลองได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของ pH ต่อประสิทธิภาพการสกัด จากทฤษฎี pH ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดควรมีค่าต่ำกว่าค่า pK_a ของสารตัวอย่างเพื่อไม่ให้สารตัวอย่างแตกตัวให้ H^+ เนื่องจากหากเกิดการแตกตัวของสารตัวอย่างแล้วจะทำให้สารตัวอย่างละลายได้ในวัฏภาคน้ำเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการสกัดลดน้อยลง โดยค่า pK_a ของสารตัวอย่างกลุ่มซัลโฟนาไมด์มีค่ามากกว่า 5.5 จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบที่ pH น้ำตัวอย่างที่แตกต่างกันคือ pH2, pH3, pH4 และ pH5 ทำการปรับ pH น้ำตัวอย่างด้วยสารละลายกรด formic เข้มข้นให้ได้ pH ตามต้องการ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าน้ำตัวอย่างที่ pH4 ให้ประสิทธิภาพในการสกัดมากที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้น้ำตัวอย่าง pH4 ในการทดลอง ดังแผนภาพต่อไปนี้



รูปที่ 4.19 ผลการทดลองศึกษา pH ของน้ำตัวอย่างที่เหมาะสม

4.3.4 ศึกษาระยะเวลาใช้ในการเขย่า

เทคนิคการสกัดนี้หลังจากการฉีดตัวทำละลายผสมลงไปในน้ำตัวอย่างที่เติมเกลือและปรับ pH แล้วนั้นจะต้องทำการเขย่าโดยจากการศึกษาสภาวะการเตรียมน้ำตัวอย่างที่ผ่านมานั้นควบคุมระยะเวลาการสกัดที่ 10 นาที ในความจริงแล้วระยะเวลาที่ใช้สกัดที่เหมาะสมที่สุดคือระยะเวลาที่ทำให้เกิดสมดุลการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างวัฏภาคน้ำกับวัฏภาคอินทรีย์ ดังนั้นในขั้นตอนนี้ผู้ทดลองจะศึกษาระยะเวลาที่เขย่าหลอดสกัดที่เหมาะสมและให้ประสิทธิภาพสูงสุด โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาในการเขย่าที่ 3, 5, 8, 10, 12, 15 และ 20 นาที จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาการสกัดที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดคือที่ 15 นาที โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัดเป็น 20 นาทีนั้นให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันพร้อมกับมีแนวโน้มที่ให้ประสิทธิภาพลดลงอีกด้วย ดังนั้นระยะเวลาสกัดที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคนี้คือ 15 นาที ดังรูป 4.19



รูปที่ 4.20 ผลการทดลองศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่า

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่างทั้งหมดนั้นสามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่างในงานวิจัยชิ้นนี้คือ ใช้ dichloromethane ปริมาตร 1000 ไมโครลิตรเป็นตัวทำละลายสกัด, ethanol ปริมาตร 1500 ไมโครลิตร เป็นตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย, น้ำตัวอย่าง pH4, ความเข้มข้นของเกลือในน้ำตัวอย่าง 0.04 g/ml และเวลาเขย่า 15 นาที

4.4 ตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค (method validation)

4.4.1 **ความจำเพาะในการตรวจวัดสาร** (selectivity)

ความจำเพาะในการตรวจวัดสารวิเคราะห์จากค่า retention time ของสารกลุ่ม sulfonamide แต่ละชนิดได้แก่ STZ, STP, SMZ และ SDM โดยการสกัดสารกลุ่ม sulfonamide ที่ระดับความเข้มข้น 0.4, 3 และ 7 ppm ซ้ำ 5 ครั้ง และคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของสารกลุ่ม sulfonamide ทั้ง 4 ชนิด ได้ค่า SD ดังนี้

ตารางที่ 4.4 ผลการทดลองการศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดสาร ของสารซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC แสดงโดยค่า SD ของ retention time สารแต่ละชนิด

สาร	retention time ±SD
STZ	2.597±0.028
STP	3.670±0.027
SMZ	7.128±0.064
SDM	11.412±0.129

จากค่า SD สารทั้ง 4 ชนิดนั้นพบว่าค่า SD ของสารทั้งสี่ชนิดมีค่าน้อยซึ่งแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วยเทคนิค HPLC นี้มีความจำเพาะต่อสารแต่ละชนิด ณ retention time หนึ่ง ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้มี selectivity ที่ดีสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamide ดังกล่าว

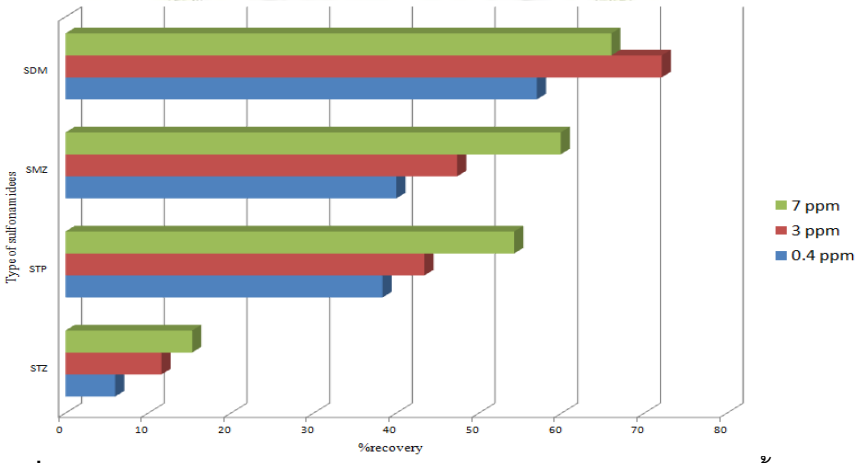
4.4.2 **หาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์สารหลังการสกัด**

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วยเทคนิค HPLC ในหัวข้อ 4.2 นั้นจึงได้นำความน้ำตัวอย่างที่มีสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ความเข้มข้น 0.2, 0.6, 1, 3, 5 และ 7 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์มาทำการสกัดเพื่อศึกษาว่าความเข้มข้นภายหลังการสกัดใดที่ยังอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงดังกล่าวอยู่บ้าง พบว่าสาร STZ ที่ความเข้มข้นก่อนสกัด 1-7 ppm ภายหลังการสกัดมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงการวิเคราะห์ และสาร STP, SMZ และ SDM ที่ความเข้มข้นก่อนสกัด 0.2-1 ppm ภายหลังการสกัดมีความเข้มข้นอยู่

ในช่วงความเป็นเส้นตรง ดังนั้นหากต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นอื่นควรมีการปรับปริมาณตัวทำละลายให้เหมาะสมต่อไป

4.4.3 **ผลการได้กลับคืน** (recovery)

ผลการได้กลับคืนในการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณนั้นบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการสกัด มีค่าเท่ากับปริมาณสารที่เปรียบเทียบระหว่างปริมาณที่ได้หลังจากการสกัดและปริมาณสารก่อนการสกัดเพื่อวิเคราะห์ว่าสารชนิดใดสามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์ได้บ้าง โดย %recovery ที่ได้นั้นคำนวณจากการสกัดสารกลุ่ม sulfonamide ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.4, 3 และ 7 ppm โดยทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง พบว่า สาร STZ หลังจากผ่านการสกัดนั้นมีความเข้มข้นที่ลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด หลังจากที่คำนวณค่า %recovery แล้วได้ค่าอยู่ในช่วง 5-15% จึงสามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนว่าสาร STZ นั้นไม่เหมาะแก่การสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ ต่อมาคือสาร STP ซึ่งหลังผ่านการสกัดแล้วได้คำนวณค่า %recovery ได้ประมาณ 40-55% สาร SMZ หลังจากผ่านการสกัดแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วนั้น ผลที่ได้คำนวณค่า %recovery ได้ประมาณ 40-60% และสุดท้ายคือสาร SDM ที่หลังจากผ่านการสกัดนั้นมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอยู่มาก ผลที่ได้คำนวณหา %recovery ได้ค่าประมาณ 50-75% เมื่อเทียบผลการวิเคราะห์สาร STP, SMZ และ SDM ร่วมกับผลการทดลองจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องนั้นพบว่า ได้ %recovery ในระดับที่ใกล้เคียงเคียงกัน โดยเฉพาะ SDM ให้ผล %recovery ที่สูงกว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง สามารถบอกได้ว่าเทคนิคนี้เหมาะที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์สาร STP, SMZ และ SDM ได้ดี



รูปที่ 4.21 กราฟผลการสกัด % recovery ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 4 ชนิด

4.4.4 **ความเที่ยง** (precision)

ความเที่ยงในการวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamide ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ STZ, STP, SMZ และ SDM พิจารณาจากค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หรือ %RSD โดยคำนวณจากผลการทดลองการวิเคราะห์สารมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 0.4, 3 และ 7 ppm ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง จากผลที่ได้พบว่า สาร STZ เป็นสารที่ไม่เหมาะแก่การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีค่า %RSD เฉลี่ยเท่ากับ 7.45 สาร STP มีค่า %RSD เฉลี่ยเท่ากับ 3.67 สาร SMZ มีค่า %RSD เฉลี่ยเท่ากับ 5.93 และสาร SDM มีค่า %RSD เฉลี่ยเท่ากับ 5.52 โดยเมื่อเทียบผลการวิเคราะห์ร่วมกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีค่า %RSD อยู่ในช่วง 3-9 ดังนั้นจึงมารถบอกได้ว่าเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความเที่ยงดี สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamide ดังกล่าวได้จริง

4.4.5 **ขีดจำกัดค่าต่ำสุดในการวิเคราะห์** (limit of detection)

ขีดจำกัดค่าตำสุดในการวิเคราะห์ คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เทคนิคสามารถตรวจวัดได้หรือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ให้ความสูงของสัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise) ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่า LOD ของเทคนิคอยู่ในระดับสิบ ppb หรือไมโครกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมสารตัวอย่างนี้สามารถตรวจวัดสารที่ความเข้มข้นต่ำในระดับไมโครกรัมต่อลิตรได้ ดังตาราง 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการทดลองศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดการวิเคราะห์ และขีดจำกัดต่ำสุดการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด

สาร	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
STZ	0.03	0.16
STP	0.03	0.12
SMZ	0.07	0.18
SDM	0.07	0.19

ซึ่งสาเหตุที่ค่า LOD ของเทคนิคไม่สามารถต่ำจนถึงระดับหน่วยไมโครกรัมต่อลิตรได้นั้นอาจจะมีสาเหตุมาจาก detector ที่ใช้มีความไวต่ำ

4.4.6 **ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ** (limit of quantization, LOQ)

ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เทคนิคนี้สามารถระบุปริมาณได้แน่นอน หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ความสูงสัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise) ซึ่งจากผลการทดลองเห็นได้ว่า LOQ ของเทคนิคนี้อยู่ในระดับร้อยไมโครกรัมต่อลิตรขึ้นไปเป็นระดับที่ถือว่าค่อนข้างต่ำ ดังตาราง 4.5 ซึ่งสาเหตุที่ค่า LOD ของเทคนิคไม่สามารถต่ำมากไปกว่าระดับร้อยไมโครกรัมต่อลิตรได้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการพัฒนาวิธีการเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สาร PPCPs กลุ่ม sulfonamide 6 ชนิดได้แก่ sulfathiazole (STZ), sulfamethoxypyridine (STP), sulfamethoxazole (SMZ), sulfadimethoxine (SDM), sulfadiazine (SDZ) และ sulfamethazine (SMT)โดยอาศัยหลักการจากเทคนิค Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) เพื่อเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดสารเป็น photo diode array เกิดปัญหาเนื่องจากสารมาตรฐาน SDZ เกิดปัญหาจึงมีความจำเป็นต้องตัดสาร SDZ ออกจากแผนการทดลอง และสาร SMT ผลการวิเคราะห์นั้นเป็นพีคที่ซ้อนทับกันโดยสมบูรณ์กับสาร STP ซึ่งไม่สามารถแก้ปัญหาได้จึงมีความจำเป็นต้องตัด SMT ออกจากแผนการทดลองเช่นกัน ดังนั้นสารที่ทำการวิเคราะห์จึงมี 4 ชนิด ได้แก่ STZ, STP, SMZ และ SDM ซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังนี้

5.1 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วยเทคนิค HPLC และใช้เครื่องตรวจวัดแบบ photo diode array สรุปผลได้ดังนี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 สรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC

ตัวแปร	สภาวะการทดลองที่ใช้
ชนิดคอลัมน์ (column)	Agilent Zorbax eclipse plus C18 4.6×100 mm., 3.5 μm
วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)	A (25%) = acetonitrile, B (75%)=0.1% formic acid (pH2-3)
อัตราการไหล (flow rate)	0.7 ml/min
ปริมาตรการฉีด (injection volume)	10 ไมโครลิตร
อุณหภูมิคอลัมน์ (temperatures)	25 องศาเซลเซียส
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (run time)	13 นาที
เครื่องตรวจวัด (detector)	photo diode array, ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร
ลำดับการแยก	STZ, STP, SMZ และ SDM ตามลำดับ

5.2 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่าง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยใช้หลักการของ DLLME เพื่อเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS สรุปผลได้ดังนี้

ตารางที่ 5.2 สรุปผลการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อศึกษาสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยอาศัยหลักการของ DLLME

ตัวแปร	สภาวะที่ใช้
ตัวทำละลายสกัด (extraction solvent)	dichloromethane 1000 ไมโครลิตร
ตัวทำละลายช่วยแพร่กระจาย (disperser solvent)	ethanol 1500 ไมโครลิตร
ความเข้มข้นของเกลือในน้ำตัวอย่าง	sodium chloride 0.04 g/ml
ค่า pH น้ำตัวอย่าง	pH 4
ระเวลาในการเขย่า	15 นาที

5.3 ตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองมาแล้วนั้น ต่อไปได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิคเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

ตารางที่ 5.3 สรุปผลการทดลองการตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิคในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ 4 ชนิด

ตัวแปรการตรวจสอบ	ค่าที่ได้จากการตรวจสอบ
ช่วงความเป็นเส้นตรงการตรวจสอบปริมาณ	0.2 – 10 ppm
ค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2)	มากกว่า 0.9900 (n=5)
ความจำเพาะในการตรวจสอบ (selectivity)	$t_R \pm$ 0.02 - 0.1
ความแม่นในการวิเคราะห์ (accuracy)	%recovery (STZ) = 5-15%
	%recovery (STP, SMZ และ SDM) = 40-75%
ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (precision)	%RSD = 3-9%
ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจสอบ (LOD)	20-40 ไมโครกรัมต่อลิตร
ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ)	100-300 ไมโครกรัมต่อลิตร
ประสิทธิภาพในการสกัด (Enrichment factor)	3 เท่า

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

[1] http://www.epa.gov/ppcp/ (accessed January 16,2013)

[2] http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/ppcp/index.cfm

[3] N. Aroyo-Manzanares, L. Gamiz-Gracia, A.M. Gracia-Campana, Alternative samples treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection, Food Chemistry 143 (2014) 459-464.

[4] A.J. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 75 (2013) 130-137.

[5] A. Pamreddy, M. Haidalgo, J. Havel, V. Salvado, Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography –tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1298 (2013) 68-75.

[6] J.M. Brausch, G.M. Rand, A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity, Chemoshpere 82 (2011) 1518-1532.

[7] M. Pedrouzo. F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, Analytical methods for personal-care products in environmental waters, TRAc, 30 (2011) 749.

[8] L. Sun, L. Chen, X. Sun, X. Du, Y. Yue, D. He, H. Xu, Q. Zeng, H. Wang, L. Ding, Analysis of sulfonamides in environmental water samples base on magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with HPLC-UV detection, Chemosphere 77 (2009) 1306-1312.

[9] L. Che-Yi, H. Shang-Da, Application of liquid-liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of sulfonamide in water, Analytica Chimica Acta 612 (2008) 37-43.

[10] J. Raich-Montiu, J. Folch, R. Compano, M. Granados, M.D. Prat, Analysis of trace level of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence, J.Chromatogr. A 1172 (2007) 186-193.

[11] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, J. Chromatogr. A. 1116 (2006) 1-9.

[12] A. Aaberg, D. Pedersen, K. Tjessem, Factors affecting the extraction of polar environmental constituents from water, Water Res. 19 (1985) 169.

[13] John M. Kokosa, Solvent microextraction, 2009, 19-37.

[14] วัชรี ชาตกิตติคุณวงศ์, โครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง, พิมพ์ครั้งที่ 2: สำนักพิมพ์ รามคำแหง, 2544

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตาราง ก.1 ตารางบันทึกผลการทดลองหาช่วงความเป็นเส้นตรงของ STZ ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค					เฉลี่ย	SD	%RSD
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5			
0.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
0.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
0.2	8867	9522	8724	8435	7849	8679.4	611.648	7.05
0.6	28559	29159	26378	28222	29164	28296.4	1145.814	4.05
1	45122	47545	47577	46413	45650	46461.4	987.2646	2.12
3	144120	144783	145293	145215	145532	144988.6	555.8636	0.38
5	243231	242750	241374	246656	243595	243521.2	1944.341	0.8
7	343190	352796	343700	349955	353260	348580.2	4858.863	1.4
10	469808	471163	467835	465686	463158	467530	3201.395	0.68

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ก.2 บันทึกผลการทดลองหาช่วงความเป็นเส้นตรงของ STP ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค					เฉลี่ย	SD	%RSD
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5			
0.02	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
0.06	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
0.2	11482	11985	11847	10934	10810	11411.6	527.5749	4.62
0.6	32350	33919	34027	34904	33479	33735.8	931.3215	2.76
1	57394	57206	58766	57863	57000	57645.8	702.8351	1.22
3	179430	179911	176315	179746	183211	179722.6	2444.5	1.36
5	300713	295577	299945	305649	306238	301624.4	4407.516	1.46
7	435986	435418	434211	436357	441310	436656.4	2725.284	0.62
10	578942	576938	577462	592516	579293	581030.2	6495.772	1.12

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ก.3 บันทึกผลการทดลองหาช่วงความเป็นเส้นตรงของ SMZ ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค					เฉลี่ย	SD	%RSD
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5			
0.02	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
0.06	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
0.2	9221	10722	11256	11883	11746	10965.6	1076.795	9.82
0.6	35587	33777	34084	35094	34659	34640.2	734.3689	2.12
1	59334	59246	55446	58019	60891	58587.2	2030.345	3.47
3	174146	176919	172302	174435	178821	175324.6	2553.601	1.46
5	293593	297379	295540	291884	293262	294331.6	2146.346	0.73
7	419586	421653	416196	422106	419807	419869.6	2332.471	0.56
10	595575	590108	594857	592217	593409	593233.2	2176.649	0.37

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ก.4 บันทึกผลการทดลองหาช่วงความเป็นเส้นตรงของ SDM ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค					เฉลี่ย	SD	%RSD
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5			
0.02	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
0.06	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
0.2	7946	9662	9876	12339	9429	9850.4	1583.793	16.07
0.6	30685	31009	30921	28017	32816	30689.6	1719.008	5.6
1	54206	53166	53164	51223	51531	52658	1248.975	2.37
3	168141	169897	167077	167185	165744	167608.8	1537.774	0.92
5	285078	280846	282438	283329	281418	282621.8	1671.035	0.59
7	396174	405588	395475	403604	406214	401411	5195.855	1.29
10	26969	27361	27520	27469	27423	27348.4	196.8041	0.72

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข.1 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ STZ ที่ความเข้มข้น 0.4 ppm

Concentration 0.4 ppm					
No.	retention time (min)	peak area	conc. (ppm)	Volumn (ml)	%recovery
1	2.547	5563	0.15	1	7.5
2	2.577	5472	0.09	1	4.5
3	2.628	6989	0.12	1	6
~~4~~	~~2.655~~	~~4099~~		~~1~~	
5	2.537	7138	0.12	1	6
Mean	2.57225	6290.5	0.12		6
SD	0.040869	895.4249	0.024495		
%RSD	1.59	8.96	20.41		

ตารางที่ ข.2 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ STZ ที่ความเข้มข้น 3.0 ppm

Concentration 3 ppm					
No.	retention time (min)	peak area	conc.(ppm)	Volumn(ml)	%recovery
1	2.617	77610	1.6	1	10.67
2	2.612	90013	1.86	1	12.4
3	2.608	78761	1.62	1	10.8
4	2.633	83791	1.73	1	11.53
5	2.583	91441	1.89	1	12.6
Mean	2.6106	84323.2	1.74		11.6
SD	0.018119	6311.206	0.133229		
%RSD	0.69	7.48	7.64		

ตารางที่ ข.3 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ STZ ที่ความเข้มข้น 7.0 ppm

Concentration 7 ppm					
No.	retention time (min)	peak area	conc.(ppm)	Volumn (ml)	%recovery
1	2.614	276433	5.77	1	16.49
2	2.612	258480	5.39	1	15.4
3	2.583	253541	5.29	1	15.11
4	2.591	239552	4.99	1	14.26
~~5~~	~~2.583~~	~~149502~~		~~1~~	
Mean	2.6	257001.5	5.36		15.315
SD	0.015384	15234.05	0.32187		
%RSD	0.59	5.92	6		

ตารางที่ ข.4 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ STP ที่ความเข้มข้น 0.4 ppm

Concentration 0.4 ppm				
No.	retention time (min)	peak area	conc. (ppm)	%recovery
~~1~~	~~3.647~~	~~35716~~		
2	3.695	44553	0.73	36.5
3	3.686	47968	0.79	39.5
~~4~~	~~3.684~~	~~27505~~		
5	3.657	47750	0.78	39
Mean	3.679333	46757	0.766667	38.33333
SD	0.019858	1911.83	0.032146	
%RSD	0.54	4.08	4.19	

ตารางที่ ข.5 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ STP ที่ความเข้มข้น 3.0 ppm

Concentration 3 ppm				
No.	retention time (min)	peak area	conc. (ppm)	%recovery
1	3.694	428191	7.18	47.87
2	3.683	429344	7.2	48
3	3.699	414418	6.95	46.33
4	3.711	417393	7	46.67
5	3.641	474423	7.96	53.07
Mean	3.6856	432753.8	7.258	48.388
SD	0.026885	24191.55	0.407333	
%RSD	0.73	5.59	5.61	

ตารางที่ ข.6 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ STP ที่ความเข้มข้น 7.0 ppm

Concentration 7 ppm				
No.	retention time (min)	peak area	conc. (ppm)	%recovery
1	3.692	1218094	20.47	58.49
2	3.678	1342275	22.56	64.45
3	3.661	1114139	18.72	53.49
4	3.648	983209	16.52	47.2
5	3.65	992886	16.68	47.66
Mean	3.6658	1130121	18.99	54.258
SD	0.018873	152823.9	2.571245	
%RSD	0.51	1.35	1.35	

ตารางที่ ข.7 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ SMZ ที่ความเข้มข้น 0.4 ppm

Concentration 0.4 ppm				
No.	retention time(min)	peak area	conc. (ppm)	%recovery
~~1~~	~~6.931~~	~~34188~~		
2	7.116	43168	0.75	37.5
3	7.158	49405	0.85	42.5
~~4~~	~~7.179~~	~~29041~~		
5	7.052	46452	0.8	40
Mean	7.108667	46341.6667	0.8	40
SD	0.053379	3119.96351	0.05	
%RSD	0.75	6.73	6.25	

ตารางที่ ข.8 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ SMZ ที่ความเข้มข้น 3.0 ppm

Concentration 3 ppm				
No.	retention time (min)	peak area	conc.(ppm)	%recovery
1	7.176	431748	7.27	48.47
2	7.132	421879	7.1	47.33
3	7.183	415422	6.99	46.6
~~4~~	~~7.196~~	~~202211~~		
5	7.216	418730	7.05	47
Mean	7.17675	421944.8	7.1025	47.35
SD	0.034558	7047.196	0.120381	
%RSD	0.48	1.67	1.69	

ตารางที่ ข.9 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ SMZ ที่ความเข้มข้น 7.0 ppm

Concentration 7 ppm				
No.	retention time (min)	peak area	conc. (ppm)	%recovery
1	7.209	1251905	21.03	60.09
~~2~~	~~7.097~~	~~785572~~		
3	7.142	1362830	22.89	65.4
4	7.05	1128164	18.95	54.14
~~5~~	~~7.122~~	~~577580~~		
Mean	7.133667	1247633	20.95667	59.87667
SD	0.079827	117391.3	1.971023	
%RSD	1.12	9.41	9.4	

ตารางที่ ข.10 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ SDM ที่ความเข้มข้น 0.4 ppm

Concentration 0.4 ppm				
No.	retention time (min)	peak area	conc. (ppm)	%recovery
~~1~~	~~11.293~~	~~49083~~		
2	11.513	58778	1.06	53
3	11.539	66109	1.19	59.5
~~4~~	~~11.406~~	~~37293~~		
5	11.405	64510	1.16	58
Mean	11.48567	63132.33	1.14	57
SD	0.071059	3854.785	0.08	
%RSD	0.62	6.11	7.02	

ตารางที่ ข.11 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ SDM ที่ความเข้มข้น 3.0 ppm

Concentration 3 ppm				
No.	retention time (min)	peak area	conc. (ppm)	%recovery
1	11.534	604413	10.82	72.13
2	11.478	590697	10.57	70.47
3	11.543	586215	10.49	69.93
4	11.55	601490	10.76	71.73
5	11.283	639167	11.44	76.27
Mean	11.4776	604396.4	10.816	72.106
SD	0.112438	20830.74	0.373938	
%RSD	0.98	3.45	3.46	

ตารางที่ ข.12 บันทึกผลการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคของ SDM ที่ความเข้มข้น 7.0 ppm

Concentration 7 ppm				
No.	retention time (min)	peak area	conc. (ppm)	%recovery
~~1~~	~~11.416~~	~~1739401~~		
2	11.203	1389341	24.85	71
3	11.288	1210519	21.65	61.86
~~4~~	~~11.362~~	~~735527~~		
5	11.314	1275301	22.81	65.17
Mean	11.26833	1291720	23.10333	66.01
SD	0.058055	90534.65	1.620041	
%RSD	0.52	7	7.01	

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว สุวพัชร ใยบัวเทศ เกิดเมื่อวันที่ 31 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2534 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมปลาย สายสามัญ (แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) จากโรงเรียนสารวิทยา เมื่อปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2552 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี99/285 ซ. พหลโยธิน 50 ถ. พหลโยธิน แขวง อนุสาวรีย์ เขต บางเขน จังหวัด กรุงเทพมหานคร โทรศัพท์ 086-784-7999

นางสาว กันต์ธีรา คำภีระ เกิดเมื่อวันที่ 9 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2534 ที่จังหวัด สระบุรี สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมปลาย สายสามัญ (แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) จากโรงเรียนสระบุรีวิทยาคม เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2553 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 5/2 หมู่ 12 ต.ห้วยป่าหวาย อ.พระพุทธบาท จังหวัด สระบุรี 18120 โทรศัพท์ 089-745-4112

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย