

การตรวจวัดปริมาณไอโอดีน ไอโอเดต ออกซาเลตและซิเตรตในผลิตภัณฑ์อาหาร
ด้วยเทคนิคอะพอลาร์อิเล็กโทรโฟรีซิส

Determination of iodide, iodate, oxalate and citrate in food products using
capillary electrophoresis

โดย

นางสาวพัชรพร อ่อนทอง

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

เรื่อง การตรวจวัดปริมาณไอโอไดด์ ไอโอเดต ออกซาเลตและซีเทรตในผลิตภัณฑ์อาหาร
ด้วยเทคนิคอะทราจิวรีอเล็กโทรฟอริซิส


โดย นางสาวพัชรพร อ่อนทอง

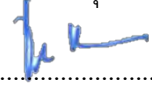
ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา


ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ


.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศากุล)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนง หนูจักร)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คณศ วงษ์ระวี)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่..... เดือน.....พ.ศ.....

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การตรวจวัดปริมาณไอโอไดต์ ไอโอเดต ออกซาเลตและซิเทรต
ในผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเทคนิคอะทิลลารีอิลีกโทรฟอริซิส

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวพัชรพร อ่อนทอง เลขประจำตัว 5533122223

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมบุญ หนูจักร

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคอะทิลลารีอิลีกโทรฟอริซิสมาใช้ในการหาปริมาณออกซาเลตและซิเทรตในชาแบบซอง และไอโอไดต์และไอโอเดตในซอสปรุงรสเสริมไอโอดีน สำหรับการวิเคราะห์ออกซาเลตและซิเทรตได้ใช้อะทิลลารีอิลีกโทรฟอริซิสที่ปราศจากการเคลือบผิวภายใน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 74.3 ไมโครเมตรความยาวรวม 60.2 เซนติเมตร (50 เซนติเมตรถึงตัวตรวจวัด) ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า -20 กิโลโวลต์อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้ประกอบด้วยบอแรตความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเตตระเอซีลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7.0 และตรวจวัดด้วยยูวี-วิซิเบิล ที่ความยาวคลื่น 195 นาโนเมตร จากการใช้ภาวะที่เหมาะสมพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 7 นาที ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณของออกซาเลตและซิเทรตในชาแบบซองมีค่าอยู่ในช่วง 5.8 – 15.4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 99.9 – 436 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้พัฒนาเทคนิค CE สำหรับวิเคราะห์ปริมาณของไอโอไดต์และไอโอเดตในซอสปรุงรสชนิดเสริมไอโอดีน โดยในการวิเคราะห์ใช้อะทิลลารีอิลีกโทรฟอริซิสที่ปราศจากการเคลือบผิวภายใน ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า -24 กิโลโวลต์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ประกอบด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 2.68 และตรวจวัดด้วยยูวี-วิซิเบิล ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร นอกจากนี้ได้นำเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นแบบออนไลน์โดยใช้การบรรจุสารเข้าไปในปริมาณมากและกำจัดเมทริกซ์ออกด้วยอทธิพลการไหลแบบออสโมซิส มาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของสารก่อนการแยกด้วยเทคนิค CE ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ไอโอไดต์และไอโอเดตใช้เวลา 10 นาที และเมื่อใช้เทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นสารร่วมด้วยพบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณไอโอไดต์ได้ต่ำในระดับ 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตรอย่างไรก็ตามเทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จในการนำไปวิเคราะห์ปริมาณไอโอไดต์และไอโอเดตในซอสปรุงรสชนิดเสริมไอโอดีน ทั้งนี้เนื่องมาจากมีการรบกวนจากคลอไรด์ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างในปริมาณมาก

คำสำคัญ: อะทิลลารีอิลีกโทรฟอริซิส, ออกซาเลต, ซิเทรต, ชาแบบซอง, ไอโอไดต์, ไอโอเดต, ซอสปรุงรส

Title Determination of iodide, iodate, oxalate and citrate in food products using capillary electrophoresis

Student name Ms.Patcharaporn Onthong ID 5533122223

Advisor name Assoc. Prof. Dr. Thumnoon Nhujuk

Co-advisor name Dr.Monpichar Srisa-Art

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2015

Abstract

In this work, capillary electrophoresis (CE) was used to determine the amounts of oxalate and citrate in tea bags and iodide and iodate in iodized seasoning sauce. For oxalate and citrate analysis, an uncoated fused silica capillary with 74.3 μm i.d. \times 60.2 cm (50 cm to detector) under an applied voltage of -20 kV and a temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$ was used with a pH 7.0 background electrolyte (BGE) containing 30 mM borate, 40 mM phosphate and 0.5 mM tetradecyltrimethyl ammonium bromide (TTAB). UV-Vis detection was performed at 195 nm. Under the optimized conditions, the analysis of oxalate and citrate was achieved within 7 min. Results showed that the amounts of oxalate and citrate in Lipton tea bags were in the ranges of 5.8 – 15.4 mg/L and 99.9 – 436 mg/L, respectively. Furthermore, in this work another CE method was developed for quantitative determination of iodide and iodate in iodized seasoning sauce. The same capillary column was used with an applied voltage of -24 kV and a temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$. A BGE contained 40 mM potassium dihydrogen orthophosphate (pH 2.68) and UV-Vis detection was performed at 200 nm. In addition, large volume sample stacking using an electroosmotic flow (EOF) pump was applied to perform online preconcentration of iodide and iodate prior to CE separation. Results showed that analysis of iodide and iodate was achieved within 10 min. Coupled with the preconcentration technique, this CE method can detect iodide at a concentration as low as 0.10 $\mu\text{g/L}$. However, the developed method was unsuccessful for quantitative analysis of iodide and iodate in iodized seasoning sauce due to the interference of chloride ion present in a large amount in the sample.

Keywords: Capillary electrophoresis, Oxalate, Citrate, Tea bag, Iodide, Iodate, Seasoning sauce

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และอาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม ที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านมาโดยตลอด รวมถึงให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความรู้เพื่อเป็นแนวทางในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศุภากุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คณศ วงษ์ระวี ที่เป็นประธานและกรรมการในการสอบงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณนางสาวกนกพร จินดาพรรณ นิสิตปริญญาเอก ที่ให้คำแนะนำในการใช้ เครื่องมือ เทคนิคการดูแลรักษาเครื่องมือ และความรู้ทั้งในด้านการวิเคราะห์ข้อมูลและการ ดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณคุณพ่อคุณแม่และครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ สำหรับการให้กำลังใจและ ความช่วยเหลือต่าง ๆ ทางผู้วิจัยขอขอบคุณในทุกความกรุณาของท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

| | |
|---|----|
| บทคัดย่อ..... | ค |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ง |
| กิตติกรรมประกาศ..... | จ |
| สารบัญ..... | ฉ |
| สารบัญรูปภาพ..... | ฉ |
| สารบัญตาราง..... | ฎ |
| สัญลักษณ์และคำย่อ..... | ฎ |
| สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)..... | ฐ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมามูลเหตุจูงใจและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์..... | 6 |
| 1.3 ขอบเขตงานวิจัย..... | 7 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 7 |
| บทที่ 2 ทฤษฎี..... | 8 |
| 2.1 คัพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis, CE)..... | 8 |
| 2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE..... | 8 |
| 2.3 ขั้นตอนการทำงานของเทคนิค CE..... | 10 |
| 2.4 ประเภทของเทคนิค CE..... | 11 |
| 2.5 Capillary zone electrophoresis (CZE)..... | 13 |
| 2.5.1 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (Electrophoretic mobility, μ)..... | 13 |
| 2.5.2 อิเล็กโทรออสโมซิส (Electroosmosis)..... | 15 |
| 2.5.3 ไมเกรชันไทม์ (Migration time, t_m)..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 2.5.4 Joule heating..... | 23 |
| 2.5.5 การกระจายของพีคใน CE (Peak dispersion in CE)..... | 23 |
| 2.5.6 ประสิทธิภาพการแยกและค่าการแยก (Efficiency and Resolution)..... | 25 |
| 2.5.7 การเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ (On-line preconcentration)..... | 27 |
| 2.5.8 การบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัด เมทริกซ์ออก (Large volume sample stacking using an EOF pump)..... | 28 |
| 2.6 การทำคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ในเทคนิค CE (Qualitative and quantitative analysis in CE) | 30 |
| 2.6.1 คุณภาพวิเคราะห์ | 30 |
| 2.6.2 ปริมาณวิเคราะห์..... | 30 |
| บทที่ 3 การทดลอง | 32 |
| 3.1 เครื่องมือ | 32 |
| 3.2 สารเคมี | 32 |
| 3.3 การเตรียมสารละลาย | 33 |
| 3.4 ภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคคัพลาริโอเล็กโทรฟอริซิสสำหรับหาปริมาณไอโอไดด์ ไอโอเดต ออกซาเลตและซีเทรต..... | 35 |
| 3.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์..... | 37 |
| 3.6 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)..... | 40 |
| 3.6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในซาแบบซอง..... | 40 |
| 3.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตในซอสปรุงรส | 41 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล | 42 |
| 4.1 การวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในซาแบบซอง | 42 |
| 4.1.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรต ในซาแบบซอง | 42 |
| 4.1.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) | 45 |
| 4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในสารตัวอย่างซาแบบซองสำหรับขง... 50 | |
| 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตในซอสปรุงรสเสริมไอโอดีน | 53 |

4.2.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกไอโอดีนและไอโอเดตด้วยเทคนิค CE 54

4.2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) 57

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนและไอโอเดตในสารตัวอย่างซอสปรุงรส
ชนิดเสริมไอโอดีน..... 58

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 61

เอกสารอ้างอิง 64

ประวัติผู้วิจัย..... 67



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE..... | 8 |
| รูปที่ 2.2 การเกิด double layer ที่ผนังคะพิลลารี | 16 |
| รูปที่ 2.3 ลักษณะการไหลและพีคที่ได้ของเทคนิค CE เทียบกับเทคนิค HPLC..... | 17 |
| รูปที่ 2.4 ทิศการไหลของ EOF พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารในคะพิลลารี ภายใต้ภาวะ EOF ปกติและค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าสุทธิ..... | 18 |
| รูปที่ 2.5 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทแคทไอออนต่อทิศทางการไหล ของ EOF และพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารในคะพิลลารีภายใต้ reversed EOF | 20 |
| รูปที่ 2.6 อิเล็กโทรโฟโรรแกรมที่ได้จากเครื่อง CE และลำดับการแยกของสาร ในภาวะ EOF ปกติ..... | 22 |
| รูปที่ 2.7 ลักษณะของพีคที่มีการกระจายแบบ Gaussian..... | 23 |
| รูปที่ 2.8 การหาค่าการแยกจากพีค | 26 |
| รูปที่ 2.9 การเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในคะพิลลารีโดยใช้วิธีการบรรจุ สารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดันร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ด้วย EOF | 29 |
| รูปที่ 4.1 อิเล็กโทรโฟโรรแกรมของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเตรต ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE | 44 |
| รูปที่ 4.2 กราฟเทียบมาตรฐานของออกซาเลตและซิเตรต สำหรับการวิเคราะห์ ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในสารตัวอย่างด้วยเทคนิค CE | 46 |
| รูปที่ 4.3 อิเล็กโทรโฟโรรแกรมที่ได้การวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรต ที่มีอยู่ในขาแบบของยี่ห้อลิปตันที่ซ่งด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 75 °C และใช้เวลา ในการแช่ถุงชาในน้ำเป็นเวลา ก) 1 นาที ข) 3 นาที ค) 5 นาที และ ง) 10 นาที..... | 51 |
| รูปที่ 4.4 อิเล็กโทรโฟโรรแกรมที่ได้การวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรต ที่มีอยู่ในขาแบบของ ยี่ห้อลิปตันที่ซ่งด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 °C และใช้เวลา ในการแช่ถุงชาในน้ำเป็นเวลา | 52 |
| รูปที่ 4.5 อิเล็กโทรโฟโรรแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.68 ต่อการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างไอโอไดด์และไอโอเดต ที่มีความเข้มข้น 2 mg/L | 55 |

รูปที่ 4.6 อิเล็กโทรโฟโแกรมแสดงผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่าง
เข้าสู่คะปิลารีคอลัมน์ โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างไอโอดีด์
และไอโอเดตที่ความเข้มข้น 1 mg/L..... 57

รูปที่ 4.7 แสดงอิเล็กโทรโฟโแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ซอสปรุงรสเห็ดหอมตรา
เด็กสมบูรณ์ ชนิดเสริมไอโอดีน 59

รูปที่ 4.8 แสดงอิเล็กโทรโฟโแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ซอสปรุงรสเห็ดหอมตรา
เด็กสมบูรณ์ ชนิดเสริมไอโอดีน 60



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

| | |
|--|----|
| ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจาก stock solution ของออกซาเลตความเข้มข้น 1 g/L และซีเทรตความเข้มข้น 5 g/L | 38 |
| ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลายเพื่อทำการวิเคราะห์หาความแม่นยำและความเที่ยงของการทดลอง | 39 |
| ตารางที่ 4.1 โครงสร้างและค่าคงที่การแตกตัวของออกซาเลตและซีเทรต | 42 |
| ตารางที่ 4.2 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรต | 44 |
| ตารางที่ 4.3 สมการเชิงเส้นตรงของกราฟเทียบมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรต | 45 |
| ตารางที่ 4.4 ความเที่ยงของไมเกรชั่นไทม์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ 10 ครั้ง ($n = 10$) | 47 |
| ตารางที่ 4.5 ความเที่ยงของไมเกรชั่นไทม์ (t_m) และพื้นที่ใต้พีคปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการวิเคราะห์ต่างวันเป็นเวลา 3 วัน ($n = 3$) | 49 |
| ตารางที่ 4.6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่เติมลงในชาแบบซองตัวอย่าง (วิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง) | 50 |
| ตารางที่ 4.7 ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตที่ได้จากการแช่ถุงชาที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค CE | 52 |

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

| | |
|-------------|--|
| α | ดีกรีการแตกตัวของสาร (degree of ionization) |
| η | ความหนืดของสารละลาย (viscosity) |
| μ | ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility) |
| μ_{eo} | ความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วยอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility) |
| μ_{net} | ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่สังเกตได้ |
| σ^2 | ค่าความแปรปรวนของพีค (peak variance) |
| ζ | ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential) |
| A | พื้นที่ใต้พีค (peak area) |
| A_{corr} | พื้นที่ใต้พีคปรับค่า (corrected peak area) |
| BGE | สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte) |
| CE | คะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis) |
| CZE | คะพิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis) |
| E | ความเข้มของสนามไฟฟ้า (electric field strength) |
| EOF | การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis flow) |
| H | ความสูงเพลต (plate height) |
| L | ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี |
| LOD | ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ (limit of detection) |
| N | จำนวนเพลตทางทฤษฎี (theoretical plate) |

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

| | |
|-----------|--|
| R_s | ค่าการแยกของสาร (resolution) |
| V | ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสาร (applied voltage) |
| l | ความยาวจากปลายอะนิโอดีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจจับ |
| r_h | รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of the ion) |
| t_m | ไมเกรชันไทม์ (migration time) |
| v_{eo} | ความเร็วของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic velocity) |
| v_{ep} | ความเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร (electrophoretic velocity) |
| w | ความกว้างของฐานพีค (peak width) |
| $w_{0.5}$ | ความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูงพีค |
| z | ประจุบนไอออน (electronic charge) |

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมามูลเหตุจูงใจและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันคนเราหันมาใส่ใจในการบริโภคอาหารและสนใจสุขภาพมากขึ้น ส่วนประกอบที่มีอยู่ในอาหารจึงเป็นตัวแปรสำคัญในการตัดสินใจเลือกบริโภคอาหารแต่ละชนิด ซึ่งส่วนประกอบบางชนิดมีความสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภคเพราะถ้าได้รับในปริมาณที่มากเกินไปอาจก่อให้เกิดโรคได้ ตัวอย่างเช่น กรดออกซาลิกหรือออกซาเลตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในชา ซึ่งถ้าได้รับในปริมาณมากอาจเกิดการสะสมและทำให้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคนิ่วได้นอกจากนี้ส่วนประกอบในอาหารบางชนิดต้องบริโภคให้เพียงพอเพื่อป้องกันการเกิดโรค เช่น ไอโอดีน ถ้าร่างกายได้รับไอโอดีนไม่เพียงพอจะทำให้เกิดโรคคอพอก และสติปัญญามีการพัฒนาต่ำกว่าปกติ เป็นต้น ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยให้ผู้บริโภคได้ตระหนักถึงปริมาณของสิ่งที่บริโภค ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค และเป็นข้อมูลเพื่อใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจเลือกบริโภค ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจวิเคราะห์หาปริมาณส่วนประกอบที่อยู่ในอาหาร ได้แก่ การวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในชาแบบซอง และการวิเคราะห์หาปริมาณไอโอดีนและไอโอดेटในซอสปรุงรสที่เสริมไอโอดีน

กรดออกซาลิก (oxalic acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในใบชา ซึ่งปัจจุบันนิยมนำมาทำเป็นเครื่องดื่มอย่างแพร่หลาย กรดออกซาลิกเมื่ออยู่ในรูปของแอนไอออนซึ่งเรียกว่าออกซาเลต สามารถรวมตัวกับแคลเซียมและเกิดเป็นผลึกแคลเซียมออกซาเลต (1) ซึ่งไม่สามารถดูดซึมกลับไปสะสมในกระดูกได้ แต่จะอยู่ในกระแสเลือดและส่งผลให้เกิดการสะสมเป็นก้อนนิ่วในไตหรือกระเพาะปัสสาวะ การรวมกันของออกซาเลตและแคลเซียมจะเกิดได้ง่ายเมื่อร่างกายมีการดูดซึมแคลเซียมและกรดออกซาลิกในระยะเวลาใกล้เคียงกัน โดยนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate stones) เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในประเทศไทย (1) แต่ในร่างกายคนปกติจะมีสารยับยั้งนิ่วในกระเพาะปัสสาวะในปริมาณที่เพียงพอที่จะสามารถยับยั้งการก่อตัวของนิ่วในไตได้ โดยสารยับยั้งเหล่านี้จะไปแย่งจับแคลเซียม เกิดเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดี และถูกขับออกไปกับปัสสาวะ ตัวอย่างของสารยับยั้งการก่อนิ่ว ได้แก่ ซิเตรต โพแทสเซียมและแมกนีเซียม (1) ซึ่งซิเตรตก็เป็นสารที่พบในใบชาด้วยเช่นกัน

ไอโอดีนเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับร่างกาย แต่เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสร้างไอโอดีนขึ้นเองได้ จึงจำเป็นต้องรับประทานเข้าไปในรูปของเกลือไอโอไดด์และเกลือไอโอเดต โดยไอโอไดด์นั้นเป็นส่วนประกอบสำคัญของฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมไทรอยด์ โดยต่อมไทรอยด์จะดูดซึมไอโอไดด์จากกระแสเลือดเข้าไปรวมกับกรดอะมิโนไทโรซีนที่อยู่ในรูปโปรตีนไทโกลบูลิน (thyroglobulin) และสร้างเป็นฮอร์โมนไทร็อกซีน (thyroxine) (2) ฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์นี้มีบทบาทสำคัญในระบบเมตาบอลิซึมและการเผาผลาญอาหารเพื่อให้พลังงานแก่ร่างกาย ทำให้ร่างกายกระฉับกระเฉง หากร่างกายมีภาวะขาดไอโอดีนจะส่งผลต่อความผิดปกติต่าง ๆ ทั้งทางด้านการเจริญเติบโต สติปัญญาและความพิการทางด้านประสาท โดยปกติร่างกายต้องการไอโอดีนประมาณ 100 – 150 ไมโครกรัมต่อวัน แหล่งอาหารที่มีไอโอดีนได้แก่ ปลาทะเล มีปริมาณไอโอดีน 50 ไมโครกรัมต่อปลา 100 กรัม หอยมีปริมาณไอโอดีน 90 ไมโครกรัมต่อหอย 100 กรัม และเนื้อวัวมีปริมาณไอโอดีน 10 ไมโครกรัมต่อเนื้อ 100 กรัม เป็นต้น (3)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลต ชิเทรต ไอโอไดด์ และไอโอเดตพบว่าการหาปริมาณออกซาเลตและชิเทรตในขามีหลายวิธีเช่น ในปี 1998 Horie และคณะ (4) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ชนิดประจุลบในชาสำเร็จรูป ด้วยเทคนิคเคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) และมีการเติมสารละลายเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ประกอบด้วย โซเดียมโครเมต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และเตตระเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์เพื่อกำจัดผลรบกวนของโลหะที่มีในใบชา โดยในงานวิจัยนี้สามารถตรวจวัดได้ปริมาณออกซาเลตได้ในช่วง 12.1 – 166.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และตรวจวัดปริมาณชิเทรตได้ในช่วง 3.7 – 31.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี 2003 Savage และคณะ (5) ได้ทำการหาปริมาณออกซาเลตในชาและชาที่มีการเติมนม ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (high pressure liquid chromatography, HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิดไอออนเอ็กซ์คลูชัน (ion exclusion column) และใช้การชะสารแบบไอโซเครติกด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.0125 โมลาร์ อัตราเร็วของการชะเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาทีและทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี-วิซิเบิลสเปกโทรสโกปี ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถทำการตรวจวัดปริมาณของออกซาเลตในชาดำจากสองยี่ห้อที่แตกต่างกันได้ปริมาณ 6.1 และ 6.3 มิลลิกรัมต่อชาน้ำหนึ่งกรัม ตามลำดับ

ในปี 2010 Hönow และคณะ (6) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตในชาเขียวที่มา จากแหล่งเพาะปลูกที่ต่างกัน ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุชนิดลบ (anion exchange column) ใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็นเอทิลีนไดเอมีนเตตระแอสีติกแอซิด และใช้ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ในการเปลี่ยนออกซาเลตให้เป็นไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ จากนั้นจึงทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี (amperometry) โดย สามารถหาปริมาณของออกซาเลตในชาเขียวได้ในช่วง 8.3 – 139.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับในส่วนของการวิเคราะห์ไอโอเดตและไอโอไดด์ วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการหา ปริมาณไอโอเดตและไอโอไดด์คือการไทเทรตด้วยปฏิกิริยารีดอกซ์ (7) โดยเติมกรดไฮโดรคลอริก เพื่อให้สารละลายตัวอย่างอยู่ในสภาวะกรด ใช้สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเป็นตัวไทเทรนต์ และใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ โดยเมื่อเติมกรดไฮโดรคลอริกจะเกิดสีเหลืองน้ำตาลขึ้นใน สารละลายตัวอย่าง และทำการไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตจนสีเหลืองน้ำตาลจาง ลง แล้วจึงทำการเติมน้ำแป้ง สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นทำการไทเทรตต่อจนถึง จุดยุติ นั่นคือได้สารละลายใสไม่มีสี แต่อย่างไรก็ตามวิธีมาตรฐานที่ใช้ก็ยังมีข้อจำกัดหลากหลาย เช่น มีการสูญเสียไอโอดีนในระหว่างทำการไทเทรต, การไทเทรตมีข้อผิดพลาด, หาอินดิเคเตอร์ที่ เหมาะสมยาก และมีค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection, LOD) ที่ไม่ต่ำมากนัก ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ใช้เครื่องมือทางเคมีวิเคราะห์ในการตรวจวัดปริมาณไอโอเดตและไอโอไดด์ เป็นจำนวนมาก เช่น ในปี 1997 Silva และคณะ (8) ได้ทำการหาปริมาณของไอโอเดตในเกลือ แงงด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ด้วยการทำปฏิกิริยากับไอโอไดด์ในสภาวะที่เป็นกรด เพื่อให้ เกิดไตรไอโอไดด์และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณไอโอเดตซึ่งพบว่าวิธีนี้สามารถทำ การตรวจวัดปริมาณไอโอเดตได้ในช่วง 37.85 – 63.59 ไมโครกรัมต่อลิตร

ส่วนเทคนิคที่เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตในเกลือแกงคือ เทคนิค HPLC (9) โดยใช้คอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบและใช้ตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิชิ เบิลสเปกโทรสโกปี ซึ่งสามารถทำการวิเคราะห์ได้ในระดับนาโนกรัมต่อลิตร

ในปี 2009 Wei และคณะ (10) ได้ทำการหาปริมาณของไอโอเดตและไอโอไดด์ในน้ำได้ ดินโดยใช้เทคนิค HPLC-ICPMS ซึ่งตัวกลางที่ใช้ในการวิเคราะห์คือสารละลายโพแทสเซียมไฮ ดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.01% โดยปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ของไอโอเดตเท่ากับ 0.035 ไมโครกรัมต่อลิตร และไอโอไดด์มีค่าเท่ากับ 0.025 ไมโครกรัมต่อลิตร

ต่อมาในปี 2014 Wang และคณะ (11) ทำการตรวจวัดปริมาณไอโอเดตด้วยเทคนิค HPLC-UV โดยทำการพัฒนาเครื่องมือทางเคมีไฟฟ้า (on-line pre-column electrochemical instrument, PEI) เพื่อใช้ร่วมกับเทคนิค HPLC โดยให้ไอโอเดตเกิดปฏิกิริยารีดักชันเป็นไอโอไดด์ใน PEI จากนั้นจึงฉีดเข้าสู่คอลัมน์ HPLC และตรวจวัดด้วยยูวี ซึ่งงานวิจัยนี้รายงานค่า LOD เท่ากับ 9 นาโนกรัม และมีขีดจำกัดของการทำปริมาณวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 20 นาโนกรัม

แต่อย่างไรก็ตาม HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความยุ่งยาก เนื่องจากต้องกำจัดเมทริกซ์ที่อาจจะส่งผลต่อเฟสคงที่ (stationary phase) ในคอลัมน์ ทำให้เฟสคงที่เกิดการอุดตันและประสิทธิภาพในการแยกลดลงได้นอกจากนี้หากต้องการแยกสารหลายชนิดที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน อาจจะต้องใช้คอลัมน์ที่มีเฟสคงที่ต่างชนิดกัน ทำให้มีความยุ่งยากมากขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิค CE มาใช้ในการวิเคราะห์แยกสาร

ในปี 2000 Timerbaev และคณะ (12) ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคอะมัลแกมเมอร์อิเล็กโทรโฟรีซิสร่วมกับเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของสารในอะมัลแกมเมอร์คอลัมน์และการคลีนอัพ (clean up) เพื่อตรวจวัดสารอินทรีย์ที่มีประจุลบ ได้แก่ โบรไมด์, ไอโอไดด์, ไนเตรต, ไนไตรท์ และไอโอเดต โดยหลังจากบรรจุสารเข้าสู่อะมัลแกมเมอร์จะทำการให้ศักย์ไฟฟ้าตรงข้ามกับศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการแยก เพื่อกำจัดผลคลอไรด์ที่เป็นตัวรบกวนและเพิ่มประสิทธิภาพการแยก ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์แอนไอออนเหล่านี้ได้ในระดับไมโครโมลาร์

ปี 2003 Yokota และคณะ (13) ได้ทำการตรวจวัดปริมาณของไอโอไดด์และไอโอเดตในน้ำทะเลโดยใช้เทคนิค CE ที่เป็นไอโซแทสโฟรีซิสแบบชั่วคราว (transient isotachopheresis) เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ โดยใช้น้ำทะเลเทียมเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยในงานวิจัยนี้ได้ค่า LOD ของไอโอไดด์และไอโอเดตเท่ากับ 4.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ

ปี 2004 Pantucková และ Krivánková (14) ทำการพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณไอโอไดด์ในตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะและเซรัมของมนุษย์ น้ำทะเล และเกลือสำหรับประกอบอาหาร ด้วยเทคนิค CE โดยมีการเติมพอลิเอทิลีนอิมีน (polyethyleneimine, PEI) ลงไปสารละลายอิเล็กโทรไลต์เพื่อเป็นไอออนแพร์ริง (ion pairing agent) ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและ

ทำให้การวิเคราะห์ง่ายขึ้น ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ค่า LOD ของไอโอดีในตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะเข้มข้น และน้ำทะเล เท่ากับ 0.14, 0.17 และ 0.17 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างที่เป็นเกลือสำหรับประกอบอาหารนั้น ได้ค่า LOD เท่ากับ 89 นาโนโมลาร์ และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีคและความสูงของพีคในเมทริกซ์ทุกชนิดอยู่ในช่วง 0.93 – 4.19%

ปี 2009 Wang และคณะ (15) ทำการหาปริมาณไอโอดีในเกลือแกงด้วยเทคนิคไอโซแทลโซฟอริซิสแบบชั่วคราวร่วมกับเทคนิคอะพิลลารีโซนอิเล็กโทรฟอริซิส (transient isotachopheresis - capillary zone electrophoresis, tITP-CZE) ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค tITP-CZE เพื่อเพิ่มสภาพไวในการตรวจวัด และสามารถกำจัดตัวรบกวนที่มีอยู่ในเมทริกซ์ของตัวอย่างได้ด้วยการใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 g/L ผสมกับสารละลายซิติลไตรแอมโมเนียมคลอไรด์ (cetyltrimmonium chloride, CTAC) และใช้โครเมตเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) เพื่อช่วยปรับปรุงความเที่ยงของการทำปริมาณวิเคราะห์ โดยงานวิจัยนี้ได้ค่า LOD ของไอโอดีเท่ากับ 3.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และได้ทำการหาปริมาณของไอโอดีในเกลือแกงด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีมาตรฐานคือการไทเทรตด้วยปฏิกิริยารีดอกซ์ พบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ปี 2013 S Kulkarni และคณะ (16) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดที่มีความรวดเร็วสำหรับตรวจวัดปริมาณไอโอดีในตัวอย่างที่เป็นเกลือแกง โดยอาศัยหลักของปฏิกิริยาไอโอดีเมทรี โดยไอโอดีในตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับไอโอดีที่มีปริมาณมากเกินพอในสภาวะกรด และเกิดเป็นไอโอดีขึ้นในสารละลาย จากนั้นไอโอดีจะไปทำปฏิกิริยากับสีย้อมวาริเอมินบลู (Variamin blue dye, VB) ในสภาวะที่มีสารละลายโซเดียมออกซาลेट ให้สารละลายที่มีสีม่วงจากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถตรวจวัดไอโอดีได้ในระดับมิลลิกรัมต่อลิตร

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่าผู้วิจัยใช้เทคนิค CE และ HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาลेटในชา อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการหาปริมาณออกซาลेटในชาที่บรรจุในซอง (tea bag) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของออกซาลेटและซีเทรตด้วยเทคนิค CE ซึ่งมีข้อดีเหนือเทคนิค HPLC คือใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ประสิทธิภาพในการแยกสูง ใช้สารในปริมาณน้อยและไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่าง นอกจากการกรอง (17) และศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำร้อนที่ใช้ในการชงและเวลาที่แช่ถุงชาต่อปริมาณของออกซาลेटและซีเทรตที่ละลายออกมาจากถุงชา นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังสนใจที่จะพัฒนาเทคนิค CE ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี-วิซิเบิลสเปกโทรสโกปีสำหรับการวิเคราะห์

หาปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตในซอสปรุงรส แต่เนื่องจากในซอสปรุงรรมีปริมาณของไอโอไดด์และไอโอเดตที่น้อย และไอออนทั้งสองชนิดนี้มีค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ต่ำและมีเมทริกซ์จากสารอื่นในสารละลายตัวอย่างที่อาจจะส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างจากงานวิจัยของ Yan และ HianKee (18) ที่ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารอินทรีย์และอนินทรีย์ขนาดเล็กที่อยู่ในรูปประจุลบด้วยเทคนิค CE และตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี-วิชิเปิลสเปกโทรสโกปี โดยได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยการฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ในปริมาณมากและกำจัดเมทริกซ์ออกภายหลังด้วยอิทธิพลของการไหลแบบออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF) ซึ่งวิธีนี้จะทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่มาชิดกันและมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มความเข้มข้นวิธีนี้จะใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีค่าพีเอชต่ำซึ่งในงานวิจัยดังกล่าวสามารถทำการตรวจหาปริมาณของกรดฟูมาริก (fumaric) มาเลอิก (maleic) โบรไมด์ (bromide) และไนเตรท (nitrate) ได้ในระดับมิลลิกรัมต่อลิตรโดยเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นนี้มีข้อดีที่แตกต่างจากเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นแบบอื่น ๆ คือ ไม่ต้องมีการเตรียมสารละลายอิเล็กโทรไลต์หลายชนิด ไม่ต้องมีการสลับขั้วไฟฟ้าและไม่ต้องการอุปกรณ์หรือเครื่องมือมาต่อเสริมกับเครื่อง CE ทำให้มีความง่ายในการใช้งาน ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าเมื่อนำเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นสารตัวอย่างนี้มาประยุกต์ในการหาปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดต จะช่วยให้สามารถหาปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตในซอสปรุงรสที่มีอยู่ในปริมาณน้อยได้อย่างถูกต้อง

1.2 วัตถุประสงค์

1. พัฒนาเทคนิค CE สำหรับหาปริมาณไอโอไดด์ ไอโอเดต ออกซาเลตและซีเทรตในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม
2. วิเคราะห์ปริมาณไอโอไดด์ ไอโอเดต ออกซาเลต และซีเทรตในผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้น

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.หาภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง CEเพื่อใช้ในการหาปริมาณไอโอดีนและไอโอดेटในซอสปรุงรสเสริมไอโอดีน และออกซาเลตและซีเทรตในซาแบบซอง
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น เช่น ซีดจำกัดการตรวจวัด ซีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ความแม่นยำ และความเที่ยง
- 3.วิเคราะห์หาปริมาณไอโอดีนและไอโอดेटในซอสปรุงรสเสริมไอโอดีน และออกซาเลตและซีเทรตในซาแบบซอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการหาปริมาณไอโอดีน ไอโอดेट ออกซาเลตและซีเทรตในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม
2. ได้ข้อมูลปริมาณไอโอดีน ไอโอดेट ออกซาเลตและซีเทรตที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มเพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับผู้บริโภคในการเลือกบริโภคเพื่อเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ

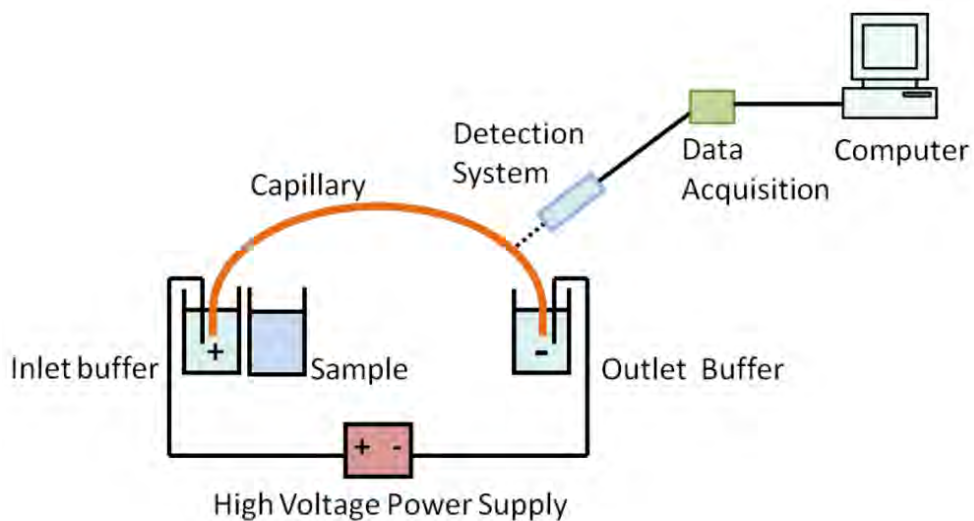
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2 ทฤษฎี

2.1 คัพพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis, CE)

คัพพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคแยกสารในตัวอย่างที่เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่บรรจุในคัพพิลลารีขนาดเล็ก ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า โดยหลักการแยกสารจะขึ้นกับความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) (19) เทคนิค CE สามารถแยกสารได้ทั้งมีประจุและไม่มีประจุ สารประเภทไอออนิกโพลิเมอร์และสารประเภทพอลิเมอร์ เช่น โปรริน เป็นต้น

2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.1 คัพพิลลารี (Capillary)

โดยทั่วไปนิยมใช้เป็น fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 หรือ 75 μ m ความยาว 30 ถึง 60 cm ภายนอกของคัพพิลลารีมีการเคลือบด้วยพอลิเอไมด์ และมีการลอกพอลิเอไมด์ออกในส่วนบริเวณตรวจวัดสำหรับเครื่องตรวจวัดทางสเปกโทรสโกปี เช่นยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Visible spectroscopy) หรือฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี (fluorescence spectroscopy)

2.2.2 เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า (Voltage supply)

เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงจะให้ความต่างศักย์ -30 ถึง 30 V และกระแสสูงสุดไม่เกิน 300 μ A โดยสามารถให้ได้ทั้งความต่างศักย์คงที่ กระแสคงที่ กำลังไฟฟ้าคงที่ หรือภาวะแบบผสม (gradient condition) แต่ทั่วไปจะนิยมใช้ความต่างศักย์คงที่ และให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นบวก โดยเมื่อด้านเครื่องตรวจวัดหรือปลายด้านออก (outlet) เป็นขั้วลบ หรือขั้วแคโทด (cathode) และด้านฉีดยาหรือด้านปลายเข้า (inlet) เป็นขั้วบวก หรือแอโนด (anode) จะเรียกว่าใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบขั้วปกติ (normal polarity) และหากให้ด้านปลายออกเป็นขั้วบวกและด้านปลายเข้าเป็นขั้วลบ จะเรียกว่าใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reversed polarity)

2.2.3 ขั้วไฟฟ้า (Electrode)

ขั้วไฟฟ้านิยมใช้เป็นลวดแพลตตินัม (platinum wire)

2.2.4 สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (Background electrolyte, BGE)

สารละลายอิเล็กโทรไลต์ส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นบัฟเฟอร์ เช่น อะซิเตต (acetate) บอเรต (borate) และฟอสเฟต (phosphate) และอาจมีการเติมสารเติมแต่งลงไป เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) สารเติมแต่งไครัล (chiral reagent) หรือสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแยก

2.2.5 ภาชนะบรรจุสารตัวอย่างและสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ภาชนะบรรจุสารมักเป็นแก้วขนาด 1 ถึง 5mL

2.2.6 เครื่องตรวจวัด (Detector)

เครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้มักเป็นเครื่องมือตรวจวัดทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล (UV-Vis) หรือฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ที่สามารถทำการตรวจวัดสารบนคอลัมน์ (on column detection) ได้โดยตรง

2.2.7 ส่วนควบคุมความดัน (Pressure controller)

ใช้สำหรับบรรจุน้ำละลายเข้าสู่คัพพิลลารี โดยระบบอัดความดันอาจจะใช้แก๊สไนโตรเจนหรือเครื่องอัดอากาศ

2.2.8 ระบบฉีดสารตัวอย่าง (Sample Introduction)

การฉีดสารตัวอย่างสามารถทำได้ทั้งการให้ความดัน (pressure injection) หรือให้ศักย์ไฟฟ้า (electrokinetic injection) ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ไม่ต้องการระบบฉีดสารเพิ่มเติมจากอุปกรณ์ที่มีอยู่แล้วในตัวเครื่อง โดยศักย์ไฟฟ้าจะใช้จากเครื่องกำเนิดไฟฟ้าและความดันจะใช้จากระบบควบคุมความดัน

2.2.9 ส่วนควบคุมอุณหภูมิของคัพพิลลารี (Temperature controller)

เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าในขณะแยกสาร จะมีความร้อนเกิดขึ้น (Joule heating) โดยระบบควบคุมอุณหภูมิจะช่วยลด Joule heating และใช้ในการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อปรับปรุงการแยกสาร

2.3 ขั้นตอนการทำงานของเทคนิค CE

2.3.1 บรรจุน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าไปในคัพพิลลารี เพื่อทำการปรับให้ผิวด้านในของคัพพิลลารีให้เป็นประจุลบ หรือบรรจุน้ำละลายกรดฟอสฟอริกเพื่อลดประจุลบของผิวคัพพิลลารี ก่อนที่จะบรรจุน้ำละลายอิเล็กโทรไลต์

2.3.2 บรรจุน้ำละลายอิเล็กโทรไลต์เข้าสู่คัพพิลลารี

2.3.3 บรรจุน้ำละลายตัวอย่างเข้าสู่คัพพิลลารี

2.3.4 รวบรวมผลผลิตคัพพิลลารีทั้งสองข้างและขั้วไฟฟ้าลงในภาชนะที่บรรจุน้ำละลายอิเล็กโทรไลต์

2.3.5 ให้ศักย์ไฟฟ้าที่ชั่วไฟฟ้าเพื่อให้สารเริ่มทำการแยก โดยสารจะแยกจากกันด้วยความต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า

2.4 ประเภทของเทคนิค CE

2.4.1 Capillary zone electrophoresis (CZE)

CZE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยการแยกสารจะเกิดขึ้นภายในแคพิลลารีที่บรรจุด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ กลไกการแยกสารจะขึ้นกับความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของประจุต่อขนาด CZE นิยมใช้วิเคราะห์สารที่มีประจุ และสามารถวิเคราะห์สารที่ไม่มีประจุได้ด้วยการเตรียมให้เป็นอนุพันธ์หรือเติม charged complexing agent เพื่อให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีประจุ

2.4.2 Micellarelectrokinetic chromatography (MEKC)

MEKC เป็นเทคนิคที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ผสมลงไปในบัฟเฟอร์ เพื่อให้เกิดเป็นเฟสของไมเซลล์ (micellar phase) ที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่เทียม (pseudo stationary phase) โดยกลไกการแยกจะขึ้นกับความแตกต่างของค่าการกระจายตัว (distribution coefficient) ระหว่างเฟสของไมเซลล์และเฟสที่เป็นสารละลาย (aqueous phase) เทคนิค MEKC สามารถแยกได้ทั้งสารที่มีประจุและไม่มีประจุ

2.4.3 Capillary electrochromatography (CEC)

CEC เป็นเทคนิคที่มีการใช้แคพิลลารีที่บรรจุเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) เหมือนใน HPLC ดังนั้นจึงเป็นเทคนิคที่ผสมระหว่าง HPLC กับ CZE กลไกการแยกสารจึงขึ้นกับความแตกต่างของค่าคงที่ของการกระจายระหว่างเฟสอยู่กับที่กับเฟสสารละลาย และความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร CEC สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งสารที่มีประจุและไม่มีประจุ

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.4 Capillary gel electrophoresis (CGE)

CGE จะมีการบรรจุบัฟเฟอร์และเจลในคะพิลลารี กลไกการแยกสารจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของขนาดของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจล ซึ่งเจลนี้ทำหน้าที่เป็น molecular sieve สำหรับแยกสารและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยกของสารได้ CGE เหมาะสำหรับแยกสารประเภทพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่มีประจุ เช่น โพรตีนและดีเอ็นเอ เป็นต้น

2.4.5 Capillary isoelectric focusing (CIEF)

สารละลายอิเล็กโทรไลต์ในเทคนิค CIEF จะเป็นบัฟเฟอร์ที่ทำให้เกิด pH Gradient โดยกลไกการแยกสารจะอาศัยความแตกต่างของค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) ของสาร นิยมใช้ในการแยกสารประเภทแอมโฟไลต์ (ampholyte) ที่สามารถเป็นได้ทั้งประจุบวกหรือประจุลบ และมีค่าประจุที่แตกต่างกันตามค่า pH เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์และโพรตีน เป็นต้น

2.4.6 Capillary isotachopheresis (CITP)

CITP เป็นเทคนิคที่ระบบสารละลายอิเล็กโทรไลต์ไม่ต่อเนื่อง (discontinuous buffer system) โดยมีสารละลายอิเล็กโทรไลต์ส่วนหน้า (leading electrolyte, L) ซึ่งจะประกอบด้วยไอออนที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้ามาก (μ มีค่ามาก) และสารละลายอิเล็กโทรไลต์ส่วนท้าย (terminating electrolyte, T) จะประกอบด้วยไอออนที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าน้อย (μ มีค่าน้อย) โดยกลไกการแยก สารจะในระบบจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเท่ากัน แต่บริเวณโซนสารจะมีสนามไฟฟ้าต่างกัน CITP จะใช้แยกสารตัวอย่างที่มีค่า μ อยู่ระหว่าง L และ T

สำหรับในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิค CZE ดังนั้นจะกล่าวถึงเทคนิค CZE อย่างละเอียดในหัวข้อถัดไป

2.5 Capillary zone electrophoresis (CZE)

เทคนิค CZE เป็นเทคนิคที่นิยมอย่างแพร่หลายสำหรับ CE เหมาะสำหรับแยกสารที่มีประจุและสามารถวิเคราะห์สารไม่มีประจุได้โดยทำการเติมสารเติมแต่งลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ การแยกสารใน CZE สามารถทำได้ง่ายกว่าเทคนิคอื่น เนื่องจากใช้แคสสารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็นบัฟเฟอร์ทั่วไปและสามารถทำการปรับปรุงการแยกได้ด้วยการเติมสารเติมแต่งลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ กลไกการแยกสารขึ้นกับความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าซึ่งเป็นผลมาจากค่าอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของสาร

2.5.1 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (Electrophoretic mobility, μ)

คือความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity, v_{ep}) ภายใต้ความเข้มของสนามไฟฟ้า 1 V m^{-1} ซึ่งเป็นค่าที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด และในตัวอย่างใด ๆ ความสามารถในการเคลื่อนที่ของไอออนจะขึ้นกับค่าประจุและรัศมีไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic radius) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนเมื่อถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของน้ำ และความหนืดของตัวกลาง ดังสมการ (19)

$$\mu = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} \quad (2.1)$$

E ความแรงของสนามไฟฟ้า (applied electric field)

z ค่าประจุของสาร

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

η ความหนืดของสารละลาย

r_h รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of ion)

จากสมการชี้ให้เห็นว่า ค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของสารนั้น ขึ้นกับค่าประจุและรัศมีไฮโดรไดนามิก โดยสารที่มีขนาดเล็กและค่าประจุมากจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่และมีค่าประจุน้อยจะเคลื่อนที่ได้ช้า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า μ มีดังนี้

1) ความแรงไอออนิก(ionic strength) หรือความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

เมื่อเพิ่มความแรงไอออนิกหรือเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ สารตัวอย่างจะถูกล้อมรอบด้วยแคตไอออนที่มีประจุตรงข้ามที่มาจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์จึงทำให้ r_h เพิ่มขึ้น และ z ลดลง ส่งผลให้ค่า μ ลดลง ทำให้สารเคลื่อนที่ได้ช้าลงแต่การเติมสารละลายอิเล็กโทรไลต์มากขึ้น จะทำให้มีไอออนอยู่ในระบบมากขึ้น ส่งผลให้เกิดความร้อนเมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้า ซึ่งอาจทำให้ค่า μ เพิ่มขึ้นได้เนื่องจากสารละลายมีความหนืดลดลง

2) pH ของบัฟเฟอร์

สารตัวอย่างที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ค่า pH ของบัฟเฟอร์จะส่งผลต่อค่าดีกรีการแตกตัวของสาร (degree of ionization) และความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าปรากฏ (μ_{eff}) จะขึ้นกับดีกรีการแตกตัวของสารและความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารที่แตกตัว 100% (μ_0) โดยเมื่อ pH มีค่ามากขึ้น กรดอ่อนจะมีค่า μ_{eff} มากขึ้นเพราะสารสามารถแตกตัวเป็นประจุลบได้มากขึ้น แต่เมื่อ pH มีค่าลดลง เบสอ่อนจะมีค่า μ_{eff} เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารจะรับโปรตอนและมีประจุบวกมากขึ้น และเมื่อที่ $pH = pK_a$ ค่า $\mu_{eff} = 0.5\mu_0$

3) ความหนืดและอุณหภูมิของสารละลาย

จากสมการที่ 2.1 จะเห็นได้ว่า ค่า μ แปรผกผันกับความหนืด นั่นคือเมื่อความหนืดเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า μ ของสารลดลง และเนื่องจากอุณหภูมิส่งผลต่อความหนืดของสารละลาย ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น สารละลายจะมีความหนืดลดลง ส่งผลให้ค่า μ ของสารมีค่าเพิ่มขึ้น

4) ตัวทำละลายอินทรีย์

การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงในน้ำจะทำให้สารที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อนแตกตัวได้ลดลง เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์จะไปล้อมรอบสารตัวอย่างทำให้สารตัวอย่างมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้ค่า μ ของสารลดลง แต่หากมีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปมากในปริมาณหนึ่ง อาจทำให้ค่า μ เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์สามารถไปลดความหนืดของสารละลายได้

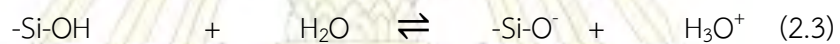
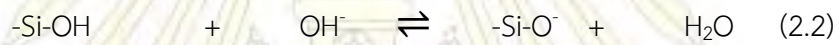
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5) ความต่างศักย์และขนาดคะพิลลารี

ในทางทฤษฎีแล้ว ค่า μ ไม่ขึ้นกับความต่างศักย์หรือขนาดของคะพิลลารี แต่ในทางปฏิบัติการเพิ่มความต่างศักย์หรือเพิ่มขนาดคะพิลลารีนั้น อาจส่งผลให้เกิด Joule heating มากขึ้น และทำให้ค่า μ มากขึ้นได้

2.5.2 อิเล็กโทรออสโมซิส (Electroosmosis)

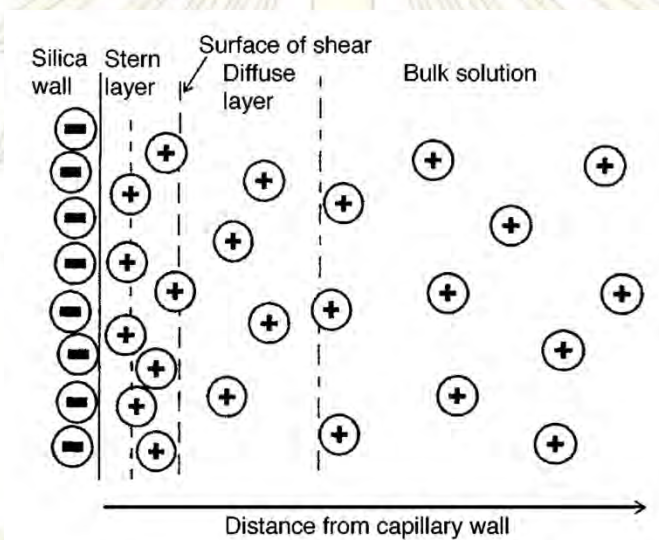
ผิวด้านในของคะพิลลารีประกอบด้วยหมู่ซิลานอล (silanol group, $-\text{Si}-\text{OH}$) เมื่อผิวคะพิลลารีสัมผัสกับสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์ที่มีค่า $\text{pH} > 2$ หมู่ซิลานอลจะเกิดการแตกตัว ทำให้ผิวด้านในของคะพิลลารีมีประจุลบ ดังสมการ



เมื่อผิวคะพิลลารีเป็นประจุลบ จะสามารถดึงดูดประจุบวกจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์มาเกาะอยู่ที่ผิว เกิดเป็นชั้นไอออน 2 ชั้น หรือเรียกว่า double layers (DL) ดังรูป 2.2 โดยประกอบด้วย

- 1) Stern layer หรือ Inner helmholtz plane เป็นชั้นที่ประจุบวกบางส่วนจะติดแน่นอยู่ที่ผิวของคะพิลลารีและไม่เคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของแรงไฟฟ้าสถิตและแรงแวนเดอร์วาลส์
- 2) Diffusion layer เป็นชั้นที่ประจุบวกเกาะอย่างหลวม ๆ
- 3) Bulk solution เป็นส่วนของประจุบวกที่เหลือที่กระจายตัวอยู่ในสารละลาย

เมื่อทำการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารี ประจุบวกของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่อยู่ทั้งใน diffusion layer และใน bulk solution จะสามารถเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบได้ และโดยปกติแล้วประจุบวกของสารละลายอิเล็กโทรไลต์จะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลน้ำ เมื่อประจุบวกเกิดการเคลื่อนที่จึงดึงเอาโมเลกุลน้ำเคลื่อนที่ไปด้วย เรียกปรากฏการณ์การเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้ำหรือสารละลายนี้ว่า อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis) และเรียกการเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลนี้ว่า การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF) ซึ่งสารทุกชนิดในคะพิลลารีจะได้รับอิทธิพลของ EOF เท่ากันในขณะที่เคลื่อนที่ไปยังปลายด้านเครื่องตรวจวัด แต่เนื่องจากสารมีค่า μ ที่ต่างกัน จึงสามารถแยกออกจากกันได้



รูปที่ 2.2 การเกิด double layer ที่ผนังคะพิลลารี (20)

ความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิสที่ความเข้มข้นไฟฟ้า 1 V m^{-1} เรียกว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วยอิเล็กโทรออสโมซิส หรือสัมประสิทธิ์ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility หรือ electroosmotic coefficient, μ_{eo}) โดย μ_{eo} สามารถคำนวณได้จากสมการ 2.4 (19)

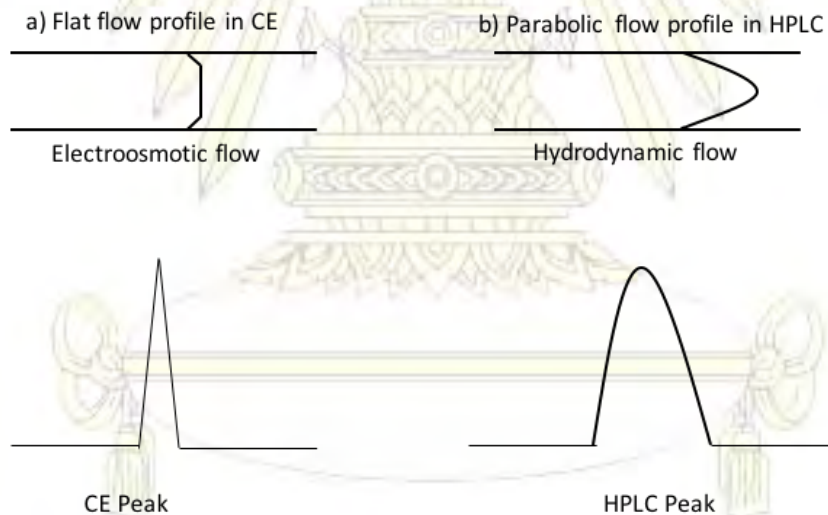
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ϵ permittivityของตัวกลาง

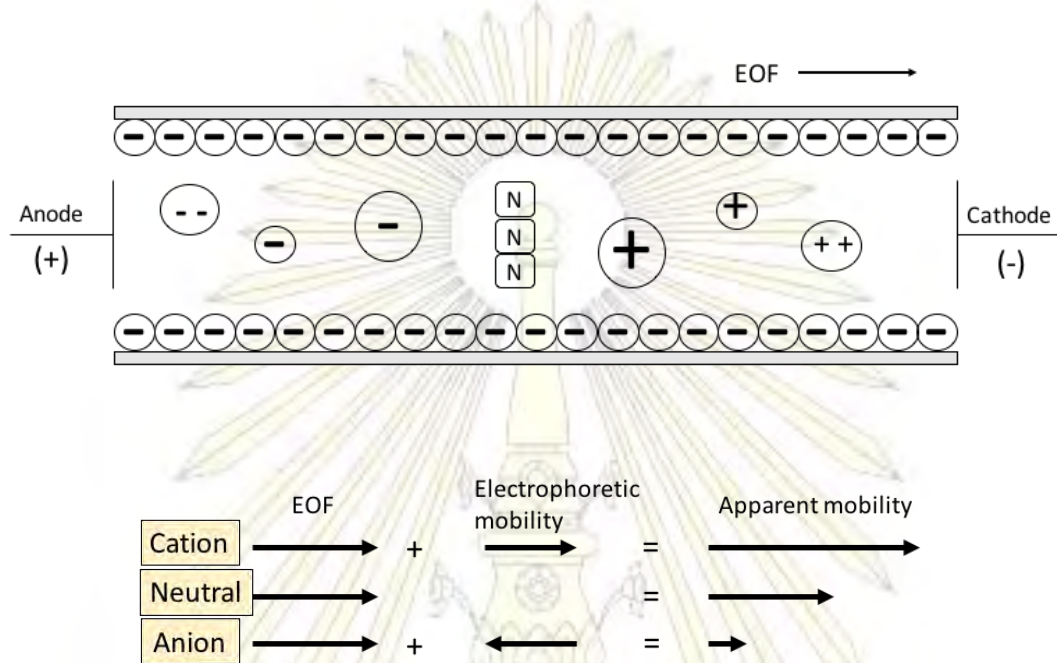
ζ ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential)

μ_{eo} มีค่าเท่ากันตลอดรัศมีของคะปิลลารี จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค CE จึงเป็นแบบหน้าตัดเรียบ (flat flow profile) ซึ่งจะแตกต่างกับในเทคนิค HPLC ที่ใช้ปั๊มในการผลักดันให้สารเคลื่อนที่ไปในเฟสคงที่ ทำให้สารมีการเคลื่อนที่แบบพาราโบลา (parabolic profile) เป็นเหตุให้พีคของสารในเทคนิค HPLC มีความกว้างมากกว่าในเทคนิค CE ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการแยกของสารในเทคนิค CE นั้นดีกว่าเทคนิค HPLC ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ลักษณะการไหลและพีคที่ได้ของเทคนิค CE เทียบกับเทคนิค HPLC

2.5.2.1 การเคลื่อนที่ของสารในภาวะใต้ EOF ปกติ (Normal EOF)

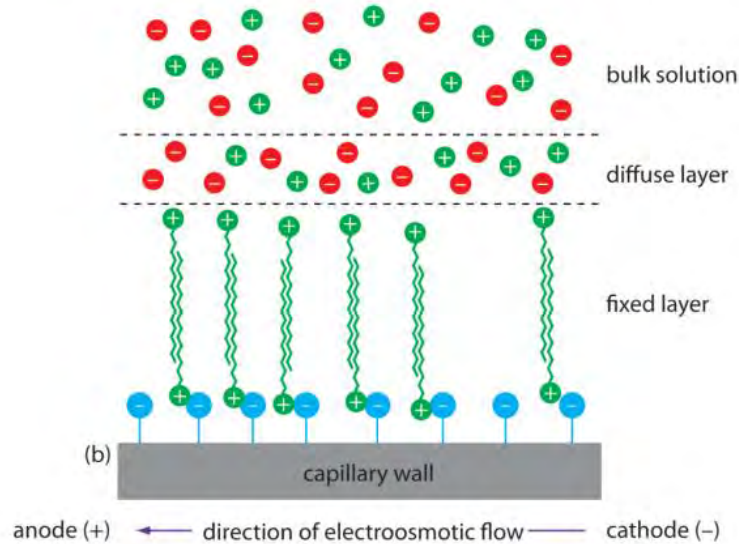


รูปที่ 2.4 ทิศทางการไหลของ EOF พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารในเคปิลลารีภายใต้ภาวะ EOF ปกติและค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าสุทธิ

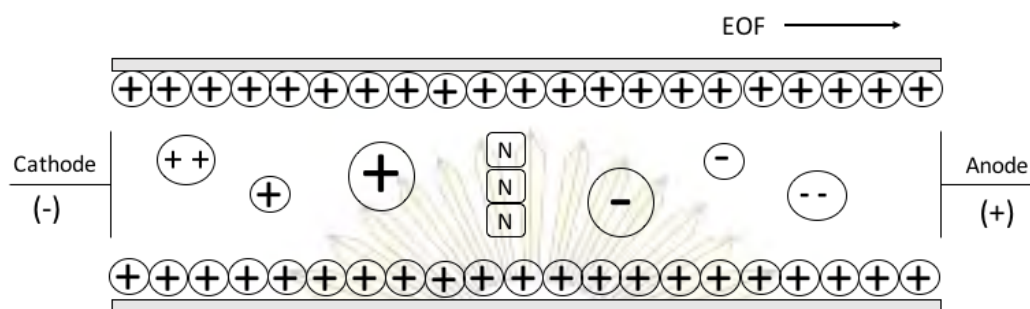
ในภาวะปกติ EOF จะมีทิศทางการไหลโดยเคลื่อนที่ไปยังปลายด้านเครื่องตรวจวัดหรือหัวลบ สารทุกชนิดในเคปิลลารีจะได้รับอิทธิพลจาก EOF เท่ากัน ดังนั้นไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกับ EOF จึงทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของไอออนบวกมาจากความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวไอออนเอง ($v_{ep,+}$) รวมกับความเร็วในการเคลื่อนที่เนื่องมาจาก EOF (v_{eo}) ดังนั้นไอออนบวกที่มีค่าประจุมากและมีรัศมีไฮโดรไดนามิกน้อย (ค่า μ มาก) จะเคลื่อนที่มาถึงตัวตรวจวัดได้ก่อน ดังรูปที่ 2.4 ส่วนประจูลบนั้นจะมีทิศทางการเคลื่อนที่สวนกับทิศของ EOF นั่นคือเคลื่อนที่ไปทางปลายด้านเข้าหรือหัวบวก แต่ถ้าหาก v_{eo} มีขนาดมากกว่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวไอออนลบ ($v_{ep,-}$) ในที่สุด EOF จะสามารถพาประจูลบเคลื่อนที่ไปถึงตัวตรวจวัดได้ แต่ลำดับการเคลื่อนที่ที่ตรงข้ามกับประจูลบ โดยไอออนลบที่มีค่าประจุน้อยและรัศมีไฮโดรไดนามิกมาก (ค่า μ น้อย) จะเคลื่อนที่ออกมาถึงตัวตรวจวัดได้ก่อน ส่วนสารตัวอย่างที่ไม่มีประจุจะสามารถเคลื่อนที่ไปยังด้านตัวตรวจวัดได้ด้วย EOF เพียงอย่างเดียวเท่านั้น จึงทำให้ไม่สามารถแยกสารที่ไม่มีประจุออกจากกันโดยสารที่ไม่มีประจุทั้งหมดจะเคลื่อนที่ออกมายังตัวตรวจวัดพร้อม ดังนั้นในภาวะที่ EOF ปกติ ลำดับการมาถึงตัวตรวจวัดของสารเป็นดังนี้ คือ ไอออนบวก สารไม่มีประจุ และไอออนลบ

2.5.2.2 การกลับทิศทางการไหลของ EOF (Reversed EOF)

การกลับทิศทางการไหลของ EOF นั้น มักจะใช้ในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นประจุลบที่มีค่า μ มาก เพื่อช่วยให้สารเคลื่อนที่มาถึงตัวตรวจวัดได้เร็วขึ้น โดยการกลับทิศของ EOF นั้น จะสามารถทำได้ด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก (cationic surfactant) เช่น Tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) ลงไปในสารละลาย ส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกจะเกิดแรงดึงดูดแบบไอออนิกและถูกดูดซับที่ผิวคะพิลลารีที่มีประจุลบ (รูป 2.5) ส่วนหางจะชี้ออกมาในสารละลาย และเมื่อเพิ่มปริมาณของสารลดแรงตึงผิว ส่วนหางของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวจะเข้าแทรก เกิดแรงแวนเดอร์วาลส์กับส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวที่ชั้นแรกและหันส่วนหัวออก ทำให้ผิวคะพิลลารีเสมือนเป็นประจุบวกและในสารละลายมีประจุลบกระจายอยู่มากกว่าประจุบวก เมื่อทำการให้ศักย์ไฟฟ้า ประจุลบเหล่านี้จะเคลื่อนที่พร้อมกับโมเลกุลน้ำไปยังด้านเข้าหรือด้านขั้วบวก เกิดเป็น EOF ที่มีทิศไปทางขั้วบวก (EOF กลับทิศทาง) ดังนั้นถ้าต้องการให้ EOF มีทิศทางเคลื่อนที่ไปยังด้านตัวตรวจวัดหรือขั้วลบ จะต้องทำการกลับขั้วไฟฟ้า (reversed polarity) โดยให้ศักย์ไฟฟ้าด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก โดยการกลับทิศของ EOF มักจะทำควบคู่กับการกลับทิศของขั้วไฟฟ้า ซึ่งลำดับการเคลื่อนที่มาถึงตัวตรวจวัดเป็นดังนี้คือ ไอออนลบ สารไม่มีประจุ และไอออนบวก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.5 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทแคทไอออนต่อทิศทางการไหลของ EOF และพฤติกรรมเคลื่อนที่ของสารในคัพโวลัมภายใต้ reversed EOF

2.5.2.3 การลด EOF

การลด EOF ทำเพื่อปรับปรุงการแยกของสารหรือลดการดูดซับของสารตัวอย่างที่เป็นประจุบวกกับประจุลบที่ผิวคัพโวลัม โดยวิธีการลด EOF มีดังนี้

- 1) ใช้ pH ต่ำ เช่น ในช่วง 2.5 – 3.0
- 2) เพิ่มความหนืดโดยการเติมสารที่มีความหนืดสูง เช่น cellulose
- 3) ใช้ BGE ที่ประกอบด้วยไอออนบวก ที่ถูกดูดซับที่ผิวคัพโวลัมได้เพื่อลดความหนาแน่นของประจุลบที่ผิวคัพโวลัม เช่น triethylamine และ triethanolmine
- 4) ใช้คัพโวลัมที่มีการเคลือบผิวด้านในเพื่อลดความหนาแน่นของประจุคัพโวลัม

2.5.2.4 ปัจจัยมีผลต่อ EOF มีดังนี้

- 1) ความแรงไอออนิก (ionic strength) หรือความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

เมื่อเพิ่มความแรงไอออนิกหรือเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ทำให้ความหนาแน่นของ diffusion layer ลดลง ส่งผลให้ขนาดของ ζ ลดลง ดังนั้นค่า μ_{eo} จึงลดลง แต่ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มากเกินไป อาจทำให้ค่า μ_{eo} เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากผลของการเกิด Joule heating ทำให้สารละลายมีความหนืดลดลง

2) pH ของบัฟเฟอร์

เมื่อเพิ่มค่า pH ของบัฟเฟอร์จะทำให้ค่า μ_{eo} เพิ่มขึ้น เนื่องจากหมู่ซิลานอลที่ผิวคะปิลลารีแตกตัวได้มากขึ้น ผิวคะปิลลารีจึงประจุลบมากขึ้น

3) ความหนืดและอุณหภูมิของสารละลาย

ค่า μ_{eo} จะแปรผกผันกับความหนืด ดังนั้นการเพิ่มความหนืดของสารละลายจะทำให้ค่า μ_{eo} ลดลง ส่วนการเพิ่มอุณหภูมินั้นเป็นการลดความหนืดของสารละลาย ทำให้ค่า μ_{eo} เพิ่มขึ้นได้

4) ตัวทำละลายอินทรีย์

การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงในบัฟเฟอร์ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายอาจช่วยเพิ่มการละลายของสารตัวอย่างหรือช่วยปรับปรุงการแยกได้ แต่อย่างไรก็ตามการเติมตัวทำละลายอินทรีย์จะส่งผลให้ EOF ลดลง เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์อาจเกิดอันตรกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลบริเวณผิวคะปิลลารี ทำให้มีความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ในบริเวณ double layer เพิ่มขึ้น และความหนืดบริเวณ double layer สูงขึ้น ส่งผลให้ค่า μ_{eo} ลดลง

5) ความต่างศักย์และขนาดคะปิลลารี

ในทางทฤษฎีแล้ว ค่า μ ไม่ขึ้นกับความต่างศักย์หรือขนาดของคะปิลลารี แต่ในทางปฏิบัติการเพิ่มความต่างศักย์และเพิ่มขนาดคะปิลลารีนั้น อาจส่งผลให้เกิด Joule heating มากขึ้น เนื่องจากคะปิลลารีที่ขนาดใหญ่ขึ้นจะระบายความร้อนที่เกิดขึ้นออกไปได้ช้า ทำให้ความหนืดของสารละลายลดลงและส่งผลให้ค่า μ_{eo} มากขึ้นได้

2.5.3 ไมเกรชันไทม์ (Migration time, t_m)

กราฟที่แสดงผลการวิเคราะห์จากเทคนิค CE เรียกว่า อิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) ดังรูปที่ 2.6 โดยระยะเวลาที่สารใช้เคลื่อนที่จากปลายคะปิลลารีด้านเข้าไปยังเครื่องตรวจจับเรียกว่า ไมเกรชันไทม์ (migration time, t_m) ในภาวะปกติ สารที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน นั่นคือมีค่า t_m น้อยที่สุด ตามด้วยสารที่ไม่มีประจุ และสารที่มีประจุลบตามลำดับ โดยความเร็วของสารที่เคลื่อนที่ออกมา (v_{net}) จะเป็นผลรวมของความเร็วของตัวเอง (v_{ep}) กับความเร็วของ EOF (v_{eo}) ดังสมการ

$$V_{\text{net}} = V_{\text{ep}} + V_{\text{eo}} \quad (2.5)$$

$$\mu_{\text{net}} = \mu + \mu_{\text{eo}} \quad (2.6)$$

ค่าไมเกรชันใหม่ที่ได้จากอิเล็กโทรโฟโกราฟี จะสามารถนำไปคำนวณหา μ ได้ดังสมการ (19)

$$\mu_{\text{eo}} = \frac{L}{vt_{\text{eo}}}, \quad \mu_{\text{net}} = \frac{L}{vt_{\text{m}}} \quad (2.7)$$

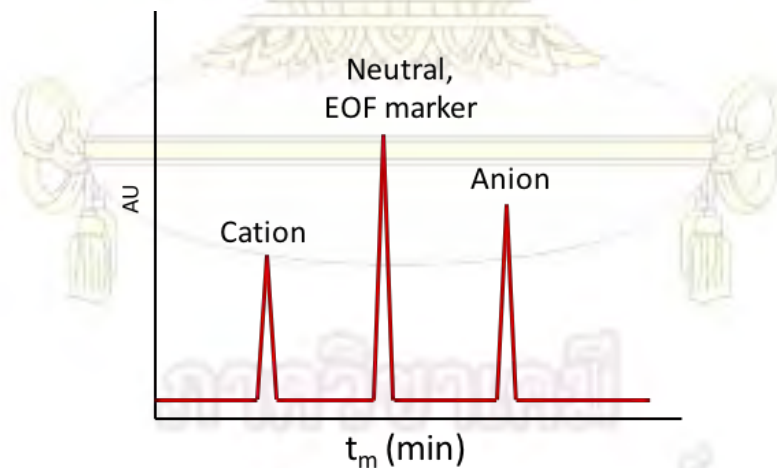
$$\mu = \mu_{\text{net}} - \mu_{\text{eo}} = \left(\frac{1}{t_{\text{m}}} - \frac{1}{t_{\text{eo}}} \right) \frac{L}{V} \quad (2.8)$$

L คือ ความยาวทั้งหมดของกะพิลลารี (m)

l คือ ความยาวจากปลายกะพิลลารีด้านบรรจุน้ำจนถึงเครื่องตรวจจับ (m)

V คือ ศักย์ไฟฟ้า (V)

t_{eo} คือ ไมเกรชันใหม่ของสารที่ไม่มีประจุหรือ EOF marker (s)

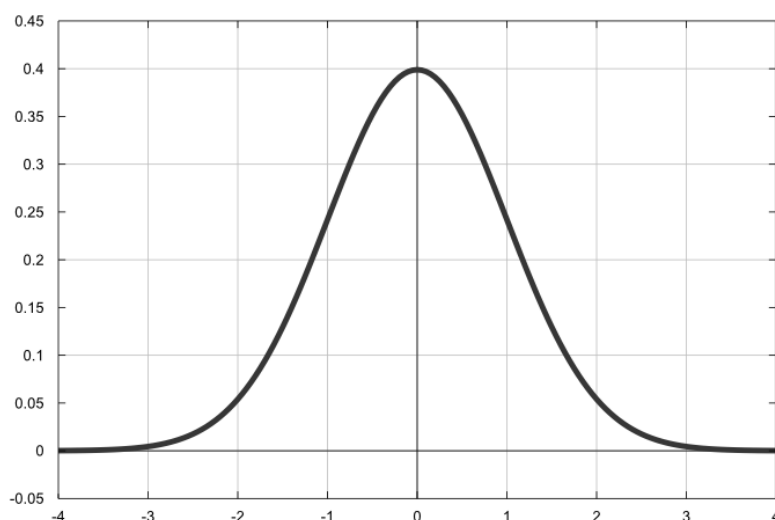


รูปที่ 2.6 อิเล็กโทรโฟโกราฟีที่ได้จากเครื่อง CE และลำดับการแยกของสารในภาวะ EOF ปกติ

2.5.4 Joule heating

เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารีที่บรรจุสารอิเล็กทรอนิกส์ จะเกิดกระแสไฟฟ้าตลอดพื้นที่หน้าตัดของคะพิลลารี ทำให้เกิดความร้อนภายในคะพิลลารี เรียกว่า Joule heating ความร้อนที่ผิวคะพิลลารีสามารถถ่ายเทสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้การเพิ่มอุณหภูมิภายในคะพิลลารีเป็นแบบพาราโบลาคว่ำ นั่นคือสารละลายที่ผิวคะพิลลารีจะมีอุณหภูมิต่ำที่สุด และอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะห่างจากผนังคะพิลลารี โดยตรงกลางคะพิลลารีจะมีอุณหภูมิสูงที่สุด ถ้าหากคะพิลลารีไม่มีระบบระบายความร้อน อุณหภูมิภายในคะพิลลารีจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เกิดการไหลแบบพาราโบลาและเกิดการแพร่กระจายของไอออนสาร ประสิทธิภาพการแยกลดลง ดังนั้นในเครื่อง CE ทั่วไป จะมีระบบควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อากาศ น้ำ หรือสารหล่อเย็น เพื่อลด Joule heating ที่เกิดจากการใช้ศักย์ไฟฟ้าและเพื่อควบคุมอุณหภูมิภายในคะพิลลารีให้คงที่

2.5.5 การกระจายของพีคใน CE (Peak dispersion in CE)



รูปที่ 2.7 ลักษณะของพีคที่มีการกระจายแบบ Gaussian (21)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยทั่วไปพีคในอุดมคติจะมีลักษณะเป็น Gaussian peak ดังรูปที่ 2.7 จะเห็นได้ว่าพีคมีลักษณะสมมาตร แต่ในความเป็นจริงพีคอาจมีการกระจายตัวเบี่ยงเบนไปจากลักษณะของพีคในอุดมคติเนื่องจากการแพร่กระจายของไอออนสาร ทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกลดลง โดยการกระจายของไอออนสารมี 2 แบบ คือ zone dispersion จะเป็นการกระจายของสารในไอออนซึ่งเกิดในคะพิลลารี และ peak dispersion เป็นการกระจายของพีคในอิเล็กทรอนิกส์โทรโปรแกรม ซึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้เกิดการกระจายของไอออนและพีคของสารนั้นมีดังนี้

1) การแพร่ตามความยาว (longitudinal diffusion) เป็นการแพร่กระจายของไอออนสารไปทางด้านหน้าและด้านหลังตามแนวแกน x ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของความเข้มข้นระหว่างบริเวณไอออนสารตัวอย่างและไอออนบัฟเฟอร์

2) การกระจายเนื่องจากความร้อน (thermal dispersion) เป็นการแพร่กระจายของไอออนสารเนื่องจากความร้อนที่เกิดจากการเกิด Joule heating ทำให้เกิดการเคลื่อนที่แบบพาราโบลา นั่นคือสารเคลื่อนที่ด้วยความเร็วไม่เท่ากัน สารที่อยู่บริเวณตรงกลางของคะพิลลารีจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วที่สุด เนื่องจากมีความหนืดน้อยที่สุด

3) การกระจายเนื่องจาก electromigration dispersion (EMD) เกิดเมื่อค่า μ ของสาร A (μ_A) แตกต่างกับค่า μ ของ BGE เนื่องมาจากบริเวณของสารกับบริเวณของบัฟเฟอร์มีค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) ที่ต่างกันส่งผลให้สารในบริเวณส่วนต้น กลาง และส่วนปลายเคลื่อนที่ด้วยความเร็วไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดการกระจายแบบ tailing หรือ fronting ส่งผลให้พีคที่ตรวจวัดได้ไม่มีความสมมาตร

4) การดูดซับของผนังคะพิลลารี (wall dispersion) จากการที่ผนังด้านในของคะพิลลารีเป็นประจุลบ สารตัวอย่างที่เป็นประจุบวก สามารถเกิดอันตรกิริยาหรือถูกดูดซับที่ผนังของคะพิลลารีได้ ทำให้เกิดการกระจายแบบ tailing

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5.6 ประสิทธิภาพการแยกและค่าการแยก (Efficiency and Resolution)

2.5.6.1 ประสิทธิภาพหรือจำนวนเพลตทางทฤษฎี (Efficiency หรือ the number of theoretical plate, N)

จำนวนเพลตทางทฤษฎี (N) จะแสดงถึงศักยภาพในการแยกของสาร ในทางปฏิบัติสามารถเพิ่มค่า N ด้วยการลดปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายของไอออนสาร โดยค่า N จะหาได้ตามสมการ (19)

$$N = \frac{l}{H_{\text{net}}} \quad (2.9)$$

$$N = \frac{l^2}{\sigma^2} = \frac{t_m^2}{t^2} = 5.54 \left(\frac{t_m}{w_{0.5h}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 \quad (2.10)$$

N คือ จำนวนเพลตทางทฤษฎี

l คือ ความยาวคอลัมน์

H คือ ความสูงเพลต

$w_{0.5h}$ คือ ความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูงพีค

w คือ ความกว้างของฐานพีค

σ^2 คือค่าความแปรปรวนของพีค

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5.6.2 ค่าการแยก (Resolution)

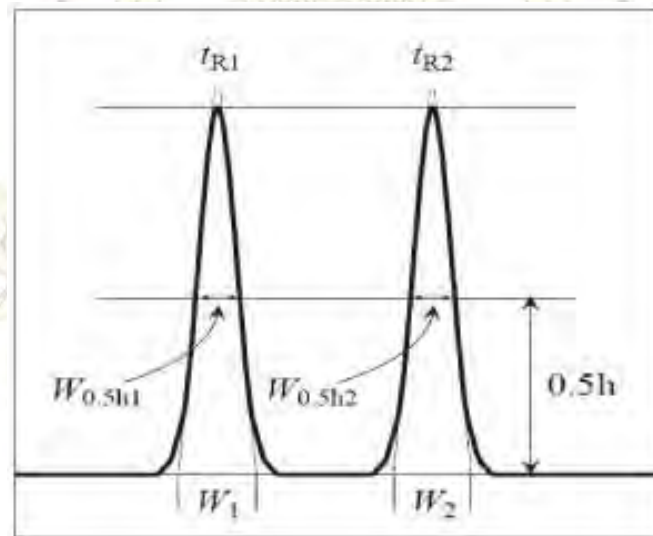
ค่าการแยก หมายถึงระยะจากกึ่งกลางของพีคต่อค่าเฉลี่ยของความกว้างของฐานพีค(ในหน่วยเวลาหรือหน่วยระยะทาง) หรือหมายถึงความแตกต่างของไมเกรชั่นไทม์ของสารต่อค่าเฉลี่ยความกว้างของฐานพีค (ในหน่วยเวลา) โดยสามารถทำการคำนวณค่าการแยก (R_s) ได้จากสมการ(19)

$$R_s = \frac{\Delta x}{0.5(w_1+w_2)} = \frac{\Delta t_m}{0.5(w_1+w_2)} \quad (2.11)$$

Δt_m คือ ความแตกต่างของไมเกรชั่นไทม์

Δx คือความแตกต่างของระยะกึ่งกลางพีค

w_1 และ w_2 คือ ความกว้างของฐานพีคของสาร 1 และ 2 ตามลำดับ (หน่วยระยะทางสำหรับ Δx และหน่วยเวลาสำหรับ Δt_m) การหาค่าการแยกของพีคจากอิเล็กโตรโครมาโตแกรมแสดงในรูป 2.8(22)



รูปที่ 2.8 การหาค่าการแยกจากพีค (22)

2.5.7 การเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ (On-line preconcentration)

สารที่มีสมบัติการดูดกลืนยูวีต่ำ อาจทำให้การตรวจวัดสารที่มีความเข้มข้นน้อย เป็นไปอย่างไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ โดยใช้เทคนิค CE โดยอาศัยการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากแล้วทำให้สารเคลื่อนที่มาชิดกัน ซึ่งจะทำความเข้มข้นของไอออนสารตัวอย่างเพิ่มขึ้น วิธีนี้เป็นวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ได้อย่างถูกต้องมากขึ้น ซึ่งเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของสารแบบออนไลน์ในเทคนิค CE มีด้วยกันหลายวิธี เช่น

- Sample stacking เป็นเทคนิคที่ทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าชิดกัน ทำให้ความยาวของไอออนสารแคบลง เกิดขึ้นเมื่อสารตัวอย่างมีสภาพการนำไฟฟ้า (conductivity) น้อยกว่าสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ดังนั้นบริเวณไอออนสารตัวอย่างในแคพิลลารีจะมีความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าสูงกว่าไอออนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่มาเจอกับไอออนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ จะเกิดการชะลอความเร็วลงทำให้ไอออนของสารมาชิดกันเกิดการ stacking หรือการอัดกันของไอออนสาร ทำให้ไอออนสารแคบลงและมีความเข้มข้นสูงขึ้น

- การบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก (Large volume sample stacking using an EOF pump) วิธีนี้สารจะต้องเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF ดังนั้นจะเหมาะสมกับสารที่เป็นไอออนลบ และจะต้องทำที่ pH ต่ำ เพื่อลดความแรงของ EOF ดังนั้นสารที่เป็นไอออนลบจะสามารถต้านการเคลื่อนที่ของ EOF ได้ วิธีนี้ทำได้โดยการบรรจุสารตัวอย่างในปริมาณมากด้วยความดัน จากนั้นเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า สารที่เป็นประจุลบจะเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF และใช้ EOF ในการกำจัดเมทริกซ์ออกในขณะที่สารเกิดการ stacking เป็นไอออนที่แคบลงและมีความเข้มข้นมากขึ้น

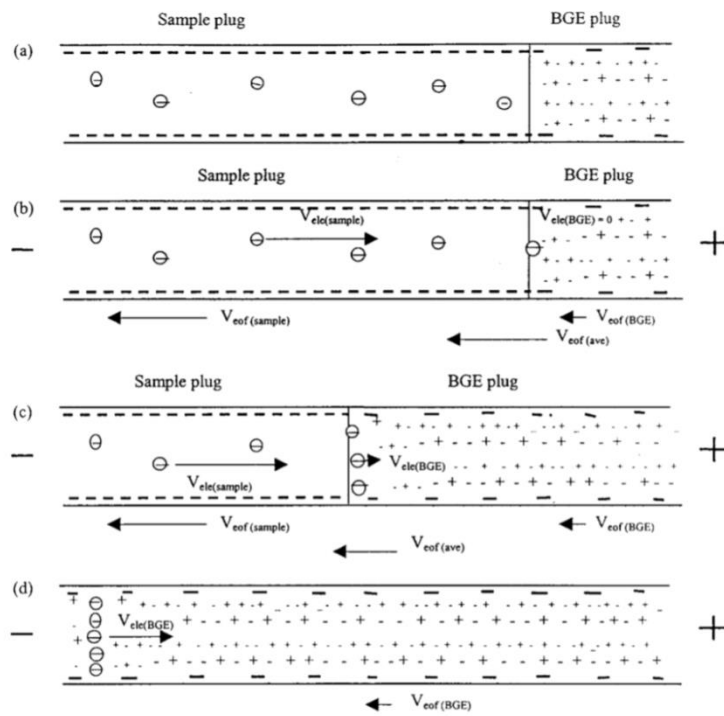
เนื่องจากไอโอไดต์และไอโอเดตมีค่าการดูดกลืนยูวีต่ำและมีประจุลบ จึงมีทิศทางการเคลื่อนที่ตรงข้ามกับ EOF ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของไอโอไดต์และไอโอเดตในแคพิลลารีด้วยการการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก

2.5.8 การบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดัน แล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก (Large volume sample stacking using an EOF pump)

เป็นวิธีการเพิ่มความเข้มข้นโดยอาศัยหลักการบรรจุสารตัวอย่างเข้าไปในแคพิลลารีในปริมาณมากด้วยความดันและกำจัดเมทริกซ์ออกภายใต้อิทธิพลของ EOF ที่ไม่สูงมากนัก (low EOF) (18) ดังนั้นจะต้องทำที่ pH ต่ำ โดยสารที่ต้องการเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิคนี้จะต้องเป็นสารที่แตกตัวให้ประจุลบ ซึ่งสารจะเคลื่อนที่ตรงข้ามกับ EOF แต่เนื่องจาก EOF ความแรงต่ำ สารที่เป็นไอออนลบจะสามารถต้านการเคลื่อนที่ของ EOF ได้ ขั้นตอนการทำงานของวิธีนี้อธิบายได้ดังรูปที่ 2.9 (18) (a) เป็นการบรรจุสารปริมาณมากด้วยความดัน เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบรรจุสารมากขึ้น สารจะสามารถเคลื่อนที่เข้าไปในแคพิลลารีได้มากขึ้น ขั้นตอนต่อมาใน (b) เมื่อเริ่มต้นให้ศักย์ไฟฟ้าโดยการเปลี่ยนใช้ reversed polarity สารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับด้านขั้วไฟฟ้าแอโนด ส่วน EOF จะพาเมทริกซ์ซึ่งมีประจุเป็นบวก กลาง หรือประจุลบที่ไม่สามารถต้าน EOF ได้ เคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าด้านลบหรือด้านแคโทด (cathode) ต่อมาในรูป (c) สารที่มีประจุไฟฟ้าลบที่เคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับอย่างต่อเนื่องนั้นจะเกิดแรงต้านกับแรงของ EOF จึงเกิดการเคลื่อนที่ถอยย้อนกลับมาทางด้านขั้วไฟฟ้าแอโนด เนื่องจากสถานะของ EOF ที่ไม่สูงมาก จึงทำให้สารมีแรงพอที่จะเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องไปยังเครื่องตรวจจับ จึงทำให้เกิดการรวมตัวของสารเป็นโซนแคบ ๆ ในขณะที่ EOF ก็เคลื่อนที่พาเอาเมทริกซ์ออกจากโซนสารตัวอย่าง ขั้นตอนสุดท้ายใน (d) EOF พาเมทริกซ์ออกไปจากคอลัมน์และสารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ออกมาถึงเครื่องตรวจจับตามทิศทางการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารอย่างต่อเนื่อง โดยสารจะเกิดการแยกจากกันตามค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า

ข้อดีของเทคนิคนี้คือเป็นวิธีที่ง่ายและเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารและแยกสาร (preconcentration and separation) แบบต่อเนื่องโดยไม่ต้องสลับขั้วไฟฟ้า

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.9 การเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างในแคพิลลารีโดยใช้วิธีการบรรจุสารตัวอย่างปริมาณมากด้วยความดันร่วมกับการกำจัดเมทริกซ์ด้วย EOF (a) เริ่มต้นบรรจุสารตัวอย่างเข้าไปในแคพิลลารีในปริมาณมากด้วยความดัน (b) เริ่มต้นให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเข้าไปในระบบ โดยใช้ reversed polarity (c) สารที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก ส่วน EOF เคลื่อนที่ไปทางขั้วลบและพาเมทริกซ์ออกไปจากระบบ (d) สารที่มีประจุลบเกิดการรวมตัวเป็นไอออนสารตัวอย่างที่แคบลง มีความเข้มข้นสูงขึ้นและเคลื่อนที่ออกมายังเครื่องตรวจวัดตามทิศทางการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารอย่างต่อเนื่อง(18)

$V_{ele (sample)}$ คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่ (electrophoretic velocity) ของไอออนลบใน โชนสารตัวอย่าง (sample plug)

$V_{ele (BGE)}$ คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่ (electrophoretic velocity) ของไอออนลบใน โชน สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (BGE plug)

$V_{eo (sample)}$ คือ EOF ในโชนสารตัวอย่าง (sample plug)

$V_{eo (ave)}$ คือ EOF เฉลี่ยในแคพิลลารี

2.6 การทำคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ในเทคนิค CE

(Qualitative and quantitative analysis in CE)

2.6.1 คุณภาพวิเคราะห์

การทำคุณภาพวิเคราะห์ในเทคนิค CE สามารถทำได้ดังนี้

1) เปรียบเทียบจากค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (μ) ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน สารชนิดเดียวกันจะให้ค่า μ เท่ากัน

2) เปรียบเทียบจากยูวีสเปกตรัมของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน โดยสารชนิดเดียวกันจะให้รูปแบบสเปกตรัมออกมาเหมือนกัน

3) การเติมสารมาตรฐาน (spiked technique) คือการเติมสารละลายมาตรฐานของสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไป หากพีคของสารใดที่มีพื้นที่ใต้พีคสูงมากขึ้น แสดงว่าพีคนั้นคือพีคของสารที่ต้องการวิเคราะห์

4) ใช้เทคนิค CE-MS ในการช่วยระบุและยืนยันโครงสร้างของสารตัวอย่าง

2.6.2 ปริมาณวิเคราะห์

ในการทำปริมาณวิเคราะห์ของเทคนิค CE นั้น จะไม่สามารถใช้พื้นที่ใต้พีคมาทำการคำนวณหาปริมาณโดยตรงได้ เนื่องจากสารเคลื่อนที่ผ่านตัวตรวจวัดด้วยความเร็วที่ต่างกัน (ขึ้นกับค่า μ) สารที่เคลื่อนที่ได้ช้าจะใช้เวลานานในการผ่านตัวตรวจวัด ส่วนสารที่เคลื่อนที่ได้เร็วจะใช้เวลาในการผ่านตัวตรวจวัดน้อย ดังนั้นพีคของสารที่เคลื่อนที่ได้ช้าจะมีการกระจายของพีคที่กว้างกว่าสารที่เคลื่อนที่ได้เร็ว ดังนั้นในเทคนิค CE จึงจะใช้ค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีค (A) กับไมเกรชันไทม์ เรียกว่า พื้นที่ใต้พีคปรับค่า (corrected peak area, A_{corr}) มาใช้ในการคำนวณปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งค่าพื้นที่ใต้พีคปรับค่าจะช่วยแก้ปัญหาการเคลื่อนที่ของสารที่ผ่านตัวตรวจวัดด้วยความเร็วไม่เท่ากัน เพราะสารมีปริมาณเท่ากันและมี analytical response เท่ากัน สารที่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าทำให้มีพื้นที่ใต้พีคมากกว่า แต่จะมี A_{corr} ที่เท่ากัน โดยค่า A_{corr} สามารถคำนวณได้ดังสมการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$A_{corr} = \frac{A}{t_m} \quad (2.12)$$

โดยทั่วไป การทำปริมาณวิเคราะห์ในเทคนิค CE จะใช้วิธีเทียบกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน จำนวน 5 ความเข้มข้น นำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE และหาค่า A และ t_m จากอิเล็กโทรโฟโกราแกรมเพื่อคำนวณ A_{corr} จากนั้นนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร (แกน x) กับค่า A_{corr} (แกน y) จะได้กราฟเส้นตรง ที่มีสมการ $y=mx + c$ และนำสมการเส้นตรงที่ได้มาใช้ในการหาปริมาณของสารตัวอย่าง โดยแทนค่า A_{corr} ของของสารตัวอย่างลงในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่องคะพิลลารีอิล็กโทรฟอริซิส บริษัท Beckman รุ่น MDQ
- 2) เครื่องวัดพีเอช บริษัท Mettler Toledo
- 3) เครื่อง Sonication บริษัท Ultrasonic ster-cleaner

3.2 สารเคมี

1. di-Sodium tetraboratedecahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, มวลโมเลกุล = 381.37 g/mol) ของบริษัท AnalaR
2. Sodium phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, มวลโมเลกุล = 137.99 g/mol) ของบริษัท Sigma-Aldrich
3. Tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB, $\text{C}_{14}\text{H}_{29}(\text{CH}_3)_3\text{NBr}$, มวลโมเลกุล = 336.4 g/mol) ของบริษัท Sigma-Aldrich
4. Sodium oxalate ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, มวลโมเลกุล = 134 g/mol) ของบริษัท Baker analyzed
5. Citric acid monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, มวลโมเลกุล = 210.14 g/mol) ของบริษัท Riedel deHaen
6. Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4 , มวลโมเลกุล = 136.09 g/mol) ของบริษัท AnalaR
7. Potassium iodide (KI, มวลโมเลกุล = 166.00 g/mol) ของบริษัท Sigma-Aldrich

8. Potassium iodate (KIO_3 , มวลโมเลกุล = 214.00 g/mol) ของบริษัท Sigma-Aldrich

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

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

11. น้ำ Milli Q จากเครื่อง Millipak R 40 filterunit 0.22 μm Millipore ของบริษัท Merckmillipore

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 25 mL

เตรียมได้จากการชั่ง di-Sodium tetraboratedecahydrate 0.9534 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

3.3.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 500 mM ปริมาตร 25 mL

เตรียมได้จากการชั่ง Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.6899 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

3.3.3 สารละลายมาตรฐานออกซาเลตความเข้มข้น 1000 mg/L และซิเตรตความเข้มข้น 5000 mg/L ปริมาตร 25 mL

เตรียมได้จากการชั่ง Sodium oxalate 0.025 g และ Citric acid monohydrate 0.125 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL (เตรียมแยกกัน)

3.3.4 สารละลาย TTAB ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 100 mL

เตรียมได้จากการชั่ง TTAB 0.1682 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL

3.3.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 25 mL

เตรียมได้จากการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

3.3.6 สารละลายมาตรฐานไอโอดีน ความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 25 mL

เตรียมได้จากการชั่งโพแทสเซียมไอโอดีน 0.025 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

3.3.7 สารละลายมาตรฐานไอโอดีน ความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 25 mL

เตรียมได้จากการชั่งโพแทสเซียมไอโอดีน 0.025 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

3.3.8 สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 50 mL

เตรียมได้จากการชั่ง potassium dihydrogen orthophosphate 0.2722 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 ภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคคัพปลารี่อิเล็กโทรฟอริซิสสำหรับหาปริมาณไอโอดีน

ไอโอดีน ออกซาเลตและซีเทรต

3.4.1 ภาวะของเครื่อง CE ที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไอโอดีนและไอโอดีน

| รูปแบบ/ภาวะที่ใช้ | รายละเอียด |
|-----------------------|---|
| เครื่อง CE | Beckman รุ่น MDQ |
| คัพปลารี่ | Uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 μm ยาว 60.2 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) |
| การบรรจุสาร | ใช้ความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 99วินาที |
| การตรวจวัด | UV-Vis ช่วง 200-400 nm เลือกตรวจวัดที่ 200 nm |
| การชะคัพปลารี่คอลัมน์ | ก่อนทำการวิเคราะห์ครั้งแรกในแต่ละวัน ทำการชะด้วย 1. สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 15 นาที 2. สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ เป็นเวลา 15 นาที ระหว่างทำการวิเคราะห์แต่ละครั้งก่อนทำการบรรจุสารที่วิเคราะห์ในคัพปลารี่คอลัมน์ จะชะด้วย 1. สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 1 นาที 2. สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ เป็นเวลา 2 นาที หลังการทำการวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายในแต่ละวัน ทำการชะด้วย 1. สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 15 นาที 2. น้ำ Milli Q เป็นเวลา 15 นาที |
| อุณหภูมิของคัพปลารี่ | 25 °C |

3.4.2 ภาวะของเครื่อง CE ที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซีเทรต

| รูปแบบ/ภาวะที่ใช้ | รายละเอียด |
|-----------------------|---|
| เครื่อง CE | Beckman รุ่น MDQ |
| คะปิลลารี | Uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 μm ยาว 60.2 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) |
| การบรรจุสาร | ใช้ความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10วินาที |
| การตรวจวัด | UV-Vis ช่วง 200-400 nm เลือกตรวจวัดที่ 195 nm |
| การชะคะปิลลารีคอลัมน์ | <p>ก่อนทำการวิเคราะห์ครั้งแรกในแต่ละวัน ทำการชะด้วย</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 15 นาที 2. สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ เป็นเวลา 15 นาที <p>ระหว่างทำการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ก่อนทำการบรรจุสารที่วิเคราะห์ในคะปิลลารีคอลัมน์ จะชะด้วย</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 1 นาที 2. สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ เป็นเวลา 2 นาที <p>หลังการทำการวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายในแต่ละวันทำการชะด้วย</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 15 นาที 2. น้ำ Milli Q เป็นเวลา 15 นาที |
| อุณหภูมิของคะปิลลารี | 25 °C |

3.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

3.5.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์

ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ (limit of detection, LOD) หาได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เริ่มจาก 1 mg/L และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม จากนั้นลดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานลงไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) มีค่าใกล้เคียงกับ 3 ทำการคำนวณขีดจำกัดของการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือตามสมการที่ 3.1

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

3.5.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

สร้างกราฟมาตรฐานจากการเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารที่ทำกรวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q โดยปริมาตรของสารละลายที่ต้องทำการปิเบตจาก stock solution แสดงดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม และสร้างกราฟมาตรฐานโดยกำหนดให้แกน x คือ ความเข้มข้นของสาร และแกน y คือพื้นที่ใต้พีคปรับค่า (A_{corr}) ซึ่งค่า A_{corr} สามารถหาได้ดังสมการที่ 2.12

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจาก stock solution ของ ออกซาเลตความเข้มข้น 1 g/L และซีเทรตความเข้มข้น 5 g/L

| ขวดที่ | ความเข้มข้นของสารละลาย (mg/L) | | ปริมาตรของ Stock solution ที่ใช้ (μL) | |
|--------|-------------------------------|--------|---------------------------------------|--------|
| | ออกซาเลต | ซีเทรต | ออกซาเลต | ซีเทรต |
| 1 | 20 | 20 | 500 | 100 |
| 2 | 60 | 100 | 1,500 | 500 |
| 3 | 100 | 200 | 2,500 | 1,000 |
| 4 | 160 | 600 | 4,000 | 3,000 |
| 5 | 200 | 1,000 | 5,000 | 5,000 |

3.5.3 ความเที่ยง (Precision)

3.5.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตตามตารางที่ 3.2 ผสมรวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

3.5.3.2 นำสารละลายมาตรฐานมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยทำการทดลองภายในวันเดียวกัน (intraday precision) 10 ครั้ง และทำการวิเคราะห์ต่างวันเป็นเวลา 3 วัน (interday precision)

3.5.3.3 นำค่าพื้นที่ใต้พีคปรับค่าที่ได้จากอิเล็กทรอนิกส์โปรแกรม มาทำการคำนวณหาความเข้มข้นของสารด้วยสมการจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ของการวิเคราะห์ทั้ง 10 ครั้ง

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลายเพื่อทำการวิเคราะห์หาความแม่นยำและความเที่ยงของการทดลอง

| ขวดที่ | ความเข้มข้นของ Stock solution ที่ใช้ (mg/L) | | ปริมาตรของ Stock solution ที่ปิเปต(μL) | | ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายมาตรฐาน (mg/L) | |
|--------|---|--------|--|--------|---|--------|
| | ออกซาเลต | ซีเทรต | ออกซาเลต | ซีเทรต | ออกซาเลต | ซีเทรต |
| 1 | 100 | 100 | 2,000 | 2,000 | 20 | 20 |
| 2 | 200 | 1,000 | 3,000 | 2,000 | 60 | 200 |
| 3 | 1,000 | 1,000 | 850 | 4,000 | 85 | 400 |

3.5.4 ความแม่นยำ (Accuracy)

คำนวณจากการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในตัวอย่างชาของสำเร็จรูป จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE และทำการคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืนของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป โดยขั้นตอนการเตรียมสารละลายและการหาค่าร้อยละการได้กลับคืน มีดังนี้

3.5.4.1 เตรียมตัวอย่างชา โดยแช่ซองชาสำเร็จรูป น้ำหนักสุทธิ 2.0 g ลงในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 95 °C ปริมาตร 100 mL เป็นเวลา 3 นาที นำชาตัวอย่างมาทำการกรองด้วย syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 μm และนำชาตัวอย่างไปเจือจาง 2 เท่า ด้วยน้ำ Milli Q

3.5.4.2 เตรียมตัวอย่างชาที่ผสมกับสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตโดยปิเปตตัวอย่างชาของสำเร็จรูปที่ชงเรียบร้อยแล้วปริมาตร 5 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q (สารละลายชาตัวอย่างถูกเจือจาง 2 เท่า)

3.5.4.3 นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมตามหัวข้อ 3.5.4.1 และ 3.5.4.2 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม เพื่อหาปริมาณของออกซาเลตและซิเตรตในตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 10 ครั้ง

3.5.4.4 คำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืน (%recovery) ของสารละลายมาตรฐานผสมออกซาเลตและซิเตรตที่เติมลงไป โดยนำค่าพื้นที่ใต้พีคปรับค่ามาทำการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตจากกราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นในหัวข้อที่ 3.5.2 จะได้ค่าความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง (จากตัวอย่างที่เตรียมในหัวข้อ 3.5.4.1) และค่าความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตที่มีอยู่ในตัวอย่างร่วมกับสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป (จากตัวอย่างที่เตรียมในหัวข้อ 3.5.4.2) เมื่อนำมาหักลบกันจะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเตรตที่เติมลงไป จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืน ของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเตรต ดังสมการที่ 3.2

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.6 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

3.6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในซาแบบซอง

ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยการแช่ถุงชาที่มีน้ำหนักสุทธิ 2.0 g ในน้ำร้อน ปริมาตร 100 mL ที่อุณหภูมิและเวลาแช่ที่ต่าง ๆ กัน โดยใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 และ 95 °C และใช้เวลาแช่ถุงชานาน 1, 3, 5 และ 10 นาที

นำสารละลายตัวอย่างชาของสำเร็จรูปที่ซิงแล้วมาเจือจาง 2 เท่าด้วยน้ำ Milli Q จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเตรตด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม จากนั้นคำนวณหาค่า A_{corr} ของออกซาเลตและซิเตรต เพื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นของออกซาเลตและซิเตรตจากสมการของกราฟมาตรฐานโดยสมการกราฟมาตรฐานมีรูปทั่วไปดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$y = mx + c \quad (3.3)$$

- y พื้นที่ใต้พีคแก้ไข (Corrected peak area, A_{corr}) ของสารที่วิเคราะห์
- m ความชันของกราฟ
- x ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ (mg/L)
- c จุดตัดแกน y ของกราฟ

3.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไอโอดีนและไอโอดีนในซอสปรุงรส

ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างด้วยการนำซอสปรุงรสที่ต้องการวิเคราะห์มาเจือจาง 2 เท่าด้วยน้ำ Milli Q จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากนั้นคำนวณหาค่า A_{corr} ของไอโอดีนและไอโอดีน เพื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นของไอโอดีนและไอโอดีน จากสมการของกราฟมาตรฐาน

บทที่ 4

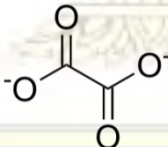
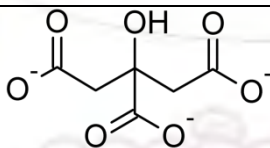
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในชาแบบซอง

4.1.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในชาแบบซอง

กรดออกซาลิก (oxalic acid, $C_2H_2O_4$) เป็นกรดอ่อนที่สามารถแตกตัวให้โปรตอนได้ 2 ตัว และมีค่า pK_a 2 ค่า คือ 1.23 และ 4.28 นั่นคือเมื่อแตกตัวสมบูรณ์จะให้ประจุ 2 ลบ และอยู่ในรูปที่เรียกว่าออกซาเลต สำหรับกรดซิตริก (citric acid, $C_6H_8O_7$) เป็นกรดอ่อนที่สามารถแตกตัวได้ 3 ครั้ง และมีค่า pK_a 3 ค่า คือ 3.13, 4.67 และ 6.40 นั่นคือเมื่อแตกตัวสมบูรณ์จะให้ประจุ 3 ลบ และอยู่ในรูปที่เรียกว่าซิเตรต สูตรโครงสร้างและค่าคงที่การแตกตัวของกรดทั้งสองชนิดแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 โครงสร้างและค่าคงที่การแตกตัวของออกซาเลตและซิเตรต

| กรด | โครงสร้าง | pK_a | | |
|-------------------|---|-----------|-----------|-----------|
| | | pK_{a1} | pK_{a2} | pK_{a3} |
| ออกซาเลต ไอออน |  | 1.23 | 4.28 | - |
| ซิเตรต ไอออน |  | 3.13 | 4.67 | 6.40 |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การแตกตัวของกรดอ่อนทั่วไปแสดงดังสมการ 4.1 ระดับขั้นการแตกตัว (degree of ionization, α) ของกรดอ่อนสามารถหาได้จากสมการที่ 4.2 หรือ 4.3 โดยจากสมการที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าระดับขั้นการแตกตัวของสารจะมีความสัมพันธ์กับค่า pH และค่า pK_a นั่นคือเมื่อ pH มีค่าเท่ากับ pK_a ดีกรีการแตกตัวของสารจะมีค่าเท่ากับ 0.5 หรือหมายความว่าสารสามารถแตกตัวได้เพียง 50% เท่านั้น หากต้องการให้สารเกิดการแตกตัวได้เกือบ 100% จะต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH มากกว่าค่า pK_a ของสารอย่างน้อย 2 หน่วย



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

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

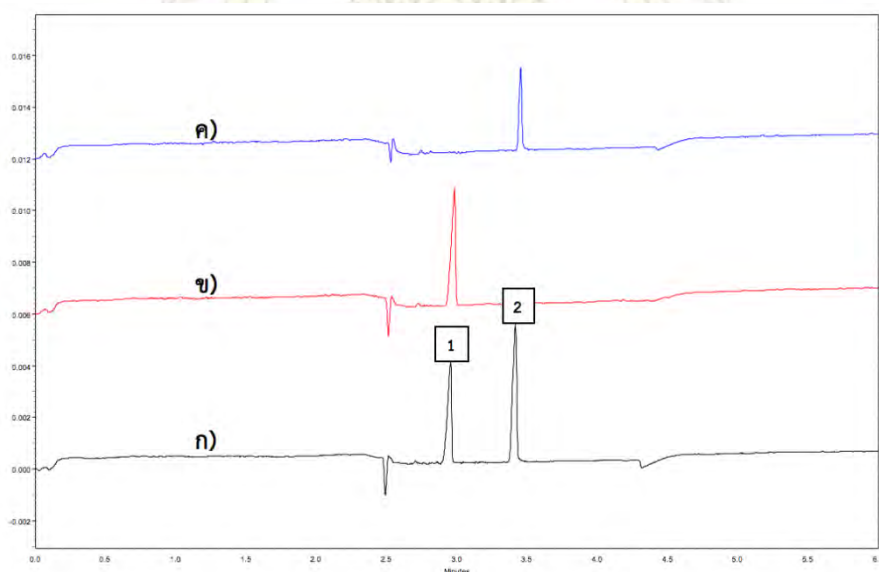
ดังนั้นเพื่อให้ให้ออกซาเลตและซิเทรตแตกตัวได้อย่างสมบูรณ์ จะต้องใช้บัฟเฟอร์ที่ pH สูง เช่น บอเรต ($pK_a \sim 9.0$) หรือฟอสเฟต ซึ่งมีค่า pK_a 3 ค่า คือ 2.12, 7.21 และ 12.32 จึงสามารถใช้เป็นบัฟเฟอร์ทั้งในช่วงภาวะกรด กลาง และเบส จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ Ojavij และ Chaisatit (23) ได้วิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตและซิเทรตในชาพร้อมดื่ม โดยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมคือ บัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7.0 ซึ่งให้ค่าการแยกที่สมบูรณ์สำหรับออกซาเลตและซิเทรตและใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเทรตที่มีอยู่ในชาแบบซองสำหรับชง โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ผสมระหว่างบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เมื่อออกซาเลตและซิเทรตแตกตัวได้สมบูรณ์จะมีประจุ 2 ลบ และ 3 ลบ ตามลำดับ และจะมีค่า μ สูง ทำให้มีแรงต้าน EOF ได้มาก ส่งผลให้สารใช้เวลาเคลื่อนที่ในกะพิลลารีนานกว่าจะถึงเครื่องตรวจวัด หรือ EOF อาจไม่สามารถพาสารออกมาถึงเครื่องตรวจวัดได้ ดังนั้นจึงใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reversed polarity) โดยให้ด้านบรรจุสารเข้าเป็นขั้วลบ (cathode) และด้านออกหรือด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก (anode) เพื่อช่วยให้สารที่มีประจุลบมาก (ค่า μ สูง) เช่น ออกซาเลตและซิเทรตสามารถเคลื่อนที่ไปยังด้านตัวตรวจวัดหรือขั้วบวกได้ แต่อาจใช้เวลาในการแยกสารนาน เนื่องจากเคลื่อนที่สวนทางกับ EOF ที่มีทิศทางการเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ ดังนั้นจึงต้องกลับทิศทางของ EOF (reversed EOF) โดยทำการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวกลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งจะช่วยให้ EOF มีทิศทางการเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกเช่นเดียวกับออกซาเลตและซิเทรต ดังนั้นออกซาเลตและซิเทรตจะเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจวัดได้เร็วขึ้นในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ เตตระเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์

(tetradecyltrimethylammonium bromide, TTAB) ความเข้มข้น 0.5 mM เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวกเพื่อกลับทิศของ EOF

ดังนั้นภาวะที่เลือกใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตที่มีอยู่ในขาแบบของสำหรับขง เป็นดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรต

| ภาวะที่ใช้ | รายละเอียด |
|-----------------------------|--|
| สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (BGE) | สารละลายผสมของบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 mM และ TTAB ความเข้มข้น 0.5 mM ที่ pH 7.0 |
| ศักย์ไฟฟ้าในการแยก | -20 kV |
| อุณหภูมิ | 25 °C |
| การบรรจุสาร | บรรจุด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที |
| ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด | 195 nm |



รูปที่ 4.1 อิเล็กโทรโกราแกรมของสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ก) ออกซาเลตความเข้มข้น 80 mg/L ผสมกับซีเทรต ความเข้มข้น 300 mg/L พีคที่ 1 คือออกซาเลต พีคที่ 2 คือ ซีเทรต ข) ออกซาเลตความเข้มข้น 100 mg/L ค) ซีเทรตความเข้มข้น 100 mg/L ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.2

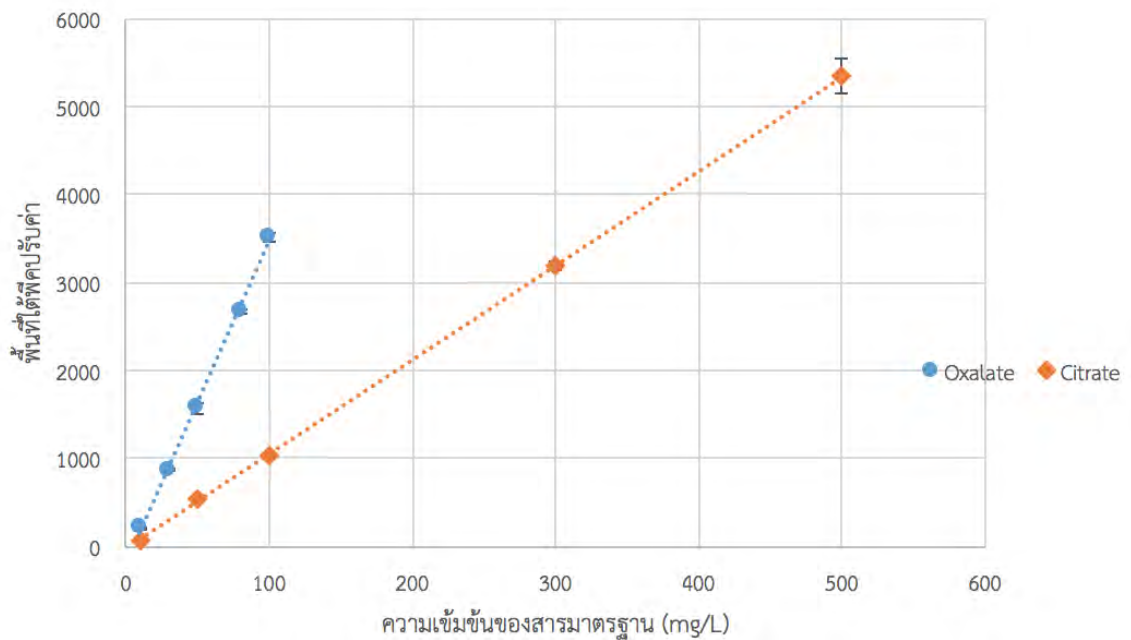
4.1.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

4.1.2.1 กราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve)

ก่อนการวิเคราะห์เชิงปริมาณของออกซาเลตและซีเทรตในแต่ละวัน จะทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรตที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของ A_{corr} และนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) และพื้นที่ใต้พีคปรับค่า (แกน y) จะได้กราฟดังรูปที่ 4.2 ซึ่งสามารถหาค่าสมการเส้นตรงได้ดังตารางที่ 4.2 โดยจากการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าพื้นที่ใต้พีคปรับค่ามีความเป็นเส้นตรงสูงซึ่งจะเห็นได้จากค่า R^2 ของออกซาเลตและซีเทรตมีค่า 0.9981 และ 0.9998 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 สมการเชิงเส้นตรงของกราฟเทียบมาตรฐานออกซาเลตและซีเทรต

| กราฟสอบเทียบ | ช่วงความเข้มข้น (mg/L) | สมการเชิงเส้นตรง | | |
|--------------|---------------------------|------------------|-------------|--------|
| | | ความชัน | จุดตัดแกน y | R^2 |
| ออกซาเลต | 10-100 | 36.572 | -208.57 | 0.9981 |
| ซีเทรต | 10 - 500 | 10.74 | -23.761 | 0.9998 |



รูปที่ 4.2 กราฟเทียบมาตรฐานของออกซาเลตและซิเตรต สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ ออกซาเลต และซิเตรตในสารตัวอย่างด้วยเทคนิค CE ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.2

4.1.2.2 ความเที่ยง (Precision)

การหาความเที่ยงของการทดลองทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานออกซาเลตและซิเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเมทริกซ์ที่เป็นน้ำ (เตรียมดังตารางที่ 3.2) จากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง เพื่อหาความเที่ยงของการทดลองภายในวันเดียวกัน (intraday precision) ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความเที่ยงของไมเกรซินโทม (t_m) และพื้นที่ใต้พีคปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐาน ออกซาเลตและซิเทรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน โดยทำการ วิเคราะห์ 10 ครั้ง (n = 10)

| สาร มาตรฐาน | ความ เข้มข้น (mg/L) | t _m / A _{corr} | % RSD (mean ± SD) | | |
|----------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| | | | วันที่ 1 | วันที่ 2 | วันที่ 3 |
| ออกซาเลต | 20 | t _m | 1.21 (3.211 ± 0.039) | 2.39 (3.414 ± 0.082) | 0.46 (3.637 ± 0.017) |
| | | A _{corr} | 8.70 (2644 ± 230) | 8.85 (3026 ± 268) | 5.17 (3155 ± 163) |
| | 60 | t _m | 2.26 (3.570 ± 0.081) | 1.36 3.495 ± 0.048 | 1.84 (3.672 ± 0.068) |
| | | A _{corr} | 21.95 (2280 ± 500) | 13.24 (3436 ± 455) | 6.56 (3945 ± 259) |
| | 85 | t _m | 5.03 (3.568 ± 0.179) | 3.27 (3.534 ± 0.116) | 3.66 (3.786 ± 0.138) |
| | | A _{corr} | 24.65 (2991 ± 737) | 14.23 (2802 ± 399) | 8.25 (3952 ± 326) |
| ซิเทรต | 20 | t _m | 1.38 (3.753 ± 0.052) | 2.85 (4.005 ± 0.114) | 0.55 (4.353 ± 0.024) |
| | | A _{corr} | 7.10 (556 ± 40) | 9.14 (575 ± 53) | 2.04 (682 ± 14) |
| | 200 | t _m | 2.86 (4.282 ± 0.122) | 1.35 (4.166 ± 0.056) | 0.64 (4.387 ± 0.028) |
| | | A _{corr} | 24.43 (1602 ± 391) | 8.84 (580 ± 51) | 3.16 (2684 ± 85) |
| | 400 | t _m | 6.25 (4.285 ± 0.268) | 0.61 (4.139 ± 0.025) | 4.29 (4.609 ± 0.198) |
| | | A _{corr} | 24.87 (3441 ± 856) | 6.25 (3963 ± 248) | 9.77 (4469 ± 437) |

จากตารางที่ 4.4 พบว่า %RSD ของไมเกรซินโทมของสารมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรต มีค่าในช่วง 0.46 – 6.25% แสดงถึงความเที่ยงของไมเกรซินโทมภายในวันเดียวกันที่มีค่าสูง ส่วน A_{corr} มี %RSD ในช่วง 2.04 – 24.87% ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง แสดงถึงความเที่ยงของ A_{corr} ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อทำการวิเคราะห์ในจำนวนครั้งที่มากขึ้น ในกะปิลลารีคอลัมน์อาจมีการชะสารที่ไม่หมด หรืออาจเกิดการอุดตันในบางส่วนของคอลัมน์ ทำให้พื้นที่ใต้พีคมีค่าแตกต่างกันในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ดังนั้นในการวิเคราะห์แต่ละครั้งอาจจะต้องมีการชะคอลัมน์ให้นานขึ้นเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกันมากขึ้น

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดลองหาความเที่ยงของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (interday precision) โดยทำการวิเคราะห์ติดกัน 3 วัน พบว่า %RSD ของไมเกรซินโทมของสารมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรตมีค่าอยู่ในช่วง 2.73 – 6.43% แสดงว่าไมเกรซินโทมของออกซาเลตซิเทรตระหว่างวันมีความเที่ยงค่อนข้างสูง ส่วนค่า A_{corr} มี %RSD ในช่วง 10.51 – 55.65% ซึ่งถือว่าเป็นค่าค่อนข้างสูง แสดงว่าค่าพื้นที่ใต้พีคปรับค่าของสารมาตรฐานออกซาเลตและซิเทรตที่ได้จากการวิเคราะห์ระหว่างวันนั้นมีความเที่ยงในการทดลองที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการชะคอลัมน์ระหว่างการวิเคราะห์ไม่ดีพอ ทำให้มีสารตกค้างในกะปิลลารีระหว่างการวิเคราะห์ จึงส่งผลให้ค่าพื้นที่ใต้พีคมีค่าแตกต่างกัน

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ความเที่ยงของไมเกรซินโทม (t_m) และพื้นที่ใต้พีคปรับค่า (A_{corr}) ของสารมาตรฐาน ออกซาเลตและซิเทรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการวิเคราะห์ต่างวันเป็นเวลา 3 วัน (n = 3)

| สารมาตรฐาน | ความเข้มข้น | % RSD ของ t _m (mean ± SD) | % RSD ของ A _{corr} (mean ± SD) |
|------------|-------------|---|--|
| ออกซาเลต | 20 | 5.39 (3.42 ± 0.18) | 10.51 (2942 ± 309) |
| | 60 | 2.73 (3.58 ± 0.10) | 25.31 (3220 ± 815) |
| | 85 | 5.00 (3.63 ± 0.18) | 22.05 (3249 ± 716) |
| ซิเทรต | 20 | 6.43 (4.04 ± 0.26) | 10.99 (606 ± 67) |
| | 200 | 2.80 (4.28 ± 0.12) | 55.65 (1622 ± 903) |
| | 400 | 6.21 (4.33 ± 0.27) | 17.61 (3980 ± 701) |

4.1.2.3 ความแม่นยำ (Accuracy)

การหาความแม่นยำของการทดลองสามารถหาได้จากการทดลองตอนที่ 3.5.4 โดยทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานออกซาเลตที่ความเข้มข้น 20, 60 และ 80 mg/L และสารมาตรฐานซิเทรตความเข้มข้น 20, 200 และ 400 mg/L ที่ผสมลงในชาตัวอย่างแบบซองที่ซิงแล้วด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการแช่ 3 นาที ด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้งและนำค่า A_{corr} ที่ได้ มาคำนวณหาร้อยละการได้กลับคืน (%recovery) โดยใช้สมการที่ 3.3 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 โดยผลการคำนวณพบว่า เมื่อเติมสารละลายออกซาเลตความเข้มข้น 60 mg/L ลงไปในสารละลายตัวอย่างได้ค่า %recovery เท่ากับ 92.71% ซึ่งอยู่ในค่าที่ยอมรับได้ในช่วงการวิเคราะห์ความเข้มข้น 10 – 100 mg/L ที่ต้องมีค่า %recovery ในช่วง 80-115 % (24) ส่วน %recovery ที่มีค่าต่ำและมีค่าสูงเกิน 100 นั้น อาจเนื่องมาจากภาวะในการแยกนั้นไม่เหมาะสมเท่าที่ควรสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในตัวอย่างชา ซึ่งสารอื่นที่อยู่ในชาอาจจะรบกวนการวิเคราะห์ โดยพบว่าเบสไลน์ที่ได้ไม่เรียบ มีการยกขึ้นของเบสไลน์และพีคที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นมีลักษณะเป็น tailing peak ที่มี

เบสไลน์ไม่เรียบ ทำให้การหาค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากอิเล็กทรอนิกส์โปรแกรมมีความผิดพลาดไปจากที่ควรจะเป็น ส่งผลให้เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณ ค่าที่ได้จากการคำนวณมีความผิดพลาดไปจากความจริง ส่งผลให้ %recovery มีค่าต่ำและสูงเกินกว่าที่ควรจะเป็น นอกจากนี้ปัญหาจากการตกค้างของสารภายในคะปิลลารีระหว่างการวิเคราะห์เนื่องจากการชะคะปิลลารีไม่ดีพออาจส่งผลต่อ %recovery ด้วยเช่นกัน ดังนั้นหลังการวิเคราะห์ในแต่ละวันนอกจากจะต้องทำการล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 15 นาทีและน้ำ Milli Q 15 นาทีแล้ว ควรทำการคอนดิชันคอลัมน์ด้วยสารละลายเมทานอล, สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 M, สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 M และน้ำ Milli Q อย่างละ 20 นาทีเพื่อเป็นการกำจัดสารที่ติดค้างอยู่ที่ผิวคะปิลลารีคอลัมน์และเป็นการปรับปรุงผิวของคะปิลลารีคอลัมน์ให้พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ในวันถัดไป นอกจากนี้ในงานวิจัยต่อ ๆ ไปอาจจะต้องมีการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์โดยอาจจะเพิ่มขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อกำจัดเมทริกซ์ที่มีอยู่ในน้ำซาวออกไปบางส่วน เพื่อลดการดูดซับบนผิวของคะปิลลารีคอลัมน์

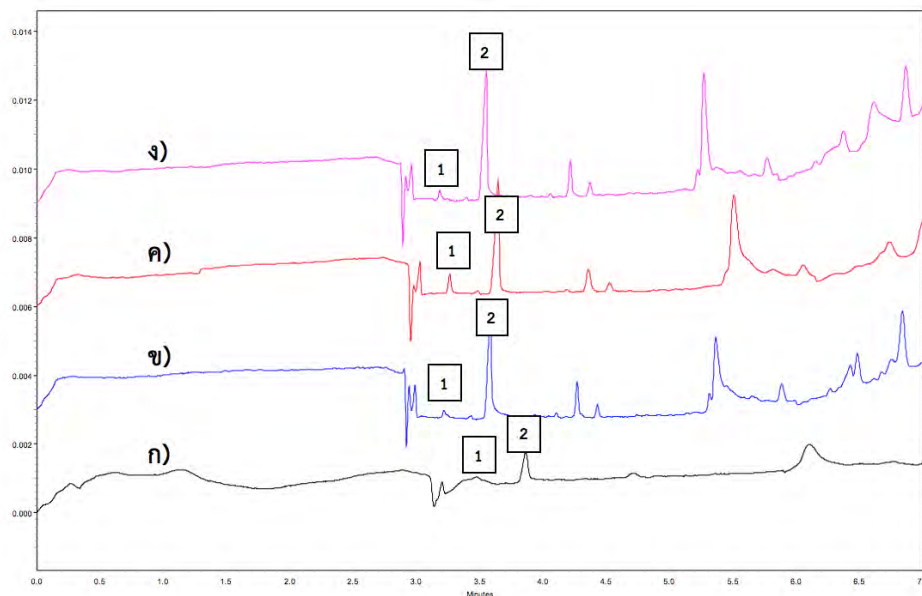
ตารางที่ 4.6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่เติมลงในซาแบบของตัวอย่าง (วิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง)

| สารตัวอย่าง | ความเข้มข้นที่เติม (mg/L) | %Recovery (\pm SD) |
|-------------|---------------------------|-----------------------|
| ออกซาเลต | 20 | 169 \pm 71 |
| | 60 | 92 \pm 40 |
| | 80 | 25 \pm 25 |
| ซีเทรต | 20 | 146 \pm 46 |
| | 200 | 14 \pm 4 |
| | 400 | 165 \pm 12 |

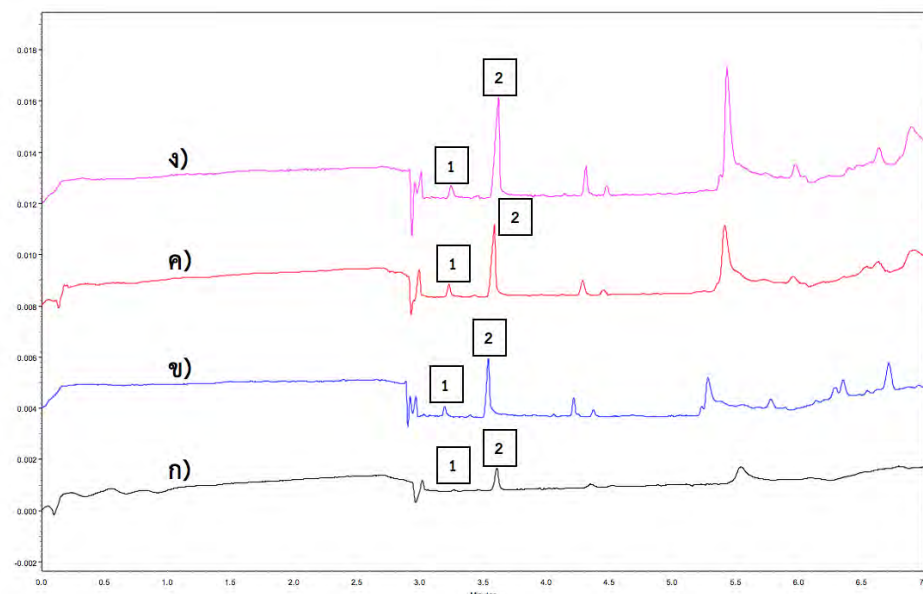
4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตในสารตัวอย่างซาแบบของสำหรับขง

ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ในการชงซาและระยะเวลาในการแช่ถุงซาต่อปริมาณของออกซาเลตและซีเทรตที่ได้ละลายออกมาในน้ำซา ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ซาตัวอย่างแบบของลิปตัน ที่ชงด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาในการแช่ต่างกันที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.6.1 ด้วยเทคนิค CE ตัวอย่างอิเล็กทรอนิกส์โปรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารตัวอย่างซาที่ชงโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิและเวลาในการแช่ถุงซาต่าง ๆ แสดงในรูป 4.3 และ 4.4

จากนั้นหาค่า A_{corr} ของออกซาเลตและซีเทรตจากอิเล็กโทรโพรแกรมที่ได้ และนำค่า A_{corr} ไปแทนในสมการของกราฟเทียบมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของออกซาเลตและซีเทรต ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.7 โดยสามารถยืนยันพีคของออกซาเลตและซีเทรตได้จากค่าไมเกรชันใหม่และการเติมสารมาตรฐานลงไปในสารละลายตัวอย่าง (spiked technique)



รูปที่ 4.3 อิเล็กโทรโพรแกรมที่ได้การวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตที่มีอยู่ในชาแบบซอง ยี่ห้อลิปตันที่ชงด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 75 °C และใช้เวลาในการแช่ถุงชาในน้ำเป็นเวลา ก) 1 นาที ข) 3 นาที ค) 5 นาที และ ง) 10 นาที พีค 1 คือ ออกซาเลต และพีค 2 คือ ซีเทรต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของเครื่อง CE แสดงดังตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.4 อิเล็กโทรโฟโกราฟีโครมาโตแกรมที่ได้รับการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตที่มีอยู่ในชาแบบซองยี่ห้อลิปตันที่ชงด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 °C และใช้เวลาในการแช่ถุงชาในน้ำเป็นเวลา ก) 1 นาที ข) 3 นาที ค) 5 นาที และ ง) 10 นาที พีค 1 คือ ออกซาเลต และพีค 2 คือ ซีเทรต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของเครื่อง CE แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.7 ปริมาณออกซาเลตและซีเทรตที่ได้จากการแช่ถุงชาที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค CE

| เวลาในการแช่ (นาที) | อุณหภูมิของน้ำที่ใช้ชง (°C) | ความเข้มข้นที่วัดได้ (mg/L) (\pm SD) | |
|------------------------|--------------------------------|---|---------------|
| | | ออกซาเลต | ซีเทรต |
| 1 | 75 | 5.83 \pm 1.25 | 200 \pm 158 |
| | 95 | 4.67 \pm 0.69 | 100 \pm 44 |
| 3 | 75 | 8.31 \pm 1.71 | 338 \pm 23 |
| | 95 | 12.34 \pm 1.42 | 211 \pm 23 |
| 5 | 75 | 13.96 \pm 6.96 | 384 \pm 45 |
| | 95 | 14.81 \pm 3.14 | 363 \pm 97 |
| 10 | 75 | 10.04 \pm 3.08 | 436 \pm 32 |
| | 95 | 15.37 \pm 8.07 | 392 \pm 73 |

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณออกซาลेटและซิเตรตในชาแบบซองยี่ห้อ Lipton ด้วยเทคนิค CE ดังตารางที่ 4.7 พบว่ามีปริมาณออกซาลेटอยู่ในช่วง 5.8 – 15.4 mg/L และปริมาณซิเตรตอยู่ในช่วง 99.8 – 436.4 mg/L โดยพบว่าเมื่อใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นในการแช่ถุงชา ปริมาณออกซาลेटที่ละลายออกมาในน้ำชามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนซิเตรตพบว่ามีปริมาณลดลงเมื่อใช้น้ำอุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งคาดว่าอาจเป็นผลเนื่องมาจากการสลายตัวของกรดซิทรिकที่อุณหภูมิสูง (25) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากรดซิทรिकมีความสามารถในการละลายในน้ำเย็นได้ดีกว่าในน้ำร้อน (26) ดังนั้นอุณหภูมิของน้ำร้อนที่ใช้ชงชาไม่มีผลต่อปริมาณของออกซาลेटอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะมีผลทำให้ปริมาณของซิเตรตลดลง ส่วนเวลาที่ใช้ในการแช่ถุงชา พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการแช่ถุงชาในน้ำร้อน ปริมาณออกซาลेटและซิเตรตจะละลายออกมามากขึ้น ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นควรแช่ถุงชาในน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่สูงมาก เพื่อให้มีปริมาณซิเตรตในน้ำชามากขึ้น ซึ่งจะเป็นผลดีเนื่องจากซิเตรตเป็นสารที่ช่วยยับยั้งการเกิดนิ่วได้ ส่วนเวลาที่ใช้ในการแช่ถุงชา ถ้าใช้เวลาในการแช่นานจะทำให้ปริมาณออกซาลेटและซิเตรตในน้ำชาจะมีมากขึ้น ซึ่งปริมาณออกซาลेटที่มากขึ้นอาจไปเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคนิ่วได้ และนอกจากนี้การแช่ถุงชาเป็นเวลานานอาจส่งผลกระทบต่อรสชาติของน้ำชา ดังนั้นการแช่ถุงชาในน้ำร้อนประมาณ 3-5 นาที น่าจะเป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชงชาแบบถุงชา

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอดัดและไอโอดेटในซอสปรุงรสเสริมไอโอดีน

ไอโอดัด (Iodide, I^-) เป็นไอออนลบชนิดอะตอมเดี่ยว มักอยู่ในรูปเกลือโพแทสเซียมไอโอดัดไอโอดेट (Iodate, IO_3^-) เป็นไอออนลบที่ประกอบด้วยอะตอมไอโอดีนและอะตอมออกซิเจน มักอยู่ในรูปเกลือโพแทสเซียมไอโอดेट โดยเมื่ออยู่ในภาวะที่สารละลายมีสภาพเป็นกรด ไอโอดัดกับไอโอดेटสามารถรวมตัวกันและเกิดเป็นไอโอดีนได้ (27) ดังสมการ



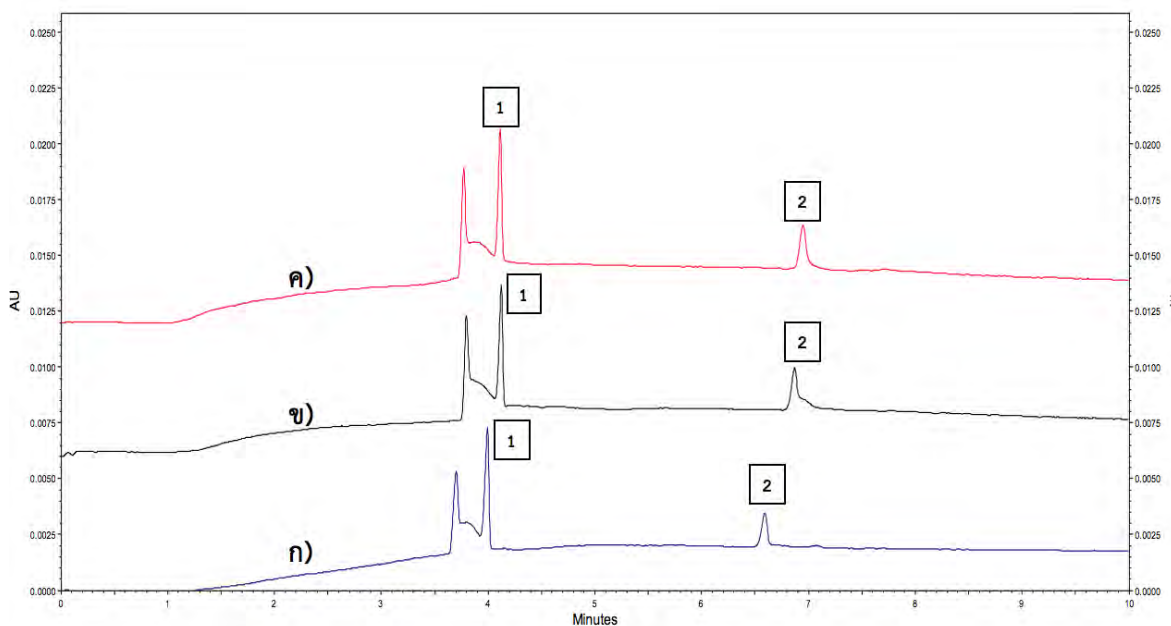
เกลือไอโอดัดและไอโอดेटในรูปโพแทสเซียมไอโอดัดหรือโพแทสเซียมไอโอดेटมักนิยมใช้ในการเติมลงในผลิตภัณฑ์ซอสและเกลือสำหรับปรุงอาหารเพื่อเป็นการเสริมไอโอดีนในผลิตภัณฑ์ ซึ่งการเสริมเสริมไอโอดีนในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นเป็นมาตรการหนึ่งของการลดภาวะการขาดไอโอดีน โดยกระทรวงสาธารณสุขได้ประกาศให้ในผลิตภัณฑ์ปรุงรสเสริมไอโอดีนนั้นจะต้องมีปริมาณไอโอดีนในช่วง 2 – 3 mg/L (28)

เนื่องจากไอโอดีและไอโอเดตนั้นมีความสามารถในการดูดกลืนแสงยูวีที่ค่อนข้างต่ำ และในข้อสปูรรมมีปริมาณของไอออนทั้งสองชนิดนี้น้อย จึงทำให้การตรวจวัดให้มีความถูกต้อง นั้นทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย ภายในกะพิลลารีมาช่วยให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องมากขึ้น โดยได้เลือกใช้เทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นแบบการบรรจุสารปริมาณมากด้วยความดันแล้วใช้ EOF เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออก ตามที่กล่าวไปในหัวข้อ 2.5.8 ซึ่งวิธีนี้จะต้องใช้ภาวะที่ pH ต่ำ เพื่อลดความแรงของ EOF ดังนั้น จึงเลือกใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็นสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 40 mM และปรับให้เป็น pH 2.68 ด้วยกรดฟอสฟอริก ตามงานวิจัยก่อนหน้า (18)

4.2.1 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกไอโอดีและไอโอเดตด้วยเทคนิค CE

4.2.1.1 ผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อการวิเคราะห์ไอโอดีและไอโอเดต

ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีต่อการแยกไอโอดีและไอโอเดต โดยความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เท่ากับ 40, 60 และ 80mM เพื่อหาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่สามารถแยกไอโอดีและไอโอเดตได้อย่างสมบูรณ์ และมีเบสไลน์ของการวิเคราะห์ที่เรียบ



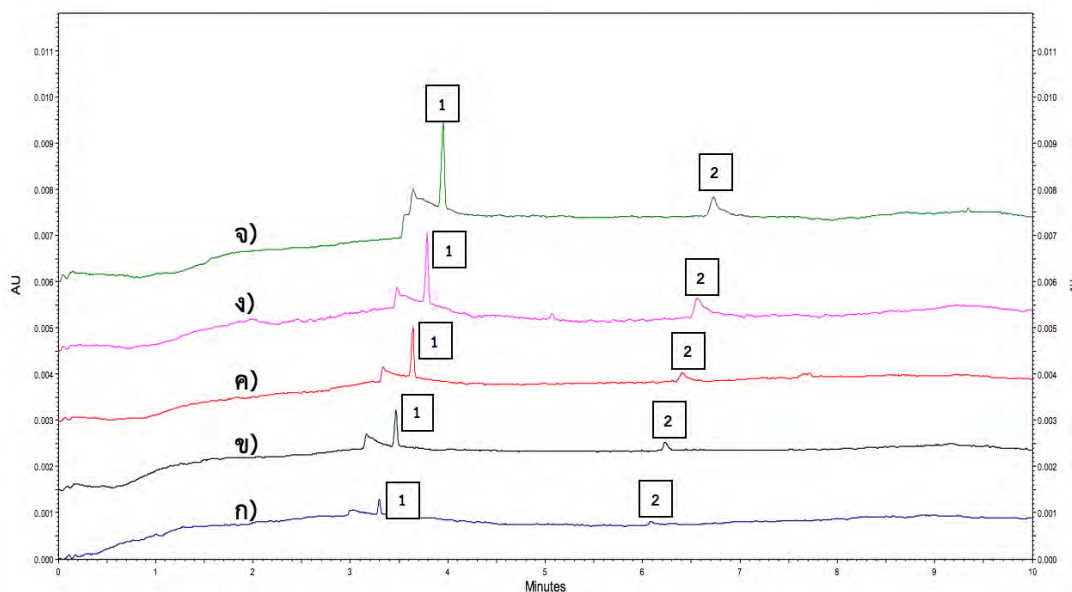
รูปที่ 4.5 อิเล็กโทรโฟโแกรมแสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.68 ต่อการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างไอโอไดด์และไอโอเดตที่มีความเข้มข้น 2 mg/L โดยความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เท่ากับ ก) 40 mM ข) 60 mM และ ค) 80 mM พีคที่ 1 คือ ไอโอไดด์ และพีคที่ 2 คือไอโอเดต ภาวะของ CE ที่ใช้คือ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 74.3 μm ยาว 60.2 cm (50 cm ถึงตัวตรวจวัด) ศักย์ไฟฟ้า -24 kV บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 99 s และตรวจวัดด้วยยูวี-วิซิเบิลที่มีความยาวคลื่น 200nm

โดยจากอิเล็กโทรโฟแกรมที่ได้ในรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าไมเกรชันไทม์ของไอโอไดด์มีค่าน้อยกว่าไอโอเดตเนื่องจากทั้งไอโอไดด์และไอโอเดตมีประจุ -1 แต่ไอโอเดตมีขนาดที่ใหญ่กว่าไอโอไดด์ จึงทำให้ไอโอเดตเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าไอโอไดด์ นอกจากนี้พบว่าพีคไอโอไดด์มีลักษณะกว้างและแยกไม่สมบูรณ์จากพีคขนาดเล็กที่อยู่ด้านหน้า ซึ่งพีคขนาดเล็กที่อยู่ติดกับไอโอไดด์คาดว่าน่าจะเป็นพีคของไตรไอโอไดด์ (I_3^-) ซึ่งอาจจะเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไอโอไดด์และไอโอดีน (29) เนื่องจากการทดลองใช้ภาวะที่เป็นกรด ซึ่งอาจจะทำให้เกิดไอโอดีนขึ้นได้เนื่องจากในระบบมีไอโอเดต (ตามสมการ 4.1) และไอโอดีนที่เกิดขึ้นอาจทำปฏิกิริยากับไอโอไดด์เกิดเป็นไตรไอโอไดด์ขึ้นได้ และเมื่อเปรียบเทียบการแยกของพีคไอโอไดด์และไอโอเดตที่ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่าง ๆ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ส่งผลเล็กน้อยต่อลักษณะและการแยกของพีคของไอโอไดด์และไอโอเดต แต่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น สารมีค่าไมเกรชันใหม่ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากผลของความแรงไอออนิกในสารละลายมีมากขึ้น ทำให้สารมีค่ารีซีมิไฮโดรไดนามิกมากขึ้น สารจึงมีค่า μ ที่ต่ำลง ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ความเข้มข้น 40 mM เพื่อลดระยะเวลาในการวิเคราะห์และไม่ให้เกิดกระแสไฟฟ้าในขณะที่ทำการวิเคราะห์สูงเกินไป

4.2.1.2 ผลของเวลาที่ใช้ในการบรรจุสารตัวอย่างต่อการวิเคราะห์ไอโอไดด์และไอโอเดต

เนื่องจากไอโอไดด์และไอโอเดตมีความสามารถในการดูดกลืนแสงยูวีที่ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงได้ใช้วิธีการเพิ่มความเข้มข้นสารตัวอย่างภายในเซลล์ลาไรโดยการบรรจุสารเข้าไปในปริมาณมากและกำจัดเมทริกซ์ออกภายหลังโดยอาศัย EOF ที่มีทิศทางการเคลื่อนที่ไปยังด้านเข้าที่เป็นขั้วลบ ซึ่งจะเคลื่อนที่สวนทางกับไอโอไดด์และไอโอเดต ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการบรรจุสารเข้าสู่เซลล์คอลัมน์ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารให้ได้มากที่สุดก่อนเริ่มการแยก โดยทำบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi และเพิ่มเวลาในการบรรจุสารเป็น 20, 40, 60, 80 และ 99 วินาที ซึ่งจะเห็นได้จากรูปที่ 4.6 เมื่อเพิ่มเวลาในการบรรจุสารให้นานขึ้น พีคของสารจะสูงขึ้นเนื่องจากสารสามารถเข้าสู่คอลัมน์ได้มากขึ้น นอกจากนี้พีคของสารมีลักษณะที่แคบแม้จะบรรจุสารเข้าไปในคอลัมน์เป็นระยะเวลานาน ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจาก EOF ที่พาเอาเมทริกซ์ออกไปจากโซนสาร ทำให้โซนสารแคบลงและมีความเข้มข้นมากขึ้น นอกจากนี้พบว่าค่าไมเกรชันใหม่ของสารจะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้บรรจุสาร ทั้งนี้เนื่องจากถ้าโซนสารมีความกว้างมากขึ้น EOF จะใช้เวลานานขึ้นในการกำจัดเมทริกซ์ออกจากโซนสาร จึงเป็นผลให้สารเกิดการเคลื่อนที่ต้านกับ EOF เป็นระยะเวลานานกว่าในกรณีที่บรรจุสารโดยใช้เวลาน้อย ดังนั้นในการทดลองนี้จะใช้เวลาในการบรรจุสารที่ 99 วินาทีในการวิเคราะห์ปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตเนื่องจากให้ความสูงพีคสูงที่สุดและเป็นเวลานานที่สุดที่เครื่องสามารถทำได้



รูปที่ 4.6 อิเล็กโทรโฟโรรแกรมแสดงผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการบรรจุสารตัวอย่างเข้าสู่คัพฟิลลารีคอลัมน์ โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างไอโอไดด์และไอโอเดตที่ความเข้มข้น 1 mg/L โดยใช้เวลาในการบรรจุสาร ก) 20 วินาที ข) 40 วินาที ค) 60 วินาที ง) 80 วินาที และ จ) 99 วินาที พีคที่ 1 คือ ไอโอไดด์ และพีคที่ 2 คือไอโอเดต สำหรับภาวะอื่น ๆ ของเครื่อง CE แสดงดังรูป 4.5

4.2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

จากผลการทดลองตอนที่ 4.2.1 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการแยกไอโอไดด์และไอโอเดต ได้แก่ สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 40 mM pH 2.68 ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เท่ากับ -24 kV และใช้เวลาบรรจุสารนาน 99 วินาที จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่เลือก โดยหาค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.2.2.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานไอโอไดด์และไอโอเดต และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น และวัดค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) จนกระทั่งได้ใกล้เคียง 3 สำหรับ LOD จากการทดลองเมื่อใช้เวลาในการบรรจุสารนาน 99 วินาทีพบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณของไอโอไดด์ได้ต่ำถึง 0.1 $\mu\text{g/L}$ และสามารถวิเคราะห์ปริมาณของไอโอเดตได้ต่ำในระดับ 0.5 mg/L ซึ่งปริมาณของไอโอไดด์หรือไอโอเดตในซอสปรุงรสเสริมไอโอดีนตัวอย่างจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2 – 3 mg/L

จึงคาดว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนหรือไอโอเดตในตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง

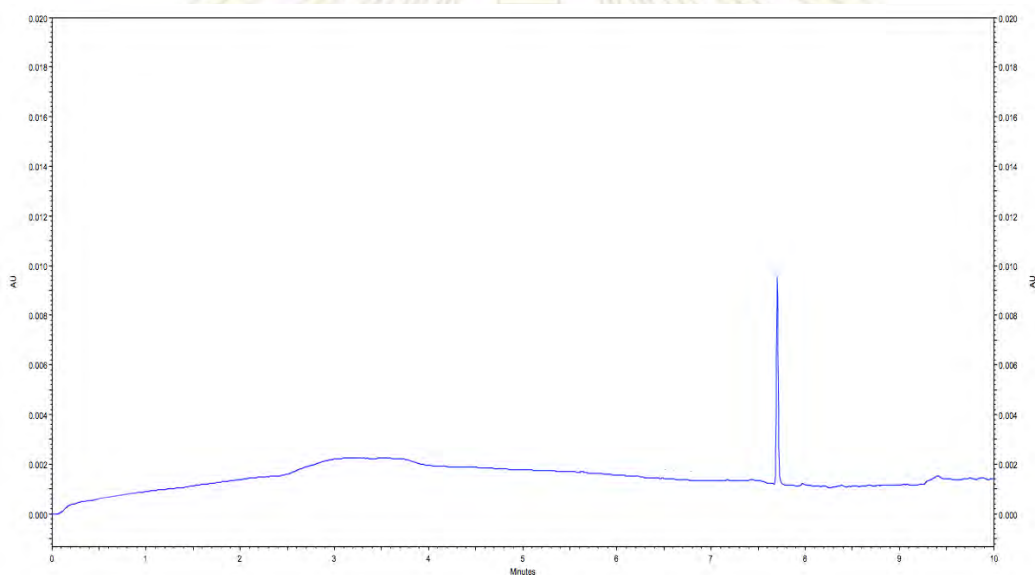
4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนและไอโอเดตในสารตัวอย่างซอสปรุงรสชนิดเสริมไอโอดีน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนและไอโอเดตในซอสปรุงรสชนิดเสริมเกลือไอโอดีน เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ประกอบอาหารที่มีการเสริมไอโอดีนนั้น จะมีการเติมเกลือที่อยู่ในรูปของไอโอดีนหรือไอโอเดต ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกซอสปรุงรสตัวอย่างคือ ซอสปรุงรสเห็ดหอมตราเด็กสมบูรณ์ชนิดเสริมไอโอดีน

จากรูปที่ 4.7 แสดงอิเล็กโทรกราฟที่ไดจากการวิเคราะห์ซอสปรุงรสเห็ดหอมตราเด็กสมบูรณ์ ชนิดเสริมเกลือไอโอดีน พบว่ามีพีคที่มีความสูงมากปรากฏที่เวลาประมาณ 7.7 นาที ซึ่งไม่ตรงกับค่าไมเกรชันใหม่ของไอโอดีนและไอโอเดต และเมื่อทำการยืนยันพีคที่ได้จากสารตัวอย่างด้วยการเติมสารมาตรฐานไอโอดีนและไอโอเดต (รูปที่ 4.8ข) พบว่าพีคที่ปรากฏในการวิเคราะห์สารตัวอย่างนั้นไม่ใช่พีคของไอโอดีนหรือไอโอเดต เนื่องจากมีพีคของไอโอเดตเพิ่มขึ้นมา เนื่องจากพีคที่ปรากฏในสารตัวอย่างซอสปรุงรสใหม่ที่มีเร็วกว่าไอโอเดต ซึ่งน่าจะเป็นพีคของไอออนลบที่อยู่ในสารตัวอย่าง และเป็นไอออนลบที่มีปริมาณมากเนื่องจากพีคมีความสูงมาก เนื่องจากสารตัวอย่างซอสปรุงรสมี NaCl เป็นองค์ประกอบหลัก

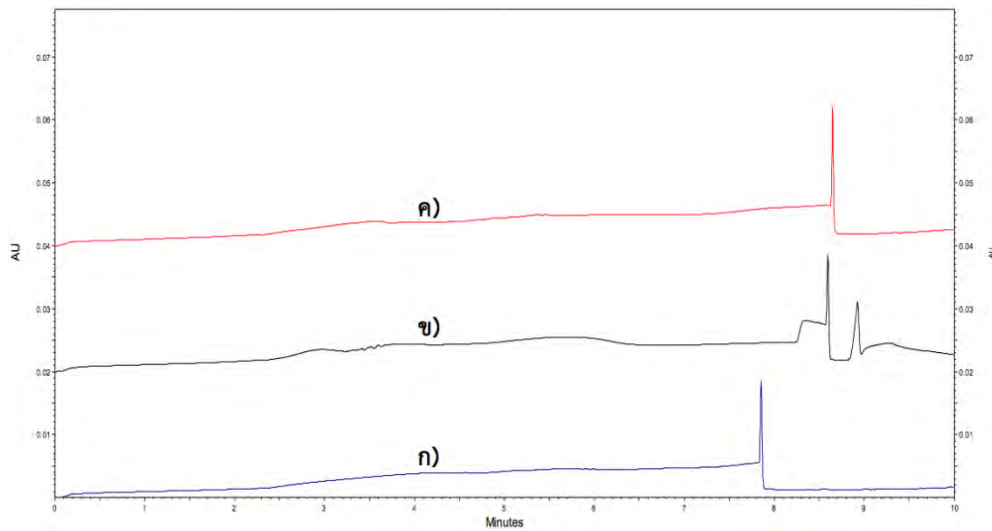
ดังนั้นจึงได้ลองเติมสารละลายมาตรฐานคลอไรด์ลงในสารตัวอย่าง พบว่าพีคที่ปรากฏนั้นมีความสูงเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.8ค) แสดงว่าพีคที่ได้จากการวิเคราะห์ซอสปรุงรสเป็นพีคของคลอไรด์ส่วนค่าไมเกรชันใหม่ที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากเมื่อเติมสารละลายมาตรฐานลงไป สัดส่วนของเมทริกซ์ในตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงไป และพีคของคลอไรด์ที่ได้นั้นมีความสูงมากนั้นเป็นเพราะในสารละลายตัวอย่างมีเกลือของคลอไรด์เป็นองค์ประกอบหลักและมีอยู่เป็นจำนวนมากจึงทำให้ส่งผลกระทบต่อวิเคราะห์ เนื่องจากเกลือไอโอดีนหรือไอโอเดตที่เติมลงไป ในสารละลายมีปริมาณน้อยกว่าเกลือคลอไรด์มาก ดังนั้นพีคของคลอไรด์จึงอาจบดบัง ทำให้ไม่สามารถเห็นพีคของไอโอดีนและไอโอเดตที่มีปริมาณน้อยได้ การกำจัดคลอไรด์ออกจากสารตัวอย่างนั้นทำได้ยากและมีวิธีการที่ยุ่งยาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่สามารถทำการหาปริมาณไอโอดีนและไอโอเดตในซอสปรุงรสตัวอย่างได้ อย่างไรก็ตามได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เสนอวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนและไอโอเดตในตัวอย่างที่มีปริมาณคลอไรด์อยู่ในปริมาณมากมาก โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เพื่อให้อัตราส่วนความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์และในสารตัวอย่างเหมาะสมกัน ซึ่งเมื่อทำการบรรจุ

สารตัวอย่างเข้าสู่คะพิลลารีคอลัมน์ จะเกิด electrostacking จากการที่สารตัวอย่างมีความแรงไอออนิกต่ำกว่าสารละลายอิเล็กโทรไลต์ทำให้ความกว้างของโซนสารตัวอย่างแคบลง ส่งผลต่อการแยกที่ดีขึ้นและขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำลง (30) หรือใช้เทคนิคการกำจัดคลอไรด์ออกจากคะพิลลารีคอลัมน์โดยการใช้ศักย์ไฟฟ้า ซึ่งเรียกวินี้ว่าพรีอิเล็กโทรฟอริซิสแบบย้อนกลับ (reversed pre-electrophoresis, RPE) (13) โดยวิธีนี้หลังจากบรรจุสารด้วยความดันจะทำการให้ศักย์ไฟฟ้าโดยให้ด้านเข้าเป็นขั้วบวก เนื่องจากคลอไรด์มีค่า μ ที่สูงกว่าแอนไอออนตัวอื่น ๆ ทำให้คลอไรด์เคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าแอนไอออนตัวอื่น ซึ่งวิธีการนี้จะสามารถกำจัดคลอไรด์ออกไปจากสารตัวอย่างได้



รูปที่ 4.7 แสดงอิเล็กโทรโฟโแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ซอสปรุงรสเห็ดหอมตราเด็กสมบูรณ์ ชนิดเสริมเกลือไอโอดีน ที่มีการเจือจาง 2 เท่า โดยใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเข้าคะพิลลารีคอลัมน์ 5 วินาที และภาวะอื่น ๆ ของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.5

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 แสดงอิเล็กโทรโฟแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ซอสปรุงรสเห็ดหอมตราเด็กสมบูรณ์ ชนิดเสริมเกลือไอโอดีน ที่มีการเจือจาง 2 เท่า ใช้เวลาในการบรรจุสารตัวอย่างเข้ากะฟิลลารี คอลัมน์ 5 วินาที โดย ก) สารละลายตัวอย่าง ข) สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานไอโอดีน ความเข้มข้น 500 mg/L ค) สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานคลอไรด์ ความเข้มข้น 500 mg/L และภาวะอื่น ๆ ของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.5

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในชาแบบซองด้วยเทคนิค CE โดยได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำร้อนที่ใช้ในการชงชาแบบซองและผลของระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ชงชาต่อปริมาณของออกซาเลตและซิเตรตในน้ำชาที่ได้จากการชง สำหรับภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตเป็นดังนี้คือ สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตและฟอสเฟต ความเข้มข้น 30 และ 40 mM ตามลำดับ และ TTAB ความเข้มข้น 0.5 mM ที่ pH 7.0 ใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกที่ -20 kV และใช้ uncoated fused silica capillary ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 74.3 μm มีความยาว 60.2 cm (ความยาวถึงตัวตรวจวัด 50 cm) บรรจุสารโดยใช้ความดันเท่ากับ 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาทีและตรวจวัดด้วยยูวี-วิซิเบิลที่มีความยาวคลื่น 195 nm จากผลการวิเคราะห์พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 7 นาที และพบว่าอุณหภูมิของน้ำร้อนที่ใช้ชงชานั้นมีผลต่อปริมาณของออกซาเลตและซิเตรต นั่นคือเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น ปริมาณออกซาเลตที่ละลายออกมาในน้ำชาจะมีปริมาณมากขึ้น แต่ปริมาณของซิเตรตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากซิเตรตจะสามารถละลายในน้ำที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง ส่วนเวลาที่แช่ชงชามีผลต่อปริมาณของออกซาเลตและซิเตรตเช่นกัน ซึ่งพบว่าเมื่อแช่ชงชาในน้ำร้อนเป็นเวลานานขึ้น ปริมาณออกซาเลตและซิเตรตในน้ำชาจะเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นในการชงชาโดยในการวิเคราะห์ครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างชาของยี่ห้อ Lipton ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณของออกซาเลตได้ในช่วง 5.8 – 15.4 mg/L และซิเตรตในช่วง 99.9 – 436 mg/L

จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลตและซิเตรต โดยกราฟสอบเทียบมาตรฐานของออกซาเลต (ความเข้มข้นในช่วง 10 - 100mg/L) และซิเตรต (ความเข้มข้นในช่วง 10 – 500 mg/L) มีค่า R^2 เท่ากับ 0.99813 และ 0.9998 ตามลำดับ จากนั้นทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกันทั้งหมด 10 ครั้ง และทำการวิเคราะห์ระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน (ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้งในแต่ละวัน) ผลการทดสอบพบว่าค่าไม่แปรผันใหม่ของออกซาเลตและซิเตรตมีความเที่ยงของการทดลองวันเดียวกันค่อนข้างสูง มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.46 – 6.25% ส่วนพื้นที่ใต้พีคปรับค่านั้นมี %RSD อยู่ในช่วง 2.04 – 24.87% ถือว่ามีความเที่ยงของการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างต่ำสำหรับพื้นที่ใต้พีค ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำด้วยจำนวนครั้งที่มากขึ้นผนังคอลัมน์อาจจะถูกเคลือบด้วยสารหรือเมทริกซ์ในสารละลายตัวอย่างทำให้ค่าไม่แปรผันใหม่และ

พื้นที่ใต้พีคปรับค่าที่ได้ในครั้งท้าย ๆ ของการวิเคราะห์มีค่าเคลื่อนไปจากครั้งแรก ๆ ส่งผลให้ความเที่ยงในการทดลองต่ำลง ซึ่งอาจแก้ไขโดยควรที่จะเพิ่มเวลาในการชะลอคอล์มน์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และสารละลายอิเล็กโทรไลต์ก่อนทำการวิเคราะห์ในครั้งถัดไป ส่วนความเที่ยงระหว่างวันนั้นพบว่าค่า %RSD ของไมเกรซินโทมของออกซาเลตและซิเทรตนั้นอยู่ในช่วง 2.73 – 6.43% และค่า %RSD ของพื้นที่ใต้พีคปรับค่าอยู่ในช่วง 10.51 – 55.65% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทดลองระหว่างวันนั้นมีความเที่ยงของค่าไมเกรซินโทมที่สูงแต่ความเที่ยงของพื้นที่ใต้พีคที่ต่ำ ซึ่งอาจมีสาเหตุเดียวกับการตรวจสอบความเที่ยงภายในวันเดียวกัน

โดยภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คือ สารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็นสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 40 mM pH 2.68 ใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยกที่ -24 kV และใช้ uncoated fused silica capillary ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 74.3 μm ความยาว 60.2 cm (ความยาวถึงตัวตรวจวัด 50 cm) ความดันที่ใช้ในการบรรจุสารเท่ากับ 0.5 psi ใช้เวลาในการบรรจุสารละลายตัวอย่างเข้าคัพพิลลารีคอล์มน์ 99 วินาที และตรวจวัดด้วยยูวี-วิซิเบิลที่มีความยาวคลื่น 200 nm ซึ่งในการวิเคราะห์ใช้เวลา 10 นาที เมื่อนำภาวะดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตในสารตัวอย่างซอสปรุงรส พบว่าในสารละลายตัวอย่างนั้นมีปริมาณคลอไรด์ที่สูงมากกว่าปริมาณของไอโอไดด์และไอโอเดตหลายเท่า ทำให้พีคของไอโอไดด์และไอโอเดตกลืนไปกับเบสไลน์ ทำให้ไม่เห็นพีคของไอโอไดด์และไอโอเดตและไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตได้ ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปจึงควรหาวิธีกำจัดการรบกวนจากคลอไรด์ ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้าได้มีรายงานการศึกษาผลกระทบของเกลือที่มีความเข้มข้นสูงในสารตัวอย่างที่มีต่อการวิเคราะห์ไอออนลบด้วยเทคนิค CE (30) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 mM และ TTAB โดยต้องให้อัตราส่วนความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์และในสารตัวอย่างเหมาะสมกัน ซึ่งเมื่อทำการบรรจุสารตัวอย่างเข้าสู่คัพพิลลารีคอล์มน์ จะเกิด electrostacking จากการที่สารตัวอย่างมีความแรงไอออนิกต่ำกว่าสารละลายอิเล็กโทรไลต์ทำให้ความกว้างของโซนสารตัวอย่างแคบลง ส่งผลต่อการแยกที่ดีขึ้นและขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำลง นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิเคราะห์แอนไอออนในสารตัวอย่างที่มีความเค็มสูง เช่น น้ำทะเล ด้วยเทคนิค CE (12) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการที่เรียกว่าพรีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบย้อนกลับ (reversed pre-electrophoresis, RPE) คือหลังจากบรรจุสารด้วยความดัน จะทำการให้ศักย์ไฟฟ้าโดยให้ด้านเข้าเป็นขั้วบวก เนื่องจากคลอไรด์มีค่า μ ที่สูงกว่าแอนไอออนตัวอื่น ๆ ทำให้คลอไรด์เคลื่อนที่ออกมาจากคอล์มน์ได้เร็วกว่าแอนไอออนตัวอื่น

ซึ่งวิธีการนี้จะสามารถกำจัดคลอไรด์ออกไปจากสารตัวอย่างได้ หลังจากกำจัดคลอไรด์ออกไปจากคอลัมน์จะทำการกลับขั้วไฟฟ้า (ให้ด้านออกหรือด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก) เพื่อให้แอนไอออนตัวอื่นเกิดการแยกตามค่า μ โดยไม่มีผลของคลอไรด์มารบกวน จากวิธีที่ใช้ในการลดการรบกวนจากคลอไรด์ของงานวิจัยทั้งสองที่กล่าวมา น่าจะสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงภาวะของ CE เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตในซอสปรุงรสได้อย่างถูกต้องและไม่มีผลของคลอไรด์มารบกวนสำหรับการหาค่า LOD พบว่า เมื่อใช้วิธีการเพิ่มสารตัวอย่างดังกล่าวข้างต้นจะสามารถวิเคราะห์ปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตได้ต่ำถึง 0.1 $\mu\text{g/L}$ และ 0.5 mg/L ตามลำดับซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำพอที่จะใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณไอโอไดด์และไอโอเดตในซอสปรุงรสได้อย่างถูกต้อง



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Chanapa, P., The risk factor of kidney stones focusing on calcium and oxalate. *Songklanagarind Medical Journal* **2011**, *29*, 299-308.
2. Ahad, F.; Ganie, S. A., Iodine, iodine metabolism and iodine deficiency disorders revisited. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* **2010**, *14* (1), 13-17.
3. Bath, S. R., M., Iodine. *Food Factsheet* **2016**, pp 1-2.
4. Horie, H.; Yamauchi, Y.; Kohata, K., Analysis of organic anions in tea infusions using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1998**, *817* (1-2), 139-144.
5. Savage, G. P.; Charrier, M. J. S.; Vanhanen, L., Bioavailability of soluble oxalate from tea and the effect of consuming milk with the tea. *European Journal of Clinical Nutrition* **2003**, *57* (3), 415-419.
6. Hönow, R.; Gu, K.-L. R.; Hesse, A.; Siener, R., Oxalate content of green tea of different origin, quality, preparation and time of harvest. *Urological Research* **2010**, *38* (5), 377-381.
7. Science, C. o.; Canterbury, U. o., Determination of Iodate in Iodised Salt by Redox Titration. College of Sciences University of Canterbury.
8. Silva, R. L. G. N. P.; Oliveira, A. F. d.; Neves, E. A., Spectrophotometric Determination of Iodate in Table Salt. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1998**, *9*, 171-174.
9. Scientific, T. Determination of iodine and iodate in seawater and iodized table salt by HPLC with UV detection **2009**, p. 1-7. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/81306-AN236-LC-Iodide-Seawater-15Sept2009-LPN2312.pdf>.
10. Wei, L.; Hong-Xia, Y.; Bing, L.; Deng-Yun, C.; Hui-Juan, Z., Speciation Stabilities of Iodine in underground Water by High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2007**, *35* (4), 571-573.

11. Wang, T.; Lin, W.; Dai, X.; Gao, L.; Wang, B.; Quan, D., Determination of Iodate by HPLC-UV after On-Line Electrochemical Reduction to Iodide. *Journal of Chromatographic Science* **2015**, *53* (2), 280-284.
12. Timerbaev, A. R.; Fukushi, K.; Miyado, T.; Ishio, N.; Saito, K.; Motomizu, S., Analysis of highly saline samples by capillary zone electrophoresis: enhanced direct UV detection of inorganic anions using on-capillary preconcentration and clean-up techniques. *Journal of Chromatography A* **2000**, *888* (1-2), 309-319.
13. Yokota, K.; Fukushi, K., Simultaneous Determination of Iodide and Iodate in Seawater by Capillary Zone Electrophoresis. *Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japan* **2004**, *58* (1), 75-79.
14. Pantučková, P.; Krivánková, L., Fast and simple method for determination of iodide in human urine, serum, sea water, and cooking salt by capillary zone electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* **2004**, *25* (7-8), 1102-1110.
15. Wang, T.; Zhao, S.; Shen, C.; Tang, J.; Wang, D., Determination of iodate in table salt by transient isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry* **2009**, *112* (1), 215-220.
16. Kulkarni, P. S.; Dhar, S. D.; Kulkarni, S. D., A rapid assessment method for determination of iodate in table salt samples. *Journal of Analytical Science and Technology* **2013**, *4* (1), 1-6.
17. C.J. Bart, J., *Additives in polymers industrial analysis and application*. DSM Research: The Netherlands, **2005**.
18. He, Y.; Lee, H. K., Large-Volume Sample Stacking in Acidic Buffer for Analysis of Small Organic and Inorganic Anions by Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1999**, *71* (5), 995-1001.
19. Nhujak, T., *Capillary Electrophoresis: Theory, Principles and Applications*. Separation and Chromatography Unit: Department of Chemistry, Chulalongkorn, **2007**; p 241.
20. G. Cikalo, M.; D. Bartle, K.; M. Robson, M.; Myers, P.; R. Euerby, M., Capillary electrochromatography . Tutorial Review. *Analyst* **1998**, *123* (7), 87R-102R.
21. Taboga, M., Lectures on probability and statistics: Normal distribution. **2010**.

22. Shimadzu, C. About Resolution, Part 1. <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/resol-1.html>.
23. Ojavij, S.; Chaisatit, T. Determination of oxalate ion in instant tea using capillary electrophoresis. Chulalongkorn, **2014**.
24. AOAC, I., AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. USA, **2002**; p 21.
25. Barbooti, M. M.; Al-Sammerrai, D. A., Thermal decomposition of citric acid. *Thermochimica Acta* **1986**, *98*, 119-126.
26. Citric acid. Office of The Cane and Sugar Board: Bangkok, p 2.
27. Xie, Y.; McDonald, M. R.; Margerum, D. W., Mechanism of the Reaction between Iodate and Iodide Ions in Acid Solutions (Dushman Reaction). *Inorganic Chemistry* **1999**, *38* (17), 3938-3940.
28. Saleepan, S.; Chavasit, V.; Sinawat, S.; Viriyautsahakul, N.; Saiwongse, N., Feasibility Study of Iodine Fortification through Fish Sauce: Mixed Fish Sauce and Brine for Cooking in Order to Address Iodine Deficiencies in Thailand. *Journal of Public Health* **2014**, *44* (2), 199-215.
29. Paliulionyte, V.; Padarauskas, A., Single-run capillary electrophoretic speciation of iodide and iodine. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *466* (1), 133-139.
30. Song, L.; Ou, Q.; Yu, W.; Xu, G., Effect of high concentrations of salts in samples on capillary electrophoresis of anions. *Journal of Chromatography A* **1995**, *696* (2), 307-319.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวพัชรพร อ่อนทอง เกิดเมื่อวันที่ 4 ธันวาคม 2536 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จ การศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จาก โรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย ชลบุรี (โรงเรียนวิทยาศาสตร์ภูมิภาค) อำเภอบ้านบึง จังหวัด ชลบุรี เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจาก จบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 237 หมู่บ้านธัญญาธานี ซอย 9/2 ตำบลไร่หลักทอง อำเภอ พนัสนิคม จังหวัดชลบุรี 20140

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย