รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้ของเหลวไอออนิคเป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเซมิไมโคร สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ และคลอแรมฟินิคอล ที่ตกค้างในกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูป

Application of ionic liquids as mobile phase additive in Semi-micro HPLC technique for simultaneous determination of residues of nitrofurans and chloramphenicol in shrimp and shrimp products

กฤตยา หนูสาย

เสาวณีย์ ชัยเพชร

ณรงค์ชัย ชูพูล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2558

การประยุกต์ใช้ของเหลวไอออนิคเป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเซมิไมโคร สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ และคลอแรมฟินิคอล ที่ตกค้างในกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูป

กฤตยา หนูสาย[1] เสาวณีย์ ชัยเพชร [2] ณรงค์ชัย ชูพูล [2]

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาศักยภาพและข้อจำกัดของการใช้ของเหลวไอออนิคเป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมเฟนิคอลได้พร้อมกัน ด้วยเทคนิค Semi-micro HPLC จากงานวิจัยพบว่า สามารถใช้ 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 4 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค Semi-micro HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ ไนโตรฟูราโซน ฟูราโซลิโดน ไนโตรฟูราโตอิน และคลอแรมเฟนิคอล ได้พร้อมกัน หลักในการแยกสารคืออาศัยการแข่งขันระหว่างอิมมิดาโซเดียมแคทไอออน(Imidazolium cation) และหมู่ที่มีขั้ว(Polar group) ของสารที่ต้องการจะวิเคราะห์(Analytes) กับหมู่ไซลานอล(Silanol group) บนผิวอัลคิลซิลิกา(Alkylsilica surface) ทำให้เกิดการแยกขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยพบว่าการใช้สารละลายไอออนิกเป็นเฟสเคลื่อนที่นั้นให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ โดยสภาวะที่ใช้คือ อัตราการไหล 0.3 ml/min; ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 270 nm; คอลัมน์ชนิด C_{18} ขนาด 100 mm. x 2.1 mm. โดยที่การวิเคราะห์ไนโตรฟูราโซน มี % recovery อยู่ในช่วง 97.23 – 99.29% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(1, 25 และ 50 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 0.51 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 1.01 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm (R^2 = 0.995) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm(R^2 = 0.991) ไนโตรฟูราโตอิน มี % recovery อยู่ในช่วง 98.94 – 101.41% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(1, 25 และ 50 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 0.38 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 1.01 ppm มีค่า system

linearity อยู่ในช่วง 1 – 50(R^2 = 0.995) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm(R^2 = 0.992) ฟูราโซลิโดน มี % recovery อยู่ในช่วง 97.09 – 99.42% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(1, 25 และ 50 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 0.31 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ (Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 1.21 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 1 – 50(R^2 = 0.996) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm(R^2 = 0.993) คลอแรมเฟนิคอล มี % recovery อยู่ในช่วง 98.22 – 102.76% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(1,25 และ 50 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 0.36 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 1.00 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm (R^2 = .997) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm (R^2 = 0.990) การใช้สารละลายไอออนิกเป็นเฟสเคลื่อนที่นั้นยังเป็นการลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ ซึ่งโดยทั่วไปการวิเคราะห์ตัวยากลุ่มนี้จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC นอกจากนี้แล้ววิธีการวิเคราะห์ที่ถูกพัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้เป็นการใช้ระบบการชะแบบไอโซเครติกซึ่งง่ายในการปฏิบัติงานอีกด้วย ความเที่ยงของการวิเคราะห์แสดงด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พบว่ามีค่าไม่เกิน10%

คำสำคัญ : ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมเฟนิคอล ของเหลวไอออนิคเฟสเคลื่อนที่

.....

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

[2] คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ABSTRACT

This research was aimed to study the potential and limitation of using the ionic liquid as mobile phase additive in Semi-micro HPLC technique for simultaneous determination of Nitrofirazone, Furazolidone, Nitrofuratoin and Chloramphenicol. This research developed method using the ionic liquid as the mobile phase additive to replace organic solvent for decreasing the environmental problems and increasing the efficiency of the separation and analysis. This is the first time that ionic solution was used for simultaneous separation of 4 active compounds. The separation was performed on a C_{18} analytical column(100 mm. x 2.1 mm. i.d); the mobile phase consisted of 15/85 %(v/v) Acetonitrile/4 mM 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate pH 3.0 and flow rate was 0.3 $mLmin^{-1}$. The UV detector was operated at 270 nm. The proposed analytical methodology was validated by employing the standard solutions and spiked samples. The system linearity test was performed using five concentration levels, from 25 to 200% of the target analyte concentration. The regression coefficient(R^2) found were 0.995, 0.996, 0.995 and 0.997 for Nitrofurazone, Furazolidone, Nitrofuratoin and Chloramphenicol, respectively. The method linearity test was performed using three concentration levels, from 50 to 150% of the target analyte concentration. The regression coefficient(R^2) found were 0.991, 0.993, 0.992 and 0.990 for Nitrofurazone, Furazolidone, Nitrofuratoin and Chloramphenicol., respectively. The limits of quantitation (LOQ) found were 1.01 ppm, 1.21 ppm, 1.01 ppm and 1.00 ppm for Nitrofurazone, Furazolidone, Nitrofuratoin and Chloramphenicol., respectively. The limits of detection(LOD) found were 0.51 ppm, 0.31 ppm, 0.38 ppm and 0.36 ppm for Nitrofurazone, Furazolidone, Nitrofuratoin and Chloramphenicol., respectively. No interferences were presented at their retention times. Accuracy expressed in term of recoveries was in the range of 97.09-99.42%(n = 6) for Furazolidone (spiked sample at the 3 concentration, 1, 25 and 50 ppm), recoveries was in the range of 98.94 – 101.41% (n = 6) for Nitrofuratoin (spiked sample at the 3 concentration, 1, 25 and 50 ppm), recoveries was in the range of 98.22-102.76%(n = 6) for and Chloramphenicol (spiked sample at the 3 concentration, 1, 25 and 50 ppm). Precision of method in term of the relative standard deviation was less than 10%. This figures of merit indicated the validity of this method.

Keywords : Nitrofurazone, Furazolidone, Nitrofuratoin, Chloramphenicol, Ionic liquid, Mobile phase

.....

[1]Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya

[2]Faculty of Agriculture Industry, Rajamangala University of Technology Srivijaya

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..……..……1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…..…….……4
สารบัญเรื่อง…...…….……...……..……. ..6
บทที่ 1 บทนำ……..……...7
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย…….....7
1.2 หลักการ ทฤษฎี ตัวแบบ แนวเหตุผล หรือสมมุติฐาน..…….....9
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย……..…….…….....9
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....9
1.5 แนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....10

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….....12
2.1 ไอออนิก ลิควิด……..…….....12
2.2 มาตรฐานการส่งออกของสินค้า…….....15
2.3 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ.....16
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....38

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..…….....40
บทที่ 4 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์.....45
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....59

เอกสารอ้างอิง…….…….....61

บทที่1
บทนำ
(Introduction)

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย

กุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปเป็นสินค้าเกษตรที่สำคัญในการส่งออกของประเทศไทย ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปเป็นอันดับหนึ่งของโลก [1] จากข้อมูลที่ได้จากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรในการวิเคราะห์สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2556 พบว่าในช่วง 5 ปี (2551-2555) แนวโน้มการส่งออกกุ้งและผลิตภัณฑ์กุ้งของไทยเพิ่มขึ้น ทั้งปริมาณและมูลค่าในอัตราร้อยละ 0.37 และ 5.48 ต่อปี ตามลำดับ เป็นการส่งออกในประเภทกุ้งแช่เย็น แช่แข็งและกุ้งปรุงแต่ง ปี 2555 การส่งออกกุ้งแช่เย็นแช่แข็งของไทยลดลงทั้งปริมาณและมูลค่า โดยส่งออก ปริมาณ 174,360 ตัน มูลค่า 42,608.35 ล้านบาท ลดลงจากปริมาณ 189,526 ตัน มูลค่า 48,815.80 ล้านบาท ของปี 2554 คิดเป็นร้อยละ 8.00 และ 12.72 ตามลำดับ สำหรับการส่งออกกุ้งปรุงแต่งในปี 2555 ลดลงทั้ง ปริมาณและมูลค่าเมื่อเทียบกับปีก่อนหน้าเช่นกัน กล่าวคือ ส่งออกปริมาณ 162,870 ตัน มูลค่า 49,527.14 ล้านบาท ลดลงจากปริมาณ 177,032 ตัน มูลค่า 54,164.69 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 8.00 ร้อยละ 8.56 ซึ่งมูลค่าการส่งออกกุ้งปรุงแต่งลดลงในอัตราที่น้อยกว่ากุ้งแช่เย็นแช่แข็ง เพราะกุ้งปรุงแต่งสร้างมูลค่าเพิ่มได้ มากกว่าและมีราคาสูงกว่า ตลาดส่งออกที่สำคัญของไทยยังคงเป็นตลาดเดิม ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพ ยุโรป และญี่ปุ่น ซึ่งขณะนี้ผู้ส่งออกพยายามมองหาช่องทางการจำหน่ายในตลาดใหม่ๆ เช่น ประเทศในตะวันออกกลาง และตลาดอาเซียน ซึ่งขณะนี้เวียดนามมีการนำเข้ากุ้งจากไทยมากขึ้น เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบ แปรรูปอาหารเพื่อการส่งออก เนื่องจากกุ้งที่ผลิตในเวียดนามพบปัญหาสารตกค้างเกินค่ามาตรฐาน ทำให้สินค้าถูกส่งกลับ[2]

ผู้วิจัยได้ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับมาตรฐานการส่งออกของสินค้ากุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูป พบว่า มาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) กำหนดไว้ว่า ห้ามตรวจพบ สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) และคลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol) โดยเด็ดขาด เนื่องจากสารในกลุ่มเหล่านี้จัดเป็นสารก่อมะเร็ง สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone) ไนโตรฟูราโตอิน (Nitrofuratoin) ฟูราโซลิโดน (Furasolidone) เพราะฉะนั้นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณตัว

ยาในกลุ่มดังกล่าวที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูงจึงเป็นที่ต้องการและจำเป็นมากเพื่อป้องกันการสูญเสียรายได้ของประเทศไทย[3] ก่อนหน้านี้ตัวยาเหล่านี้ถูกวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบธรรมดา(Conventional High Performance Liquid Chromatography; HPLC) [4,5,6,7] ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสเคลื่อนที่ทั้งหมด ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่นั้นมีคุณสมบัติเป็นสารระเหยได้ ไวไฟ เกิดอาการระคายเคืองต่อดวงตา และระบบการหายใจ ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม และถ้าหากมีการจัดการห้องปฏิบัติการที่ไม่เหมาะสม มีรายงานจาก ศ.ดร.เบลา เทอร์ไน ราชบัณฑิตทางเคมีประเทศอังกฤษและออสเตรเลีย เปิดเผยผลการสำรวจสภาพห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ว่า ผู้ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์มีโอกาสเป็นมะเร็งหรือเนื้องอกมากกว่าผู้ที่ทำงานในสำนักงานถึง 30 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งมีความบกพร่องของระบบสืบพันธุ์มากกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ และมีอายุขัยสั้นกว่าถึง 10 ปี เนื่องจากมีความบกพร่องในเรื่องต่างๆมากมาย เช่น การถ่ายเทอากาศส่วนมากมีไม่เพียงพอ ทำให้มีกลิ่นเหม็นและมีสารพิษสะสมอยู่ในห้องนั้น เป็นอันตรายผ่อนส่ง บางทีก็มีความเข้าใจผิดคิดว่ามีเครื่องปรับอากาศก็ใช้ได้ แต่ความจริงเครื่องปรับอากาศเป็นการหมุนเวียนอากาศไม่ใช่ถ่ายเทอากาศ และนอกจากนี้ตัวยาเหล่านี้เป็นสารประกอบที่มีสมบัติเป็นเบสเป็นเหตุให้เกิดพีคที่มีหาง(tail) พีคกว้าง และจำนวนเพลทต่ำ ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่นานนักได้มีงานวิจัยหนึ่งได้นำ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตระฟูออโรโบเรท (1-butyl-3-methylimi-dazolium tetrafluoroborate) ซึ่งเป็นของเหลวไอออนิคมาใช้เป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารตระกูลอีพีดริน (Ephedrine)โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบธรรมดา[8]

ในที่นี้ผู้วิจัยมีความสนใจในคุณสมบัติของของเหลวไอออนิค จึงได้มีการศึกษาคุณสมบัติของของเหลวไอออนิคชนิดต่างๆ และหาของเหลวไอออนิคชนิดที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเซมิไมโคร (Semi-micro High-Performance Liquid Chromatography) เพื่อแยกและวิเคราะห์หาปริมาณ สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) และคลอแรมฟีนิคอล (Chloramphenicol) ในกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูป เพื่อลดปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเซมิไมโครถูกใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและสภาพไวของการแยก และเพื่อประหยัดเฟสเคลื่อนที่พร้อมทั้งช่วยลดมลพิษที่มาจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสเคลื่อนที่ได้อีกด้วย นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยแรกที่มีการนำเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเซมิไมโครที่ใช้ของเหลวไอออนิคเป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้นได้พร้อมกัน

1.2 หลักการ ทฤษฎี ตัวแบบ แนวเหตุผล หรือสมมุติฐาน

หน่วยงานภาครัฐมุ่งแก้ไขปัญหายาตกค้างในในกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และการส่งออก นับว่าเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญของประเทศ ตัวยาเหล่านี้ถูกวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบธรรมดา (Conventional High Performance Liquid Chromatography; HPLC) [4,5,6,7] ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสเคลื่อนที่ทั้งหมด เป็นที่ทราบกันดีว่าตัวทำละลายอินทรีย์นั้นมีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อมซึ่งปัจจุบันปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมเป็นหนึ่งในปัญหาที่ใหญ่ที่สุดของโลก ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์เป็นส่วนหนึ่งที่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นผู้วิจัยจึงได้จัดทำโครงการวิจัยนี้ขึ้นเพื่อนำของเหลวไอออนิคมาใช้เป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค semi-micro HPLC แทนตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อได้รับวิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเที่ยงตรง รวดเร็ว และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อสร้างวิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เที่ยงตรง รวดเร็ว และเป็นมิตรกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans) เช่น ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมฟีนิคอล ในกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูป โดยการใช้ของเหลวไอออนิคเป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค semi-micro HPLC แทนตัวทำละลายอินทรีย์

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.4.1 ศึกษาหาชนิดของของเหลวไอออนิคและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่ในการแยกและวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมฟีนิคอล

1.4.2 ศึกษาหาประสิทธิภาพในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมฟินิคอลโดยพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษาคือ แฟกเตอร์ความจุ จำนวนเพลทตามทฤษฎี เทลลิ่งแฟกเตอร์ ความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการแยก

1.4.3 ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาข้อมูลเชิงสถิติเพื่อบ่งบอกถึงความถูกต้อง ความเที่ยง ความไว ความเป็นเส้นตรง ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ และความเลือกจำเพาะ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.5.1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ได้วิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเที่ยงตรง รวดเร็ว และเป็นมิตรกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมฟินิคอล ในกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปตามท้องตลาด

2 เกิดองค์ความรู้ใหม่ในการนำวิธีการวิเคราะห์ที่ถูกพัฒนาขึ้นนี้ไปใช้หาปริมาณตัวยาชนิดอื่น

3 เพิ่มความมั่นใจของผู้บริโภคต่อการเลือกบริโภคกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปตามท้องตลาด

4 สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเที่ยงตรง รวดเร็ว และเป็นมิตรกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมที่ถูกพัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานประจำได้ เช่น งานด้านการวิเคราะห์ในกองควบคุมยาของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

5 ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมของโลก

6 เพิ่มตลาดส่งออกในต่างประเทศของกุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปส่งผลให้ประเทศไทยมีรายได้เพิ่มขึ้น

7 เพิ่มความมั่นใจของประเทศคู่ค้าต่อการเลือกนำเข้าสินค้ากุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปจากประเทศไทย

1.5.2 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1 งานด้านการวิเคราะห์ในกองควบคุมยาของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และในหน่วยงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ(มกอช.)

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

1.6.1 สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเที่ยงตรง รวดเร็ว และเป็นมิตรกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมที่ถูกพัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานประจำได้ เช่น งานด้านการวิเคราะห์ในกองควบคุมยาของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

1.6.2 จัดอบรมการใช้วิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเที่ยงตรง รวดเร็ว และเป็นมิตรกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมที่ถูกพัฒนาขึ้นนี้แก่ นักเคมี และนักศึกษา ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช และบุคลากรภายนอกที่สนใจ

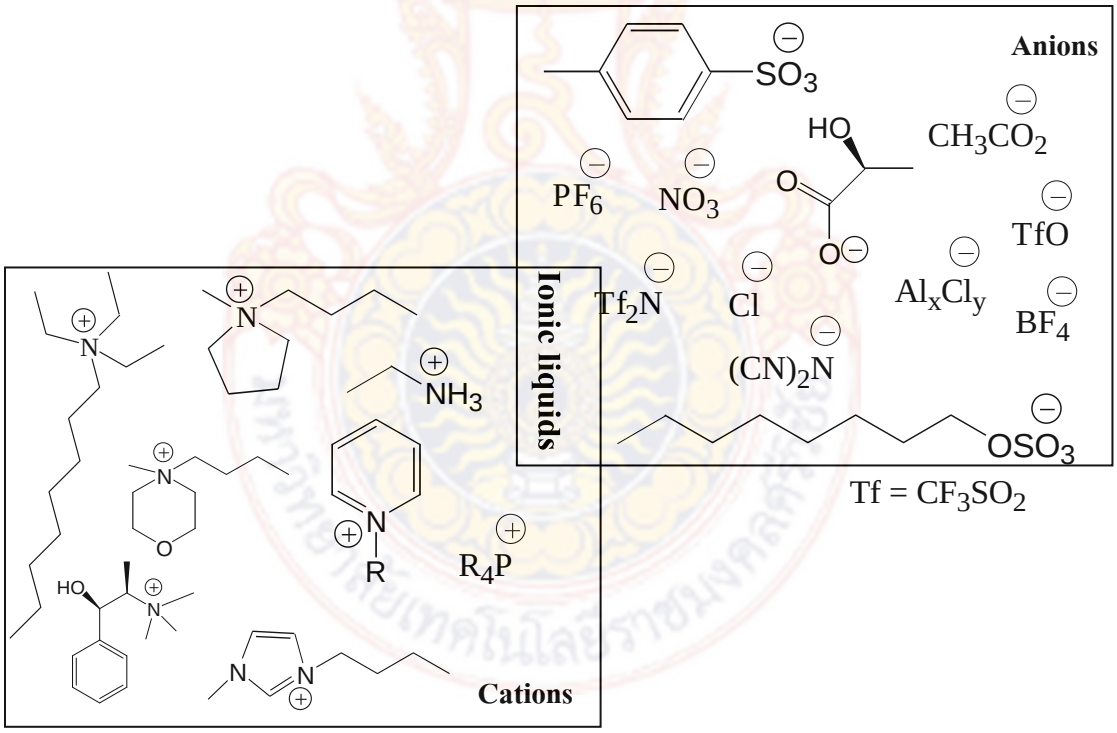
1.6.3 ตีพิมพ์ในวารสารทางด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช และเคมีสีเขียว(Green Chemistry) ในระดับชาติและนานาชาติ

1.6.4 นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมทางวิชาการทางด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช และเคมีสีเขียว ทั้งในประเทศและต่างประเทศ

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
(Literature review)

2.1 ไอออนิก ลิควิด(Ionic liquid)

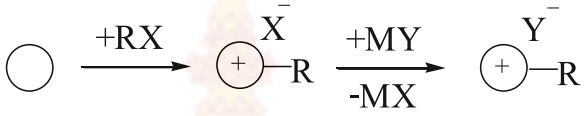
ไอออนิก ลิควิด เป็นเกลือกึ่งอินทรีย์(Semi-organic salts) ซึ่งมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 100 ^{0}C หรือต่ำกว่า เอทิลแอมมิเนียมไนเตรท([$EtNH_3$][NO_3]) เป็นไอออนิกตัวแรกที่ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1914 ซึ่งมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 12 ^{0}C ตัวอย่างไอออนบวก(Cation) และไอออนลบ(Anion) ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของไอออนิก ลิควิด แสดงในรูปที่ 2.1

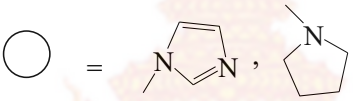


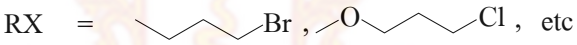
รูปที่ 2.1 ตัวอย่างไอออนบวก(Cation) และไอออนลบ(Anion) ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของไอออนิก ลิควิด

วิธีการเตรียมไอออนิก ลิควิด มี 2 วิธี

1. นำเอมีน(Amine) หรือสารประกอบฟอสฟอรัสมาทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน(Alkylation) กับฮาโลอัลเคน(Haloalkane) เกิดเป็นเกลือเฮไลด์(Halide salts) หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาเมทาทีซิส (Metathesis) กับโลหะหมู่ 1A (Group 1A metal) , แอมโมเนียม(Ammonium) หรือ เกลือของเงิน(Silver salt) ได้เป็นไอออนิก ลิควิด ดังแสดงในรูปที่ 2.2



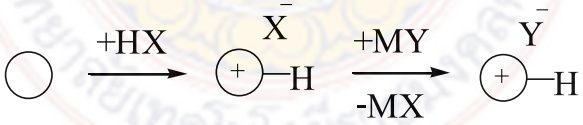
โดย  , PR_3 , etc

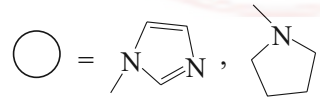


MY = $AgBF_4$, $LiTf_2N$, HPF_6 , etc

รูปที่ 2.2 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอออนิกลิควิดวิธีที่ 1

2. นำเอมีน(Amine) หรือสารประกอบฟอสฟอรัสมาทำปฏิกิริยาการสะเทินด้วยกรด-เบส (Acid-base neutralization)ได้เป็นไอออนิก ลิควิด ดังแสดงในรูปที่ 2.3



โดย  , PR_3 , etc

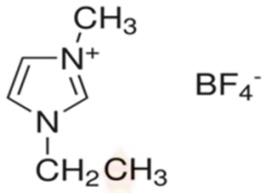
HX = HNO_3 , etc

รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอออนิกลิควิดวิธีที่ 2

ไอออนิก ลิควิด ได้รับการรับรองว่าเป็นตัวทำละลายที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เป็นตัวทำละลายที่ดีทั้งในสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ มีสภาพขั้วสูง ไม่เกิดการโคออนิเนต(Non-coordinating) ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ระเหย(Nonvolatile)สามารถใช้ในระบบที่เป็นสูญญากาศสูงได้ ทนต่อความร้อนสูง มีช่วงที่เป็นของเหลวกว้าง ไม่ไวไฟ(Nonflammable) ไม่สามารถวัดความดันไอได้ ไอออนิก ลิควิด ได้ชื่อว่าเป็นตัวทำละลายผู้ออกแบบ(Designer solvent) หมายความว่าคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิด สามารถปรับเปลี่ยนให้เหมาะกับความต้องการในการใช้งานได้ เช่น จุดหลอมเหลว, ความหนืด, ความหนาแน่น และความสามารถในการละลายสามารถปรับเปลี่ยนโดยการเปลี่ยนไอออนที่เป็นองค์ประกอบใน โครงสร้างของไอออนิก ลิควิด ตัวอย่างเช่น จุดหลอมเหลวของ 1-อัลคิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตระฟูออโรบอเรท(1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate)และเฮกซะฟูออโรฟอสเฟต(Hexafluorophos phate) ขึ้นอยู่กับความยาวของหมู่อัลคิล(Alkyl group) และความสามารถในการละลายน้ำของ1-อัลคิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมเตตระฟูโอโรบอเรท(1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate) พบว่าสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C เมื่อหมู่อัลคิลมีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 6 อะตอม แต่เมื่อมีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 6 หรือมากกว่าก็จะไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งพฤติกรรมนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการสกัดด้วยตัวทำละลายหรือในการแยกผลิตภัณฑ์ เนื่อง จากสามารถปรับเปลี่ยนเพื่อให้เกิดการแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่ายขึ้น จากคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิดดังกล่าวข้างต้นจึงได้มีการนำไอออนิก ลิควิด มาประยุกต์ใช้ในงานด้านเคมีต่างๆมากมาย เช่น การสังเคราะห์(Synthesis), คะตะไลซิส(Catalysis), เคมีไฟฟ้า(Electrochemistry), แก๊สโคร-มาโทกราฟี(Gas chromatography), แคปปิลลารี อีเล็คโทรโฟรีซิส(Capillary electrophoresis,CE) และลิควิด โครมาโทกราฟี(Liquids chromatography)

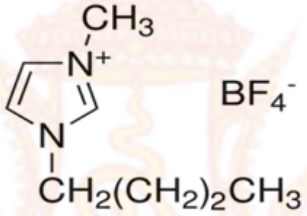
ไอออนิก ลิควิด ที่นำมาศึกษาคุณสมบัติเพื่อใช้เป็นตัวชะในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถณะสูงแบบเซมิไมโคร ในงานวิจัยนี้ มี 2 ชนิด ได้แก่ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท (1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate) และ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate)

1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{32}N_2O_4S$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 348.50 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท

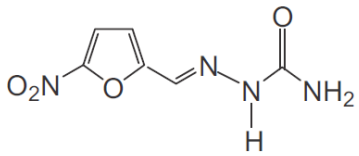
1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท สูตรโมเลกุล $C_{13}H_{26}N_2O_6S$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 338.42 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.5



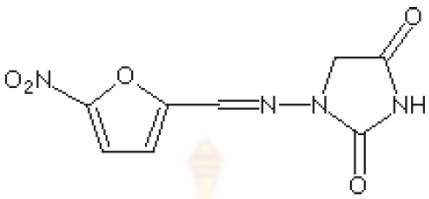
รูปที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท

2.2 มาตรฐานการส่งออกของสินค้ากุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปและมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex)

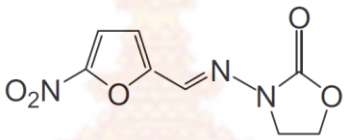
มาตรฐานการส่งออกของสินค้ากุ้งสดและผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปและมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex)กำหนดไว้ว่า ห้ามตรวจพบ สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์และคลอแรมฟินิคอลโดยเด็ดขาด เนื่องจากสารในกลุ่มเหล่านี้ จัดเป็นสารก่อมะเร็ง สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน ดังในรูปที่ 2.6 - 2.9



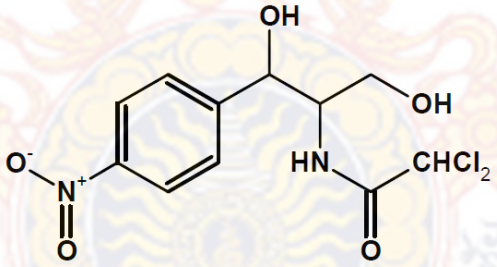
รูปที่ 2.6 ไนโตรฟูราโซน, CAS 59-87-0



รูปที่ 2.7 ไนโตรฟูราโตอิน, CAS 67-20-9



รูปที่ 2.8 ฟูราโซลิโดน, CAS 67-45-8

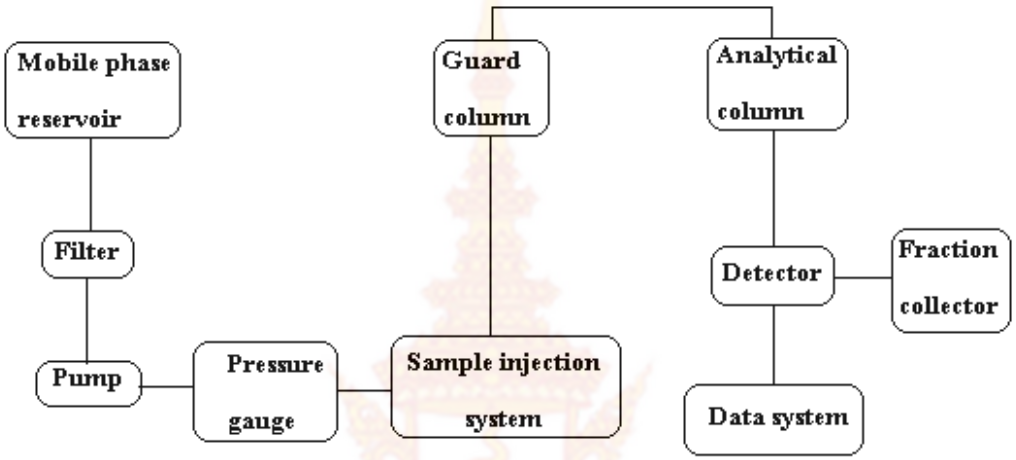


รูปที่ 2.9 คลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol), CAS 56-75-7

2.3 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ(High Performance Liquid Chromatograph; HPLC)

เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการวิเคราะห์และแยกสารเกือบทุกชนิด เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟเป็นเครื่องมือที่มีความไว(Sensitivity) สูง สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างรวดเร็วแม่นยำและมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะสารที่ไม่ระเหยและไม่คง

ตัวต่อความร้อน ส่วนประกอบที่สำคัญของ เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิ- ควิดโครมาโทกราฟ แสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ

การพัฒนาวิธีการแยก(Developing a separation)

การพัฒนาวิธีทางโครมาโทกราฟี เพื่อให้มีการแยกเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และใช้เวลาน้อย ดังนั้นเพื่อที่จะอธิบายและหาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกสารจึงจำเป็นต้องเข้าใจพารามิเตอร์ ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแยกทางโครมาโทกราฟี

พารามิเตอร์พื้นฐาน ได้แก่

1. Partition ratio (Partition Coefficient, K) เป็นค่าคงที่ที่อธิบายถึงการสมดุลของการกระจายตัวของสารตัวอย่างไประหว่างเฟสทั้งสองคือเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ค่า K หาได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่กับความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่ภายหลังกระจายตัวไประหว่างเฟสทั้งสองหรืออัตราส่วนของเวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่กับเวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ดังนี้

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

หรือ

$$K = \frac{t_s}{t_m}$$

เมื่อ C_s = ความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่

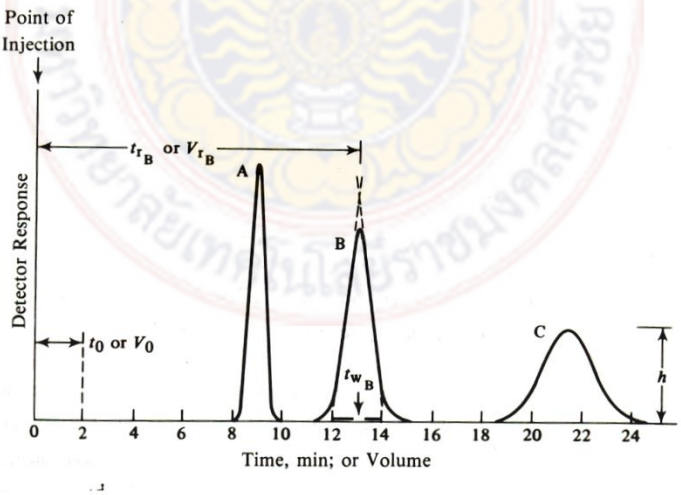
C_m = ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่

t_s = เวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่

t_m = เวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

สารแต่ละชนิดจะมีค่า K คงที่เฉพาะในแต่ละสภาวะของการทดลองเท่านั้น ค่า K แปรผันตามอุณหภูมิของการทดลองและส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ แต่ไม่ขึ้นกับจำนวนสารที่นำมาทำการตรวจวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แต่การที่จะวัดค่า K จากโคร-มาโทแกรมโดยตรงนี้ทำได้ยาก จึงไม่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร มีพารามิเตอร์ตัวอื่นที่สามารถวัดค่าจากโครมาโทแกรมโดยตรงได้ง่ายกว่าและสามารถใช้ในการพิสูจน์เอก- ลักษณ์ของสารได้ เช่น เวลาการคงไว้(retention time), เวลาการคงไว้สัมพัทธ์(relative retention time) เป็นต้น

2. เวลาการคงไว้(Retention time, t_R) เป็นระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาหรือชะล้างสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ คือเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนกระทั่งถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีกบนโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 แสดงโครมาโทแกรมของการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

เวลาการคงไว้(t_R) เป็นพารามิเตอร์ที่วัดหรือหาค่าได้ง่ายจากโครมาโทแกรมสามารถใช้ในด้านการวิเคราะห์คุณภาพหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแต่เนื่องจากมักมีการเปลี่ยนแปลงอย่างใดอย่างหนึ่งของสภาวะการทดลอง เช่น อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่หรือความดันที่ทำให้ค่าเวลาการคงไว้ไม่คงที่ มีผลทำให้การพิสูจน์เอกลักษณ์ผิดพลาดได้ จึงนิยมใช้พารามิเตอร์ตัวอื่น เช่น เวลาการคงไว้สัมพัทธ์ ซึ่งให้ผลถูกต้องกว่า

3. Corrected retention time (t'_R) คือระยะเวลาตั้งแต่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่ถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารตัวอย่างบนโครมาโท- แกรม หรือระยะเวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในเฟสอยู่กับที่ ดังแสดงในรูป 2.18

$$t'_R = t_R - t_0$$

t_O = เวลาที่สารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่(unretained compound) เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือเวลาที่โมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่(mobile phase) เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่หรือคอลัมน์จากปลายด้านหนึ่งไปยังปลายอีกด้านหนึ่ง

4. Retention Volume (V_R) เป็นปริมาตรทั้งหมดของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ โดยวัดจากตำแหน่งที่เริ่มฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์จนถึงตำแหน่งจุดยอดของพีกของสาร หาได้จากความสัมพันธ์ของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate ,F) กับเวลาการคงไว้ (t_R) ดังนี้

$$V_R = Ft_R$$

V_R = retention volume

F = อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate, ml/min)

t_R = เวลาการคงไว้ของสารตัวอย่าง

5. Corrected retention volume (V'_R) ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ โดยวัดจากตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่จนถึงตำแหน่งจุดยอดของสารตัวอย่าง หาค่าได้จาก

$$V_R^{/} = V_R - V_0 = Ft_0$$

Vo = ปริมาตรตาย(dead volume) หรือ ปริมาตรว่าง(void volume)หรือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือผ่านคอลัมน์จากปลายด้านหนึ่งไปยังอีกปลายด้านหนึ่ง

6. แฟกเตอร์ความจุ(Capacity factor,$k^{/}$) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารตัวอย่างหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยกโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก ค่า $k^{/}$ นี้หาได้จาก corrected retention time ของสารที่วิเคราะห์ ($t_R^{/}$) หารด้วยเวลาของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ (t_o) ดังนี้

$$k^{/} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$k^{/}$ เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงลักษณะการทำงานของคอลัมน์ ปัจจัยที่มีผลต่อค่า $k^{/}$ คือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง โดยทั่วไปค่า $k^{/}$ ของสารควรอยู่ระหว่าง 2-5 ทั้งนี้เพราะเวลาที่ใช้และการแยกสมดุลกันดี และค่า $k^{/}$ ที่เหมาะสมของการแยกสารที่ซับซ้อนควรมีค่าระหว่าง$1 \leq k^{/} \leq 16$ ในการปฏิบัติควรหาค่า $k^{/}$ ของพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างน้อย 1 พีก คือพีกแรกเพื่อให้แน่ใจว่าพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์แยกออกจากพีกของตัวทำละลายหรือพีกของสารปนเปื้อน ซึ่งมักจะถูกชะออกมาใกล้หรือที่เดียวกับ t_o พีกของสารที่ทำการวิเคราะห์ไม่ควรมีค่า $k^{/}$ สูงเกิน 10-15 เพราะจะใช้เวลานานและทำให้พีกที่ได้กว้างและการแยกไม่ดี ทำให้การตรวจวัดลำบาก ค่า $k^{/}$ บอกให้ทราบถึงเวลาที่สารถูกชะออกมาจากคอลัมน์ บอกลักษณะของพีกกว้างหรือแคบ การตรวจวัดยากหรือง่าย ความแรงของเฟสเคลื่อนที่แรงหรืออ่อน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จากข้อมูลนี้สามารถนำมาปรับค่า $k^{/}$ ให้เหมาะสมเพื่อให้การแยกสารได้ดีที่สุด

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบค่า k'

ข้อมูล	k' ต่ำ	k' สูง
เวลาที่สารถูกพาออกจากคอลัมน์	น้อย	มาก
ลักษณะของพีก	แหลมสูง	กว้างเตี้ย
การตรวจวัด	ง่าย	ยาก
ความแรงของเฟสเคลื่อนที่	แรง	อ่อน

การปรับหรือควบคุมค่า k'

ในกรณีที่ค่า k' ที่ได้จากการทดลองไม่เหมาะสม อาจสูงไปหรือต่ำไปทำให้การแยกไม่ดี มีวิธีการปรับหรือควบคุมค่า k'หรือเวลาของการชะเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้นหรือดีที่สุดได้ดังนี้

6.1 ปรับเปลี่ยนสัดส่วนผสมหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับเปลี่ยนสัดส่วนหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย ในทางปฏิบัติการเลือกเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมนั้นจะต้องพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่างเป็นหลักและการเลือกความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมทำโดยการแยกสารที่ต้องการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ 1-2 ครั้ง แล้วดูค่า k' ที่ได้ หลังจากนั้นจึงปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้แรงขึ้นหรืออ่อนลงเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น วิธีที่ง่ายและสะดวกในการปรับความแรง คือปรับความเข้มข้นของตัวทำละลาย, pH, ความมีขั้ว โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีหรือชนิดของตัวทำละลายที่เป็นส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ โดยทั่วไปมักจะใช้ตัวทำ-ละลายผสมที่ให้ค่า $1 \le k' \le 10$ เพื่อให้การแยกเกิดขึ้น และเวลาในการแยกไม่นานเกินไป ถ้าต้องการเปลี่ยนค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงน้อย ในทางตรงข้ามถ้าต้องการลดค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงมาก

6.2 เพิ่มหรือลดปริมาณของเฟสอยู่กับที่

ในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดจำเพาะ(size exclusion chromatography)ทำได้โดยการเพิ่ม หรือลดปริมาตรของรูพรุน และพื้นที่ผิวของสารบรรจุในคอลัมน์ ในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบกระจาย(partition chromatography) ทำโดยการเพิ่มหรือลดปริมาณเฟสของเหลวบนสารช่วยพยุง และในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน(ion-exchange chromatography) ทำโดยเพิ่มหรือลดความหนาแน่นประจุ หรือ ความแรงไอออนบนสารบรรจุ

6.3 ปรับเปลี่ยนปัจจัยที่มีผลต่อค่า K

อุณหภูมิและอัตราความเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความผันแปรของค่า K ดังนั้นจึงมีผลต่อค่า k' ด้วย

7. ค่าซีเล็คติวิตี้(selectivity factor,α) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่แยกออกจากกันดีเพียงใด การแยกออกจากกันนี้ขึ้นกับค่าเวลาการคงไว้หรือค่า k' เท่านั้น โดยไม่คำนึงถึงความกว้างของพีก และค่านี้เกี่ยวข้องกับ relative partition coeffcient ของสารสองชนิด หาได้จากอัตราส่วนของ partition coefficient หรืออัตราส่วนของแฟกเตอร์ความจุของสารสองชนิดที่มีพีกติดกัน ดังนี้

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'}$$

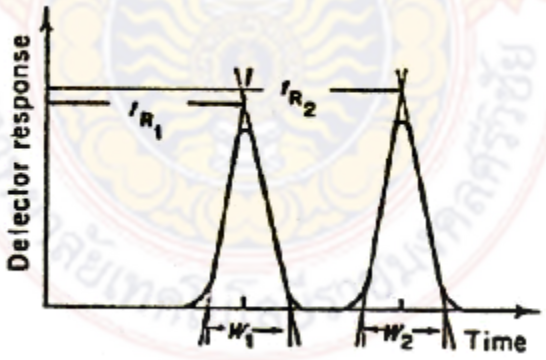
α = ค่าซีเล็คติวิตี้

k_1' = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกแรก

k_2' = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกที่สอง

t_{R1}' = corrected retention time ของพีกแรก

t_{R2}' = corrected retention time ของพีกที่สอง



รูปที่ 2.19 แสดงโครมาโทแกรมของการแยกสารสองชนิด

ค่าซีเล็คติวิตี้(α) เป็นค่าที่มีความสำคัญมาก คือเป็นตัวบอกให้ทราบว่าคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่นั้นอยู่ในสภาวะที่มีการทำงานดีเพียงใด ค่านี้ขึ้นกับองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ พื้นที่ผิวของเฟสอยู่

กับที่ และอุณหภูมิ ในการแยกสาร α จะต้องมีค่ามากกว่า 1 จึงจะมีการแยกเกิดขึ้น ถ้า $\alpha = 1$ แสดงว่าพีกทั้งสองทับกัน เนื่องจากพีกทั้งสองมีเวลาการคงไว้เท่ากัน ค่า α เหมาะสมคืออยู่ในช่วง 1.5 - 4.0

การควบคุมหรือปรับเปลี่ยนค่าซีเล็คติวิตี้(α)

เพื่อให้สารสองชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันได้ดีขึ้นเท่านั้น ทำโดยวิธีต่างๆดังนี้

7.1 ปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ โดยการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่คือเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย

7.2 เปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่ วิธีนี้นิยมใช้กับการแยกสารที่มีการแตกตัวเป็นอิออน เช่นพวกกรดหรือเบส การปรับเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่มักจะทำให้ค่า α เปลี่ยนแปลง แต่ค่า k' เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ส่วนมากใช้ในวิธีการแลกเปลี่ยนไอออน(ion–exchange),ไอออนแพร์(ion–pair)

7.3 เปลี่ยนเฟสอยู่กับที่ ทำโดยการเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์วิธีนี้ไม่สะดวก เสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าการปรับเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม แต่ให้ผลดีมาก ถ้ามีการเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่เฟสเคลื่อนที่ก็ต้องมีการปรับเปลี่ยนให้มีความแรงพอที่จะทำให้ได้ค่า k' ที่เหมาะสม

7.4 เปลี่ยนอุณภูมิของคอลัมน์ โดยทั่วๆไปการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ค่า k' ลดลง ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ จำเป็นต้องลดความแรงของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อเป็นการชดเชยให้ค่า k' อยู่ในช่วงที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า α เพียงเล็กน้อย

7.5 ใช้ปฏิกิริยาพิเศษทางเคมี ปฏิกิริยาที่นิยมใช้คือคอมแพล็กเซชัน(complexation) โดยการเติมซิลเวอร์ไนเตรท(silver nitrate) ลงในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งซิลเวอร์ไอออนนี้จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ t_R และ α ทำให้การแยกดีขึ้น

8. ประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากความกว้างของพีกที่ถูกชะออกมา ประสิทธิ- ภาพของคอลัมน์ที่ดี พีกแต่ละพีกที่ถูกชะออกมาจะต้องมีฐานที่แคบและแยกออกจากกันได้ ค่าที่ใช้วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวนเพลทของคอลัมน์ (number of theoretical plates, N) และความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์(Height equivalent to a theoretical plate, H หรือ HETP)

จำนวนเพลทของคอลัมน์ (N) เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ว่า คอลัมน์นั้นมีการบรรจุดีเพียงใด พิจารณาจากความกว้างของพีกขณะเคลื่อนผ่านคอลัมน์ โดยเปรียบเทียบความกว้างของพีกกับเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ สามารถคำนวนได้จากโครมาโทรแกรมดังนี้

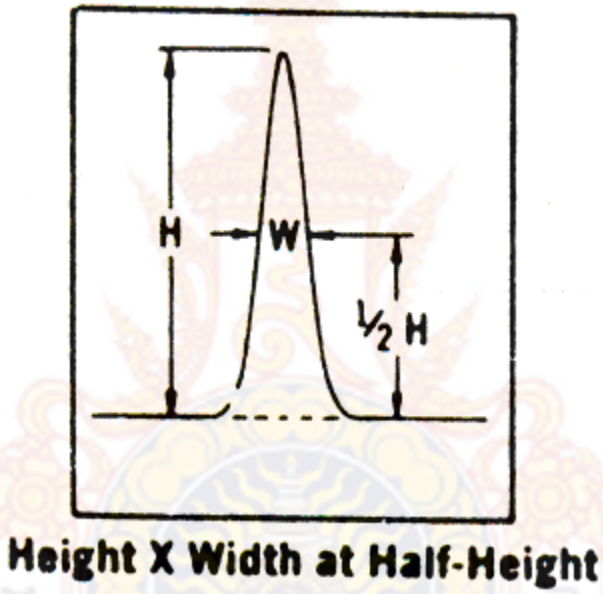
$$N = a\left(\frac{t_R}{W}\right)^2$$

N = จำนวนเพลท (number of theoretical plates)

t_R = เวลาการคงไว้ของสาร

W = ความกว้างของพีกที่ตำแหน่งของความสูงที่กำหนด

a = ค่าคงที่ขึ้นกับวิธีการวัดความกว้างของพีก ตามตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.20 แสดงโครมาโทแกรมสำหรับคำนวณจำนวนเพลทของคอลัมน์ (N)

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีกโดยวิธีต่างๆ

วิธี	a
ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง	5.54
ความกว้างของพีกที่ 4.4 % ของความสูง(5σ)	25
Tangent	16

9. ค่าความสามารถในการแยก(Resolution,R_S)

เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีกทั้งสอง คำนวนได้จากระยะห่างกันระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุดของพีกทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีกทั้งสอง ดังแสดงในรูปที่ 2.21

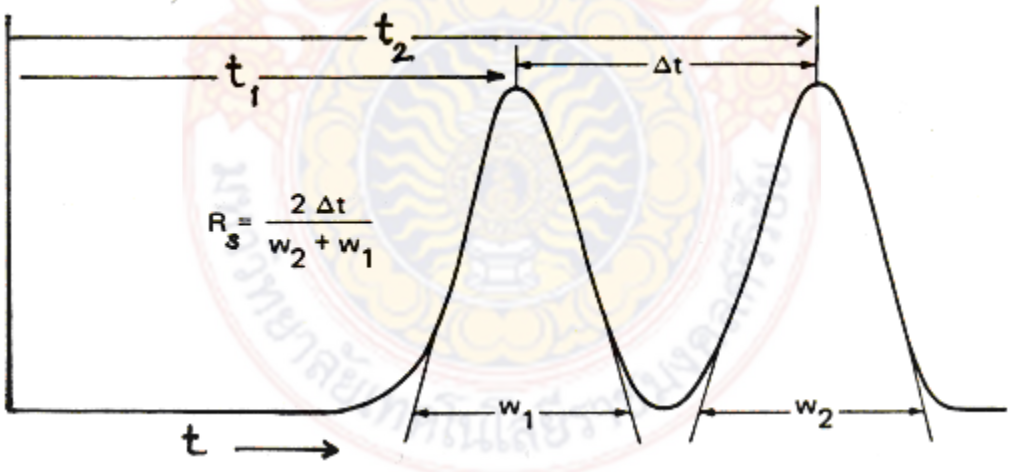
$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} = \frac{2\Delta t_R}{W_1 + W_2}$$

R_s = ค่าความสามารถในการแยก(Resolution)

t_{R1} และ t_{R2} = เวลาการคงไว้ของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

W_1 และ W_2 = ความกว้างของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

Δt_R = ระยะห่างระหว่างจุดสูงสุดของพีกทั้งสอง



รูปที่ 2.21 แสดงโครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่าการแยก(Resolution, R_S)

ถ้าพีกสมมาตร R_S มีค่าเท่ากับ 1.5 แสดงว่าการแยกของพีกทั้งสองลงถึงเบสไลน์จะมีการทับกันเพียงประมาณ 0.3% ถือเป็นการแยกอย่างสมบูรณ์ ถ้า R_S มีค่าเท่ากับ 1.0 พีกทั้งสองจะทับกันบางส่วน

คือประมาณ 2% และการแยกนี้สามารถนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ถ้า R_S มีค่าเท่ากับ 0.75 พีกทั้งสองจะทับกันมาก ไม่สามารถใช้งานด้านวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ถ้า R_S มีค่าสูงเกินไป พีกทั้งสองจะห่างกันมาก ทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองตัวทำละลายโดยไม่จำเป็น ดังนั้นการแยกควรปรับสภาวะของการแยกเพื่อให้ได้ค่า R_S ที่เหมาะสม

จะเห็นว่าค่าความสามารถในการแยกเกี่ยวข้องกับเวลาการคงไว้และความกว้างของพีก คือ เวลาการคงไว้เกี่ยวข้องกับ แฟกเตอร์ความจุ(k') และค่าซีเล็คติวิตี้ (α) ส่วนความกว้างของพีกเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์(N) ค่า R_S จะเพิ่มเมื่อ Δt เพิ่ม และความกว้างของพีกต้องลดลง จากความสัมพันธ์ของค่าความสามารถในการแยกกับพารามิเตอร์ดังกล่าวสามารถเขียนเป็นสมการความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$R = \frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'}{1+k'}\right)$$

(1) (2) (3)

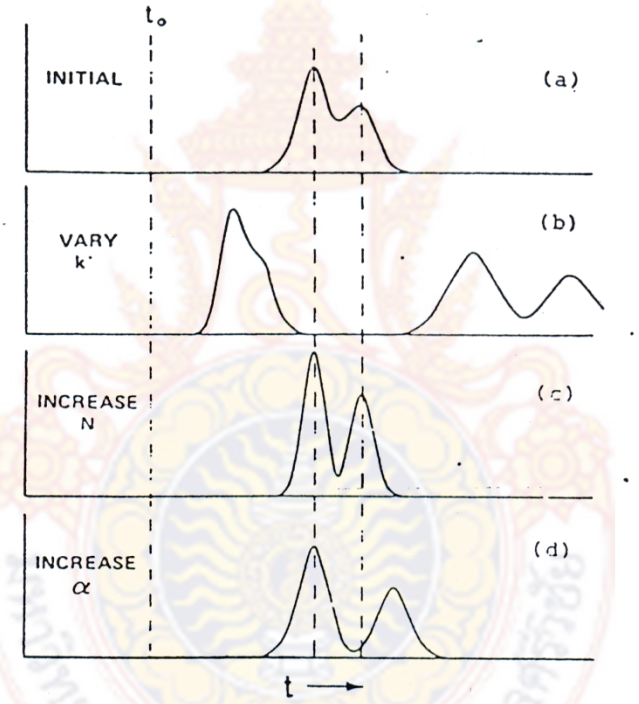
จากสมการสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุดและใช้เวลาน้อย ได้สามวิธี คือการปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ(k'), ค่าซีเล็คติวิตี้(α) และ จำนวนเพลท(N) ในการทำงานจะต้องพิจารณาดูว่า ควรปรับพารามิเตอร์ตัวใดก่อน-หลังเพื่อให้การแยกดีขึ้น สิ่งที่ง่ายและสะดวกคือ ควรปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ และ ค่าซีเล็คติวิตี้ก่อน ถ้าการแยกยังไม่ดีจึงปรับค่าจำนวนเพลท ซึ่งไม่สะดวกและเสียค่าใช้จ่ายสูง

จากสมการ เทอมที่ 1 ประสิทธิภาพของคอลัมน์(Efficiency) เกี่ยวข้องกับอิทธิพลทางไค-เนติค (kinetic effect) ที่มีผลต่อความกว้างของพีกคือ $\sqrt{N}$ เทอมที่ 2 ค่าซีเล็คติวิตี้ (selectivity) และเทอมที่ 3 ค่าแฟกเตอร์ความจุ(capacity) เกี่ยวกับเทอร์โมไดนามิกส์ของสารที่ทำการแยก คือขึ้นกับค่าการกระจายตัวของสาร (distribution coefficient, K) และปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ พารามิเตอร์ในเทอมที่ 2 คือ ค่าซีเล็คติวิตี้(selectivity,α) เกี่ยวข้องเฉพาะกับคุณสมบัติของสารทั้งสองชนิดเท่านั้น ส่วนพารามิเตอร์ในเทอมที่ 3 คือ ค่าแฟกเตอร์ความจุ(capacity,k')เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทั้งของสารและคอลัมน์

การปรับค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์(column efficiency,N) การปรับค่า N เพื่อให้ความสามารถในการแยกดีขึ้นนั้นเป็นทางเลือกสุดท้ายเพราะเสียค่าใช้จ่ายสูงและไม่สะดวก การเพิ่มค่า

N ทำโดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ ทำให้พีกแคบลง โดยทั่วๆ ไปมักจะลดค่า H (height equivalent of a theoretical plate) ซึ่งค่า H นี้มีความสัมพันธ์กับค่า N คือค่า H ต่ำ ค่า N จะสูง การลดค่า H ทำโดยการเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ลดขนาดของอนุภาคของสารบรรจุในคอลัมน์ ลดความหนืดของเฟสเคลื่อนที่ (เพื่อเพิ่มอัตราการกระจายตัวของสารในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้พีกแคบลง) และเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์

ตัวอย่างแสดงผลของการปรับค่า k', α และ N ที่มีต่อ resolution ดังในรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 โครมาโทแกรมแสดงผลของการปรับค่า k', α และ Nที่มีต่อ resolution (R_S)

จากรูปที่ 2.22 สามารถอธิบายผลของการปรับค่า k', α และ N ที่มีต่อความสามารถในการแยกได้ดังนี้ เช่น การแยกสารสองชนิด ด้วยรีเวิร์สเฟสคอลัมน์ ใช้ส่วนผสมของน้ำและเมทานอล เป็นเฟสเคลื่อนที่ เริ่มด้วยใช้เมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 50:50 สารทั้งสองจะแยกดังในรูป (a) ค่า k' ที่ได้อยู่ในช่วง $0.5 < k' < 2$ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการปรับค่า k' ก่อนเพราะสะดวก ถ้าต้องการลดค่า k' จะต้องเพิ่มความแรงของเฟสเคลื่อนที่ คือเพิ่มสัดส่วนของเมทานอลต่อน้ำเป็น 70:30 ผลการแยกไม่ดี พีกทับกันดังในรูป (b) ด้านซ้าย เพราะฉะนั้นต้องเพิ่มค่า k' เพื่อให้การแยกดีขึ้น โดยลดความ

แรงของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 35:65 การแยกดีขึ้น แต่ความสูงของพีกลดลงมาก และใช้เวลานาน ดังในรูป (b) ด้านขวา รูป (c) เป็นการปรับค่า N โดยการเพิ่มจำนวนเพลท เช่นความยาวของคอลัมน์จาก 10 เซนติเมตร เป็น 15 เซนติเมตร ผลของการแยกพีกแคบลง ความสูงเพิ่มขึ้น เวลาไม่เปลี่ยนไปจากเริ่มแรก (โดยทั่วไปการเพิ่มค่า N หรือความยาวของคอลัมน์ เวลาจะเปลี่ยน แต่ในกรณีนี้เข้าใจว่าอัตราส่วนของน้ำหนักของสารตัวอย่างต่ออนุภาคของคอลัมน์ไม่เปลี่ยนแปลง) รูป (d) เป็นการปรับค่า α โดยการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่จากเมทา-นอลเป็นอะซิโตรไนไทล์ เช่นใช้ 40% อะซิโตรไนไทล์ในน้ำ ผลการแยกดีขึ้นเวลาการคงไว้และความสูงของพีกเปลี่ยนไม่มากนัก

การตรวจสอบระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability)

เป็นการตรวจสอบให้แน่ใจว่าระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ซึ่งการตรวจสอบนี้ เป็นการตรวจสอบเกี่ยวกับเครื่องมือ ระบบไฟฟ้า วิธีการและสภาวะของการทดลอง พารามิเตอร์ที่ใช้เพื่อทำการตรวจสอบ ได้แก่ ความเที่ยง หาได้จากค่า Relative Standard Deviation (S_R) และ ค่าการแยก หาได้จากจำนวนเพลททางทฤษฎี(Plate count or column efficiency,N) เทลลิ่ง แฟกเตอร์(tailing factor,T) และค่าความสามารถในการแยก(Resolution ,R_S)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(Relative standard deviation ,S_R) เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องมือ ทำโดยการฉีดสารละลายของสารมาตรฐาน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ซ้ำๆ กัน ในกรณีที่กำหนด ค่า S_R ไม่เกิน 2% ต้องคำนวณจากข้อมูลที่ได้จากการฉีดสาร 5 ครั้ง และถ้ากำหนดค่า S_R เกิน 2% ต้องคำนวณจากข้อมูลที่ได้จากการฉีด 6 ครั้ง

ค่า S_R คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ได้จากสูตร

$$S_R\,(\%) = \frac{100}{\overline{X}}\left[\frac{\sum_{i=1}^{N}\left(X_i-\overline{X}\right)^2}{N-1}\right]^{\frac{1}{2}}$$

X_i = ค่าการตอบสนอง(Response) อาจเป็นความสูงของพีก(Peak height) พื้นที่ของพีก(Peak area) หรือ เวลาในการคงไว้ (Retention time) ของการฉีดสารแต่ละครั้ง

N = จำนวนครั้งในการฉีดสาร

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของการตอบสนอง

ค่า S_R ขึ้นกับความแม่นยำของเครื่องมือ ไม่สามารถที่จะแก้ให้ดีขึ้นด้วยการปรับสภาวะของการทดลอง

จำนวนเพลททางทฤษฎี(Plate count or column efficiency ,N)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ มักจะใช้ค่านี้ตรวจสอบระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability)ในกรณีที่ทำการวิเคราะห์สารชนิดเดียวเป็นการบอกถึงความแหลมของพีก ค่านี้มีความสำคัญในกรณีที่ทำการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ

ค่า N หาได้จากสูตร

$$N = 16\left(\frac{t}{w}\right)^2$$

ค่าความสามารถในการแยก(Resolution, R_S)

เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกสองพีกที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีกทั้งสอง ค่านี้บอกถึงประสิทธิภาพของระบบการแยกเพื่อให้แน่ใจว่า สารมาตรฐานภายในแยกออกจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ การแยกที่สมบูรณ์ มีค่า R_S = 1.5 แต่ค่า R_S = 1 ก็สามารถใช้สำหรับงานวิเคราะห์ได้ ในการวิเคราะห์ยาตาม USP มักจะกำหนดตัวยาที่ใช้ในการหาค่า R_S

ค่า R_S หาได้จากสูตร

$$R_S = \frac{2\left(t_{R2} - t_{R1}\right)}{W_2 + W_1}$$

เทลลิ่ง แฟกเตอร์(Tailing Factor,T)

เป็นค่าที่วัดหรือบอกถึงความสมมาตรของพีก ถ้าพีกสมมาตร ค่า T มีค่า = 1 ถ้าค่า T มีค่ามากกว่า 1 พีกจะไม่สมมาตร คือพีกเป็นหางทำให้การตรวจวัดและผลการวิเคราะห์ไม่น่าเชื่อถือ ถ้า T > 2.0 แสดงว่าคอลัมน์มีประสิทธิภาพต่ำ

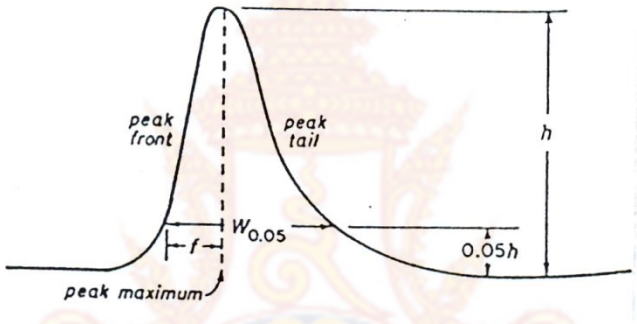
ค่า T หาได้จากสูตร

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

T = เทลลิ่ง แฟกเตอร์(tailing factor)

$W_{0.05}$ = ความกว้างของพีกที่ความสูง 5% จากเบสไลน์

f = ระยะทางระหว่างจุดสูงสุดของพีกไปยังส่วนลาดของพีกด้านหน้า ค่านี้วัดที่ 5 % ของความสูงจากเบสไลน์



รูปที่2.23 แสดงความไม่สมมาตรของพีก(asymmetrical peak)

การตรวจสอบเหล่านี้ หาได้จากการรวบรวมข้อมูลจากการฉีดสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายของสารอื่นๆ ที่กำหนด หรือหาค่าระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability) ได้จากสารที่ทำการวิเคราะห์ บางครั้งในการวิเคราะห์อาจจะไม่ได้ค่าระบบที่ใช้วิเคราะห์ตามที่กำหนด ซึ่งสามารถที่จะปรับปรุงแก้ไขค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้ เช่นค่า T ทำโดยการเปลี่ยนส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น

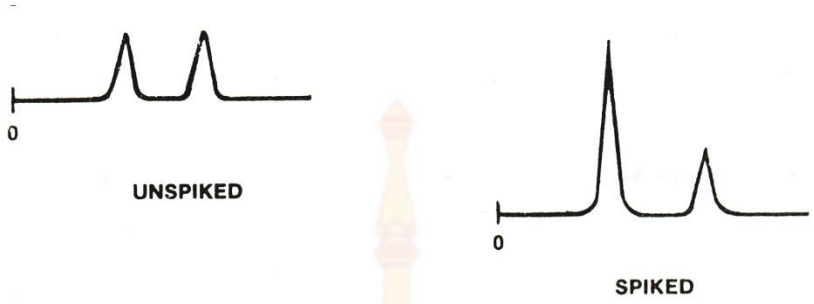
การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ(Qualitative Analysis)

HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารเพื่อตรวจเอกลักษณ์ วัดปริมาณและสามารถแยกเก็บสารแต่ละชนิดที่แยกออกมาได้ การตรวจเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้ ทำได้โดยเปรียบเทียบค่า เวลาการคงไว้กับสารมาตรฐานโดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องทำการวิเคราะห์โดยมีสภาวะต่างๆ เหมือนกัน เช่น อุณหภูมิ ชนิดของคอลัมน์ ชนิดและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น สารที่ให้ค่าเวลาการคงไว้ต่างกันภายใต้การวิเคราะห์สภาวะเดียวกัน แสดงว่าเป็นสารต่างชนิดกัน อย่างไรก็ดี สารที่ให้ค่าเวลาการคงไว้เท่ากันอาจเป็นสารต่างชนิดกันก็ได้ จะต้องวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อเพิ่มความมั่นใจ โดยวิธีการดังนี้

1. ทำการวิเคราะห์ใหม่โดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ หรือ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่
2. ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างเดิมโดยใช้เทคนิคอื่น
3. นำส่วนที่แยกได้จาก HPLC ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่น

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของสาร

1. เปรียบเทียบเวลาการคงไว้รายละเอียดดังกล่าวมาแล้วข้างต้น
2. เปรียบเทียบปริมาตรการคงไว้ ถ้าสารตัวอย่างให้ปริมาตรการคงไว้ต่างจากสารมาตรฐาน เมื่อทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกัน ก็แสดงว่าเป็นสารต่างชนิดกัน แต่ถ้าปริ-มาตรการคงไว้เท่ากัน สารตัวอย่างก็อาจเป็นสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน
3. เปรียบเทียบเวลาการคงไว้สัมพัทธ์กับสารมาตรฐานชนิดอื่นที่ให้ค่าเวลาการคงไว้ไม่ตรงกัน เช่น ต้องการตรวจเอกลักษณ์ของสารตัวอย่างว่าเป็นโคเคอีนหรือไม่ ก็อาจใช้ โคดีอีนเป็นสารมาตรฐานชนิดที่สอง โดยเติมโคเดอีนลงในสารมาตรฐานโคเคอีนและลงในสารตัวอย่างด้วย ฉีดสารผสมทั้งสองเข้า HPLC สารผสมละ 1 – 2 ครั้ง เปรียบเทียบอัตราส่วนเวลาการคงไว้ของ โคเคอีนกับโคเดอีน และของสารตัวอย่างกับโคเดอีน ถ้าอัตราส่วนทั้งสองต่างกัน แสดงว่าสารตัวอย่างไม่ใช่โคเคอีน แต่ถ้าเท่ากันสารตัวอย่างอาจเป็นโคเคอีนต้องเพิ่มความมั่นใจโดยวิธีต่างๆ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น
4. การเติม(Spiking) ในกรณีนี้วิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วแยกได้ 2 พีก ถ้าทราบว่าสารตัวอย่างเป็นสารผสมของ A และ B แต่อยากทราบว่าพีกใดเป็นของ A พีก ใดเป็นของ B ก็ทำได้โดยเติมสารมาตรฐาน A หรือ B ลงไป เช่น ถ้าเติมสาร A ลงไป พีกที่มีพื้นฐานมากหรือสูงขึ้นก็แสดงว่าเป็นพีกของสาร A ดังรูป 2.24



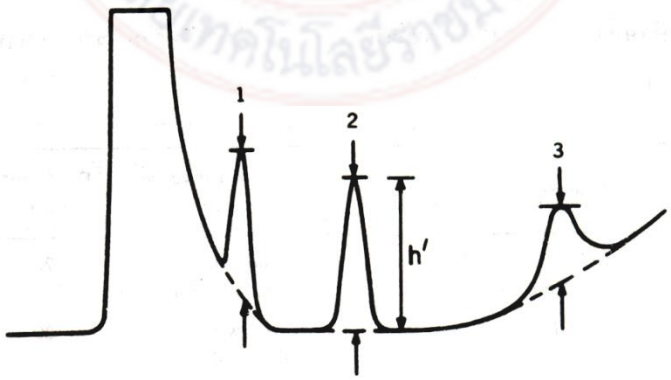
รูปที่ 2.24 แสดงการวิเคราะห์พีกด้วยเทคนิคการเติม(spiking)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ(Quantitative Analysis)

หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีกต่างๆ ปริมาณของสารในแต่ละพีกก็สามารถคำนวณได้ดังนี้

1. โดยวัดความสูงของพีก เทียบกับความสูงของพีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป เนื่องจากความสูงของพีกจะแปรตามปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไปในเครื่องตรวจวัด

ความสูงของพีก(H) วัดระยะจากเบสไลน์ถึงจุดสูงสุดของพีก ดังแสดงที่พีกที่ 2 ในรูปที่ 2.25 การวัด H ทำได้ง่ายและสะดวกโดยใช้ไม้บรรทัดหรือนับช่องตารางในกระดาษ หรือได้จากคอมพิวเตอร์ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัด กรณีที่ เบสไลน์ดริฟสามารถแก้ไขโดยลากเส้นเบสไลน์จากจุดที่เริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดของพีก ดังแสดงที่พีก 1 และ 3 ในรูปที่ 2.25 อย่างไรก็ดี ถ้าต้องการให้ค่าที่วิเคราะห์ได้มีความเที่ยงดี เบสไลน์ควรอยู่ในแนวราบ ดังแสดงที่พีก 2



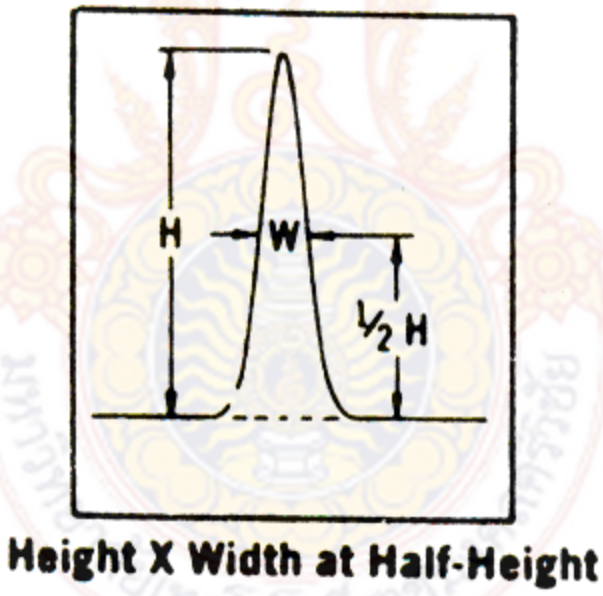
รูปที่ 2.25 การวัดความสูงของพีก

เมื่อใช้วิธีนี้ต้องควบคุมไม่ให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนเนื่องจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนรูปร่างของพีก ซึ่งทำให้ความสูงของพีกเปลี่ยนไป นอกจากนี้วิธีนี้ห้ามใช้กับพีกที่มีหาง พีกที่มีลักษณะกว้าง เพราะจะทำให้ที่คำนวณได้ไม่ถูกต้อง

2. โดยวัดพื้นที่พีก ของสารตัวอย่างกับพื้นที่พีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป วิธีนี้ให้ผลแม่นยำกว่าวิธีแรก

การหาพื้นที่พีกทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. คำนวณจากความสูงของพีก(H) ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง (W) วิธีนี้เหมาะสำหรับพีกที่มีรูปร่างใกล้เคียงกับการกระจายแบบเกาส์เซียนดังแสดงในรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.26 การคำนวณพื้นที่ของพีก โดยใช้ความสูงของพีก(H) คูณกับความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง(W)

2. ตัดพีกแล้วชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด เทียบกับน้ำหนักของพีกของสารมาตรฐาน วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมใช้

3. ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์คำนวณ วิธีนี้ให้ผลแม่นยำกว่า 2 วิธีข้างต้น และประหยัดเวลา แต่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสำหรับเครื่องมือดังกล่าว

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่าง

เมื่อผู้วิเคราะห์ทราบความสูงหรือพื้นที่พีกของสารมาตรฐานแล้ว ต้องนำมาทำกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่าง เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่างมีดังนี้

1. Internal standard technique

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยเติมสารที่ต่างชนิดกับสารตัวอย่าง(internal standard) ลงไปในสารตัวอย่างและสารมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากันก่อนนำไปฉีด ปริมาณที่ใช้ควรให้พีกที่มีขนาดใกล้เคียงกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานภายใน(Internal standard) ต้องมีคุณสมบัติดังนี้

(1) ไม่ใช่สารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง

(2) เป็นสารบริสุทธิ์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง

(3) ให้พีกที่ไม่ซ้อนกับพีกจากสารตัวอย่างและมีเวลาการคงไว้ ไม่มากเกินไป

(4) เป็นสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ในสารตัวอย่างและสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดเดียวกัน

เทคนิคนี้มีข้อดีที่สารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่างไม่จำเป็นที่จะต้องถูกชะ ออกมาหมดทุกตัว เพียงแต่สารที่ต้องการจะวิเคราะห์และสารมาตรฐานภายในที่เติมลงไปถูกชะออกมาหมดก็พอแล้ว

2. External standard technique

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยฉีดสารละลายสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กันโดยปริมาตรต้องเท่ากันและแม่นยำ วัดพื้นที่ใต้พีก และนำพื้นที่ใต้พีกที่กล่าวมาพลอตกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานจะได้กราฟมาตรฐานจากนั้นฉีดสารตัวอย่างปริมาตรที่เท่ากับที่ฉีดสารมาตรฐาน วัดพื้นที่ใต้พีกนำมาหาค่าที่กราฟมาตรฐานทราบปริมาณในสารตัวอย่าง

วิธีนี้ไม่ถูกต้องเท่า Internal standard technique และจะให้ผลดีต่อเมื่อมีปัจจัยดังนี้

(1) ปริมาตรสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่ฉีดในแต่ละครั้งต้องเท่ากันและต้องแม่นยำ

(2) เวลาการคงไว้ของสารแต่ละตัวมีค่าคงที่

(3) การทำงานของคอลัมน์ และการตอบสนองของดีเทคเตอร์ต้องคงที่ตลอดการวิเคราะห์

(4) การหาค่าพื้นที่ใต้พีกของสารตัวอย่างต้องใช้กราฟมาตรฐานช่วงที่เป็นเส้นตรง

วิธีนี้สะดวกกว่า Internal standard technique ตรงที่ไม่ต้องหาสารมาตรฐานภายในซึ่งการหาชนิดที่เหมาะสมทำได้ยากถ้ามีพีกหลายพีกในสารตัวอย่าง

3. Area percent technique

วิธีนี้ไม่ต้องทำกราฟมาตรฐานใช้ในกรณีที่ต้องการทราบอัตราส่วนของสารแต่ละอย่างในของผสม เช่น ในการวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนในสารตัวอย่างในธรรมชาติเทียบกับองค์ประกอบหลักหรือวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทางปิโตรเคมี ซึ่งมีไฮโดรคาร์บอนด์หลายชนิด วิธีนี้จะใช้ในกรณีดังนี้

(1) สารแต่ละอย่างในของผสมตอบสนองเครื่องตรวจวัดเท่าๆ กัน

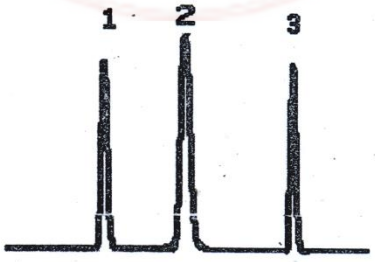
(2) สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบมีจำนวนจำกัด

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC วัดพื้นที่ของแต่ละพีก นำผลรวมของทั้งหมดมาใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง

4. **Standard addition technique** แบ่งเป็น 2 วิธี

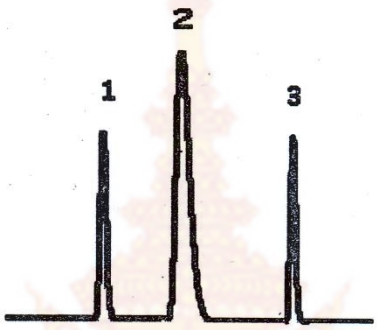
4.1 เป็นเทคนิคระหว่าง internal standard กับ External standard จะใช้ต่อเมื่อดี-เทคเตอร์ตอบสนองเป็นเส้นตรง ใช้วิเคราะห์เมื่อสารตัวอย่างมีเพียง 2-3 ตัวอย่าง โดยมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

(1) นำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์



รูปที่ 2.27 (a) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง

(2) นำสารตัวอย่างมาเติมสารมาตรฐานตัวที่ต้องการวิเคราะห์โดยทราบปริมาณที่แน่นอน แล้วนำไปวิเคราะห์



รูปที่ 2.27 (b) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

เช่น ถ้าต้องการหาปริมาณของพีก 2 และ 3 ก็ให้เติมสารมาตรฐานของตัวที่ 2 และ 3 ลงไป

$$X_a = \frac{Height - of\ -2a}{Height - of\ -1a}$$

$$X_b = \frac{Height - of\ -2b}{Height - of\ -1b}$$

$$X_b - X_a = X_{added}$$

โดยความสูงจะสัมพันธ์กับความเข้มข้น

$$\frac{X_a}{X_{added}} = \frac{[C_2]_a}{[C_2]_{added}}$$

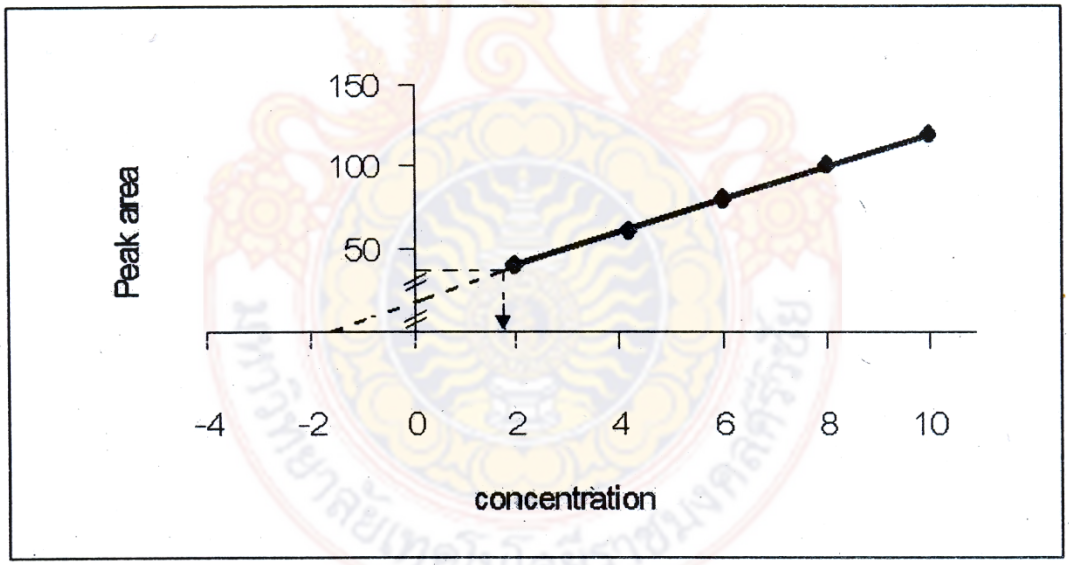
$$[C_2]_a = \left[\frac{X_a}{X_{added}}\right] x [C_2]_{added}$$

ในทำนองเดียวกัน unknown 3 ก็สามารถหาได้เช่นกัน จะเห็นว่าวิธีการนี้ สารตัวที่ 1 ทำหน้าที่คล้ายสารมาตรฐานภายใน

4.2 Standard addition calibration curve ใช้สารมาตรฐานของ unknown เตรียมหลายๆ ความเข้มข้น แล้วทุกๆความเข้มข้นเติม unknown ลงไปปริมาณที่เท่ากัน เมื่อนำไปวิเคราะห์แล้วให้พลอตกราฟระหว่างพื้นที่พีกกับปริมาณสารมาตรฐาน จากนั้นหาปริมาณ unknown ได้ 2 วิธี คือ

4.2.1 ลากเส้นตรงต่อจากเคอร์ฟมาตัดแกน –x ขนาดที่อ่านได้ที่แกน –x คือ ปริมาณของ unknown (คิดค่าเป็นบวก)

4.2.2 จากจุดตัดแกน y ให้นำค่าที่เท่ากันทบขึ้นไปทางด้านบนของแกน y แล้วลากมาตัดกับเส้นเคอร์ฟมาตรฐาน จากนั้นอ่านค่าที่ได้บนแกน x



รูปที่ 2.28 การหาปริมาณ unknown โดยวิธี Standard addition calibration curve

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. Trevor M. Letcher และคณะ [10] ได้หาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ (Activity coefficients at infinite dilution, γ_{13}^{∞} ; เมื่อ 1 คือตัวถูกละลาย และ 3 คือตัวทำละลาย) ของตัวถูกละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วใน 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต โดยใช้เทคนิคแก๊สลิควิดโครมาโทกราฟี ได้มีการตรวจสอบอันตรกิริยาที่บริเวณรอยต่อของของเหลวกับแก๊สระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลาย โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของเหลวที่เป็นตัวทำละลายบนคอลัมน์ ได้มีการหาค่าการคงไว้จากตัวถูกละลายและแก๊สตัวพาเพื่อใช้ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ ในงานวิจัยนี้ได้มีการหาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ของอัลเคน(Alkane), อัลคีน(Alk-1-enes), อัลไคน์(Alk-1-ynes) ไซโคลอัลเคน(Cycloalkanes), อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน(Aromatic hydrocarbon) คาร์บอนเตตระคลอไรด์(Carbon tetrachloride) และเมทานอล(Methanol) ในไอออนิก ลิควิด ที่อุณหภูมิ 298.15, 303.15 และ 308.15 K ซึ่งงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ทำมาก่อนหน้านี้ แต่ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ใช้ไอออนิก ลิควิด 4 ชนิด ได้แก่ 1-เมทิล-3-ออกทิลอิมมิดาโซเลียม คลอไรด์(1-methyl-3-octylimidazolium chloride), 1-เฮกซิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตระฟูออโรบอเรท(1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluorborate), 1-เฮกซิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เฮกซะฟูออโรฟอสเฟต(1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate) และ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิ-ดาโซเลียมบิสไตรฟูออโรเมทิลซัลโฟนิลอิมไมด์[1-ethyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromet- hylsulfonyl)imide] ผลที่ได้ถูกใช้ในการทำนายศักยภาพของตัวทำละลายสำหรับการแยกเฮกเซน(Hexane)และเบนซีน(Benzene)จากค่าจำเพาะที่คำนวณได้ ค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้จากระบบอื่น เพื่อให้เข้าใจถึงอิทธิพลของไอออนบวกและไอออนลบที่มีต่ออันตรกิริยาของตัวทำละลายและตัวถูกละลาย ค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้จากอุณหภูมิต่างๆถูกใช้ในการคำนวณค่าmolar excess enthalpies ที่ความเจือจางอนันต์ ($\Delta H_1^{E\infty}$)

2. Fabrice Mutelet และคณะ [11] ได้หาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ของสารประกอบอินทรีย์ 29 ชนิด ในไอออนิก ลิควิด ที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง 2 ชนิด โดยใช้เทคนิคอินเวิร์สแก๊สโครมาโทกราฟี(Inverse gas chromatography) โดยวัดที่อุณหภูมิ 323.15 และ 343.15 K จากผลการทดลองพบว่าตัวถูกละลายส่วนใหญ่ถูกคงไว้โดยการแบ่งส่วน(Partition)และมีส่วนน้อยที่เกิดการดูดซับ(Adsorption)บน 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต และ นอร์มอล อัลเคนถูกคงไว้โดยการดูดซับบน 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมโทซิลเลท

3. Zsombor Miskolczy และคณะ [12] ได้ศึกษาคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิดที่ประกอบด้วย นอร์มอล ออกทิล ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้าและค่าความขุ่น จากการทดลองพบว่า 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ประพฤติตัวเป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.031 M ส่วน 1-เมทิล-3-ออกทิลอิม-มิดาโซเลียม คลอไรด์ ให้สารละลายที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ แต่จะสามารถละลายน้ำได้มากขึ้นเมื่อเติมโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) มากกว่า 2 เท่า เนื่องจากมีการสร้างไมเซลล์แบบผสมขึ้น ไอออนิก ลิควิดที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 mM สามารถลดความมีขั้วของส่วนหางของไมเซลล์ของโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟตได้

4. A. Vicent Orchilles และคณะ [13] ได้วัดค่าความหนาแน่นของสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและ 1-โพรพานอล ที่อุณหภูมิระหว่าง 278.15 จนถึง 328.15 K จากค่าความหนาแน่นที่หาได้ถูกใช้ในการคำนวณหาค่า molar volumes (V_ϕ) และค่า molar volume ที่ความเจือจางอนันต์ (V_ϕ^0) จากการทดลองพบว่าค่า V_ϕ^0 ของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ในน้ำมีค่าสูงกว่าใน 1-โพรพานอล และจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แต่ในทางกลับกันค่า V_ϕ^0 ของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ใน 1-โพรพานอล ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

5. Enrique G. Yanes และคณะ [14] ได้นำ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท มาเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลท์ในการแยกสารประกอบโพลีฟีนอลจากสารสกัดจากเมล็ดองุ่นโดยใช้เทคนิคแคปปิลลารี อีเล็คโทรโฟรีซิส ซึ่งกลไกการแยกนั้นเกี่ยวกับอิมมิดาโซเลียมแคทไอออนและโพลีฟีนอล

บทที่3
วิธีดำเนินการวิจัย
(Material&Method)

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) > 99.0%(w/w),A.R.grade ของบริษัท Analytical Science (LAB-SCAN)

2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) 37% (w/v),A.R. grade ของบริษัท Analytical Science(LAB-SCAN)

3. เมทานอล (Methanol,CH_3OH) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific

4. อะซิโตรไนไทล์ (Acetronitrile, CH_3CN) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific

5. กรดฟอสฟอริค (Phosphoric acid, H_3PO_4) A.R. grade ของบริษัท Analytical Science(LAB-SCAN)

6. ไนโตรฟูราโซน 99.0%ของบริษัท Sigma

7. ฟูราโซลิโดน 99.0%ของบริษัท Sigma

8. ไนโตรฟูราโตอิน 99.22% ของบริษัท Sigma

9. คลอแรมฟีนิคอล ของบริษัท Sigma

10. 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตระฟูโอโรบอเรท (1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate) ของบริษัท sigma

11. 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตระฟูโอโรบอเรท (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate) ของบริษัท sigma

12. น้ำปราศจากไอออน(Deionized water)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1.เครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูงแบบเซมิไมโคร(Semi-micro High Performance Liquid Chromatograph; Semi-micro HPLC) บริษัท Shimatsu

2.เครื่อง pH meter , บริษัท Danver Instrument Model 215

3.เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP2103 บริษัท Scientific Promotion

4.เครื่อง Fisher Stirring Hotplate บริษัท Fisher Scientific

5.ครกบด

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย การวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาหาชนิดของของเหลวไอออนิคและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารเติมแต่งเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารละลายมาตรฐาน ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟีนิคอล โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบ เซมิไมโคร ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ ชนิดของของเหลวไอออนิค ความเข้มข้นของสารละลายของเหลวไอออนิค ค่าความเป็นกรดเบส(pH) ของเฟสเคลื่อนที่

นำของเหลวไอออนิค 2 ชนิด มาเตรียมเป็นสารละลายด้วยการใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย โดยกำหนดให้ความเข้มข้น ค่าpH เป็นค่าและชนิดเดียวกัน ตามลำดับ นำสารละลายของเหลวไอออนิคชนิดต่างๆที่เตรียมขึ้นกรองภายใต้ระบบสูญญากาศผ่านกระดาษกรองไนลอนที่มีความละเอียด 0.22 μm จากนั้นนำมาไล่อากาศโดยใช้เครื่องอัลทราโซนิค(Ultrasonic bath) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค semi-micro HPLC โดยใช้ ODS คอลัมน์ (ขนาด 100 mm x 2.1 mm i.d., 2.6 μm) และใช้ยูวีวิสิเบิลดีเทคเตอร์ วิเคราะห์ผลที่ได้ หลังจากนั้นปรับเปลี่ยนหาระดับความเข้มข้นของของเหลวไอออนิค ค่าpH ที่เหมาะสม ตามลำดับ ด้วยวิธีการทดลองเดียวกันวิเคราะห์ผลที่ได้

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาหาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐาน ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟีนิคอล

เมื่อได้ชนิดและสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายของเหลวไอออนิคซึ่งใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่แล้ว ทำการหาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐาน ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟีนิคอล โดยการหาค่าต่างๆดังต่อไปนี้

1. แฟกเตอร์ความจุ(Capacity factor , k')

2. จำนวนเพลทตามทฤษฎี(Number of theoretical plates of the column,N)

3. เทลลิ่งแฟกเตอร์ (Tailing factor,T)

4. ความจำเพาะเจาะจง(Separation factor)

5. ความสามารถในการแยก(Resolution,R_s)

6. R.S.D of peak area(n=6)

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

1. ความจำเพาะ(Selectivity)

นำสารละลายตัวอย่างและสารประกอบอื่นที่ไม่มีตัวยา(Placebo) ที่เตรียมที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันมาทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะในการทดลองเดียวกัน เปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้จากสารละลายตัวอย่างและPlacebo

2. ความสัมพันธ์เชิงเส้น(Linearity)

2.1 System linearity

นำสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟีนิคอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับความเข้มข้น มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง semi-micro HPLC โดยใช้สารละลายของเหลวไอออนิคที่สภาวะที่เหมาะสม เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำการวัดสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของสัญญาณ ที่อ่านได้ที่แต่ละระดับความเข้มข้น พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น(แกนX)และสัญญาณที่อ่านได้(แกนY) จากกราฟที่พลอตระหว่างค่าสัญญาณที่อ่านได้กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน(อย่างน้อย 6 จุดรวมแบลงค์) นำมาคำนวณหาสมการเส้นถดถอย(Regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด(The method of least squares) ทั้งนี้ค่าความชัน(Slope)ของสมการเส้นถดถอย ค่าสัมประสิทธ์ของการตัดสินใจ(Regression Coefficient, R^2) และจุดตัดแกนY สามารถนำมาเป็นเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง ผลของความเป็นเส้นตรงที่ดีจะได้กราฟเส้นตรงโดยมีค่าความชัน=1 ค่า R^2 =1(โดยทั่วไปยอมรับค่า R^2 ที่ 0.999 ถึง 0.995) และค่าจุดตัดแกน y = 0

2.2 Method linearity

นำตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน(Spiked sample) 3 ระดับความเข้มข้นมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง semi-micro HPLC โดยใช้สารละลายของเหลวไอออนิคที่สภาวะที่เหมาะสมเป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำการวัดสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ นำค่าของสัญญาณที่อ่านได้ที่แต่ละระดับความเข้มข้นพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น(แกนX)และสัญญาณที่อ่านได้(แกนY) จากกราฟที่พลอตระหว่างสัญญาณที่อ่านได้กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน(อย่างน้อย 4 จุด รวมแบลงค์) นำมาคำนวณหาสมการเส้นถดถอย(Regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด(The method of least squares) ทั้งนี้ค่าความชัน(Slope)ของสมการเส้นถดถอย ค่าสัมประสิทธ์ของการตัดสินใจ(Regression Coefficient, R^2) และ จุดตัดแกน Y สามารถนำมาเป็นเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง โดยทั่วไปยอมรับ ค่า $R^2 > 0.99$

3. สภาพไว(Sensitivity)

3.1 ขีดจำกัดของการตรวจหา(Limit of Detection, LOD)

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ System linearity โดยใช้สูตร

$$y = y_B + 3s_B$$

เมื่อ y_B = จุดตัดแกน y (a) ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย

S_B = ค่า standard error of estimate,$s_{y/x}$

3.2 Limit of Quantitation, LOQ

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ System linearityโดยใช้สูตร

$$y = y_B + 10s_B$$

เมื่อ y_B = จุดตัดแกน y (a) ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย

S_B = ค่า standard error of estimate,$s_{y/x}$

เมื่อได้ค่า LOQ โดยประมาณมาแล้ว ให้เติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับเท่ากับ LOQ ลงใน Sample blank อย่างน้อย 7 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ คำนวณหา %Recovery และ %RSD ถ้าค่าที่ได้อยู่ใน

เกณฑ์ที่ยอมรับได้ ก็สามารถใช้ค่านั้น เป็น LOQ ของวิธี แต่ถ้าค่าที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ให้กำหนดค่าใหม่ที่สูงกว่าเดิม ทดสอบความแม่น(Accuracy) และความเที่ยง (Precision)จนกว่าจะได้

4. ความถูกต้อง(Accuracy)

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ Method linearity โดยใช้สูตร

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3}$$

C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง(Unfortified sample)

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

5. ความเที่ยง(Precision)

ค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลทดสอบตัวอย่างที่ทำการทดสอบซ้ำหลายครั้ง โดยทั่วไปจะแสดงด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(% Relative Standard Deviation ; RSD) หรือสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน(Coefficient of Variation ;CV)

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

หมายเหตุ $\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ

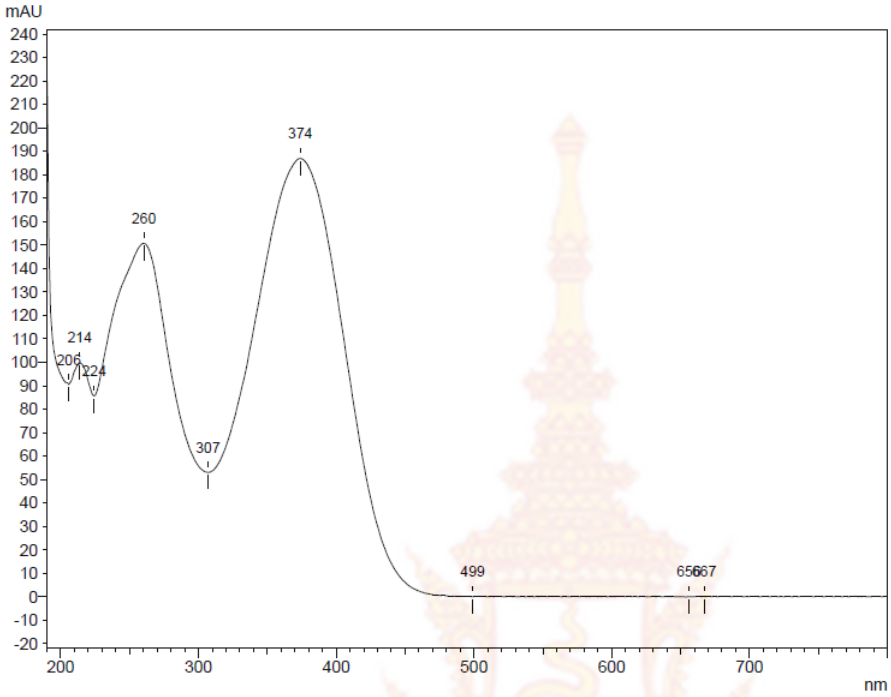
<u>ขั้นตอนที่ 4</u> สรุปผลการทดลองและรายงานผล

บทที่ 4
ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์
(Result&Discussion)

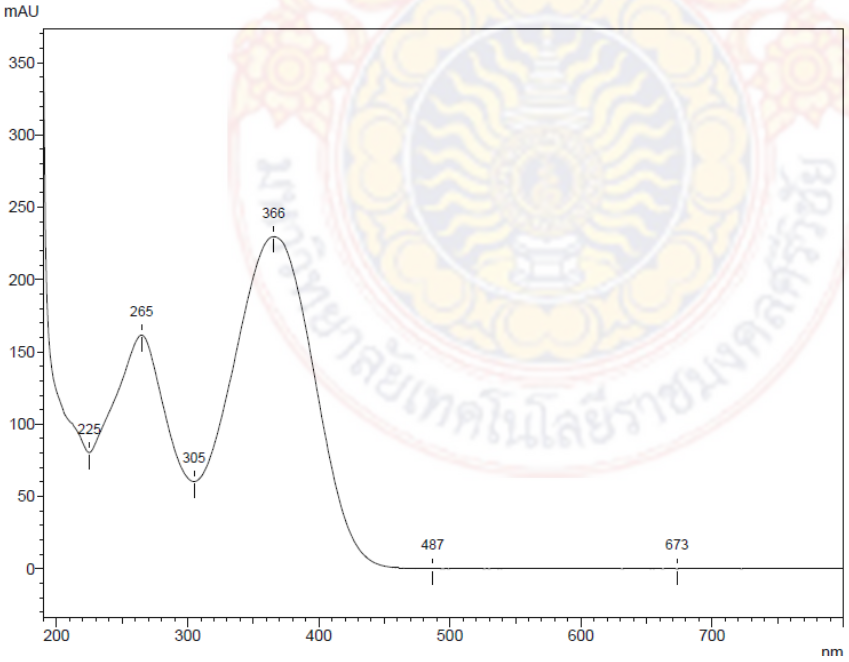
4.1 ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค Semicro-HPLC เพื่อแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟินิคอล ได้พร้อมกัน

4.1.1 ผลการศึกษาหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})

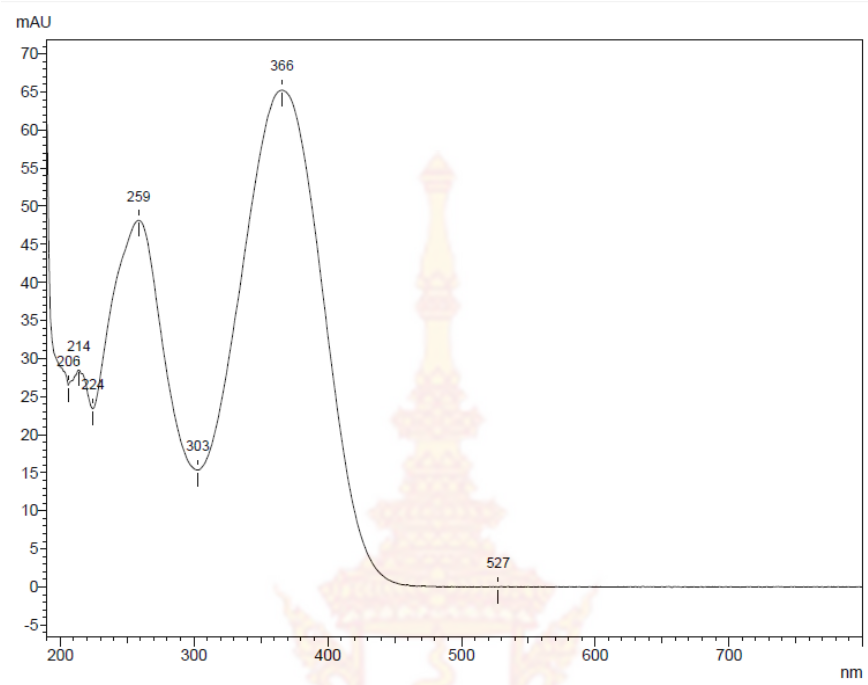
นำสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟินิคอล ที่มีความเข้มข้น 1 ppm มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Semimicro HPLC โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดเอเรย์ (PDA) ที่ความยาวคลื่น 190 nm - 800 nm และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Acetonitrile/ 1mM $EMIMBF_4$ ที่มีค่า pH เท่ากับ 3.0 ในอัตราส่วน 15/85 %(v/v) แสดงผลดังในรูปที่ 4.1 - 4.4



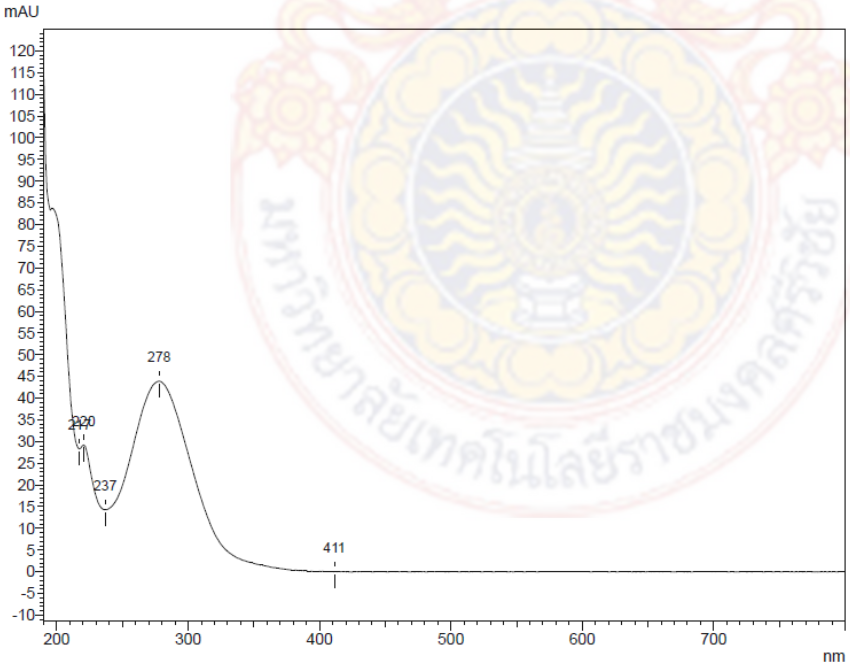
รูปที่ 4.1 สเปกตรัมของไนโตรฟูราโซน



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมของไนโตรฟูราโทอิน



รูปที่ 4.3 สเปกตรัมของฟูราโซลิโดน



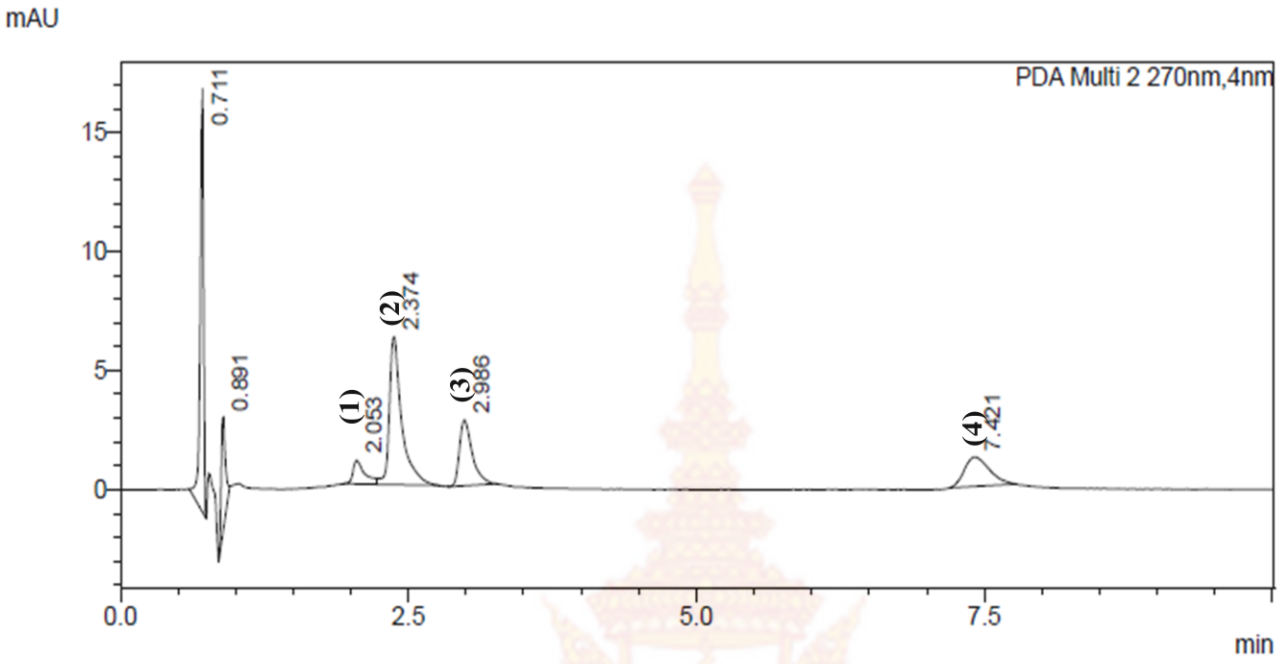
รูปที่ 4.4 สเปกตรัมของคลอแรมเฟนิคอล

จากค่าการดูดกลืนคลื่นแสงในสเปกตรัม รูปที่ 4.1 - 4.4 ไนโตรฟูราโซน มีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) 2 ค่า λ_{max1} = 260 nm และ λ_{max2} = 374 nm ไนโตรฟูราโตอิน มีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) 2 ค่า λ_{max1} = 265 nm และ λ_{max2} = 366 nm ฟูราโซลิโดน มีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) 2 ค่า λ_{max1} = 259 nm และ λ_{max2} = 366 nm คลอแรมเฟนิคอล มีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) λ_{max} = 278 nm เพราะฉะนั้นจึงเลือกตรวจวัดที่ความคลื่น 270 nm ตลอดทั้งการทดลอง

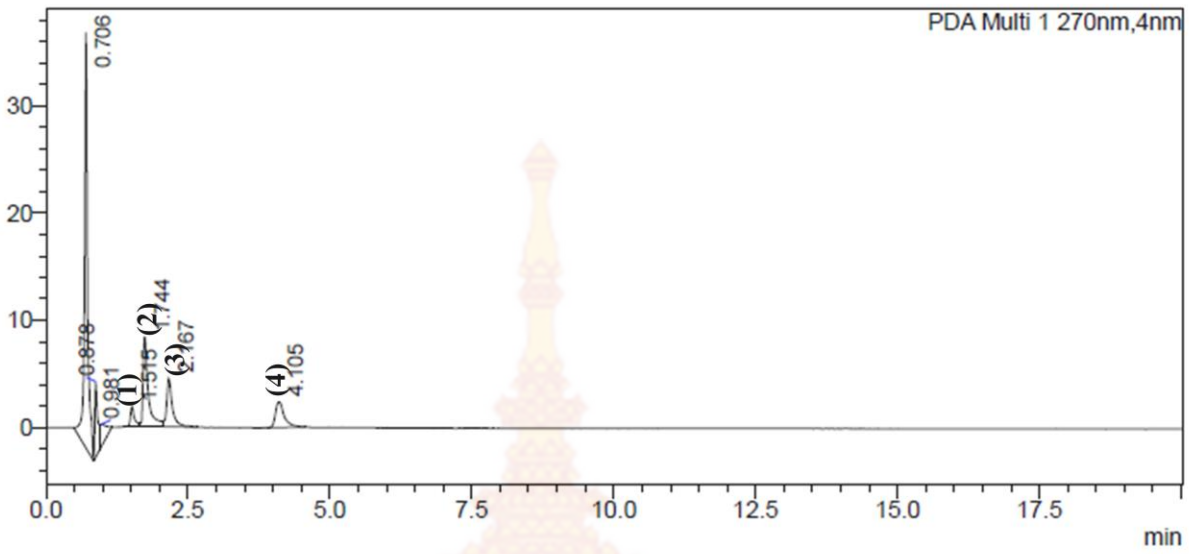
4.1.2 ผลการศึกษาปริมาณของ Acetonitrile ที่เหมาะสม ในการใช้เป็นตัวทำลายผสมในเฟสเคลื่อนที่

ปริมาณของ Acetonitrile ถูกศึกษา 2 ค่า ดังต่อไปนี้ 15 % (v/v) และ 20 % (v/v) ต่อ 85 % (v/v) น้ำปราศจากไอออนที่มีค่า pH เท่ากับ 3.0 (ซึ่งปรับค่าpHด้วย 10 %(w/v) HCl) และ 80 % (v/v) น้ำปราศจากไอออนที่มีค่า pH เท่ากับ 3.0 (ซึ่งปรับค่าpHด้วย 10 %(w/v) HCl) ตามลำดับ

สารที่ใช้ทดสอบ คือ สารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟินิคอล ที่มีความเข้มข้น 1 ppm มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Semi micro HPLC โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดเอเรย์ (PDA) ที่ความยาวคลื่น 270 nm



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟีนิคอล ที่มีความเข้มข้น 1 ppm เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 15 % (v/v) ต่อ 85 % (v/v) น้ำปราศจากไอออนที่มีค่า pH เท่ากับ 3.0 (ซึ่งปรับค่า pH ด้วย 10 %(w/v) HCl) Peak (1) = ไนโตรฟูราโซน (2) = ไนโตรฟูราโตอิน (3) = ฟูราโซลิโดน (4) = คลอแรมฟีนิคอล



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟินิคอล ที่มีความเข้มข้น 1 ppm เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น20 % (v/v) ต่อ 80 % (v/v) น้ำปราศจากไอออนที่มีค่า pH เท่ากับ 3.0 (ซึ่งปรับค่าpHด้วย 10 %(w/v) HCl) Peak (1) = ไนโตรฟูราโซน (2) = ไนโตรฟูราโตอิน (3) = ฟูราโซลิโดน (4) = คลอแรมฟินิคอล

จากโครมาโทแกรมในรูปที่ 4.5 - 4.6 พบว่าการใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 15 % (v/v) ต่อ 85 % (v/v) น้ำปราศจากไอออนที่มีค่า pH เท่ากับ 3.0 (ซึ่งปรับค่าpHด้วย 10 %(w/v) HCl) จะให้ค่าการแยกที่ดีกว่า และเพื่อต้องการใช้ปริมาณ Acetonitrile ให้น้อยที่สุด จึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยปริมาณ Acetonitrile เพียง 15 % (v/v)

4.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอออนิก

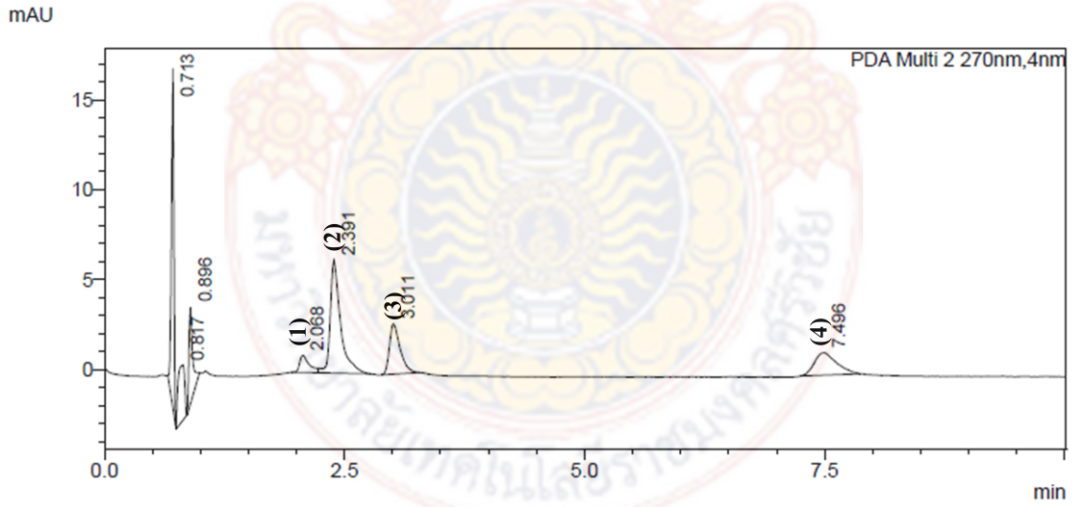
สารละลายไอออนิกที่นำมาศึกษามี 1 ชนิด คือ 1-เอทิล-3-เมทิล อิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท โดยนำเฟสเคลื่อนที่ 3 ชนิด ที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท ที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

1. 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 1 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท ที่มีค่า pH 3.0

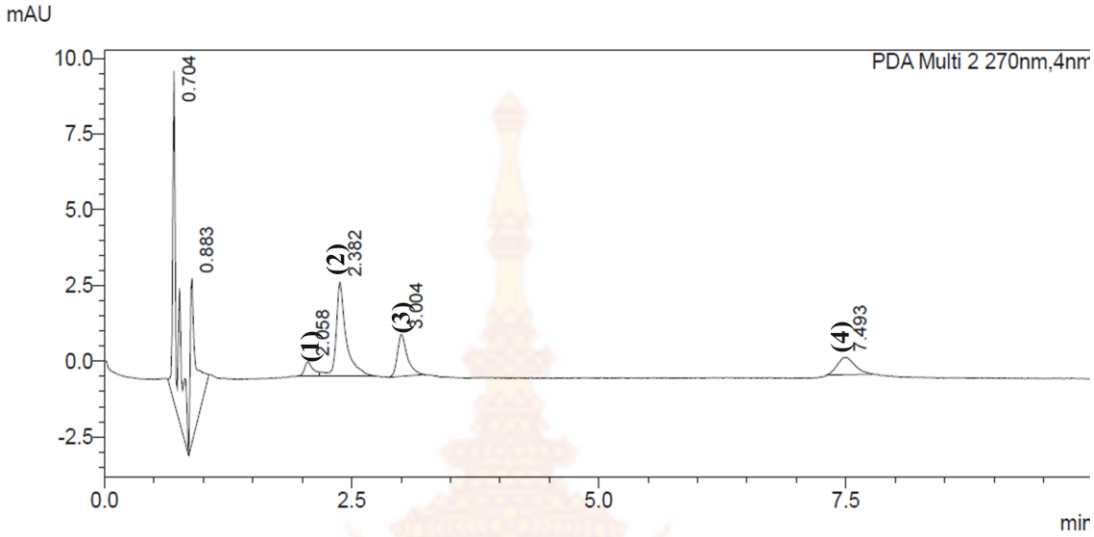
2. 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 2 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท ที่มีค่า pH 3.0

3. 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 4 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท ที่มีค่า pH 3.0

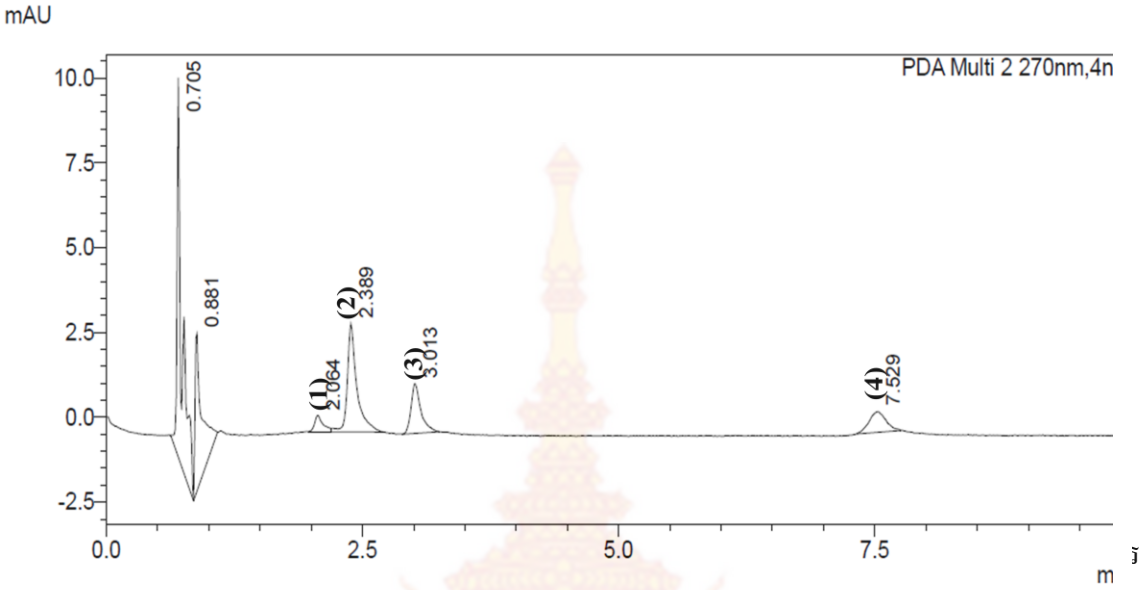
มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค semi-micro HPLC อัตราการไหลเท่ากับ 0.3 $mLmin^{-1}$ โดยใช้คอลัมน์ C_{18} ขนาด 100 x 2.1 mm. i.d.; 2.6 μm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 270 nm ปริมาตรสารละลายมาตรฐานที่ฉีด เท่ากับ 3 μL โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟีนิคอล ที่มีความเข้มข้น 1 ppm ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.7 - 4.9 ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟีนิคอล ที่มีความเข้มข้น 1 ppm เมื่อใช้ 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 1 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท ที่มีค่า pH 3.0
เป็นเฟสเคลื่อนที่ Peak (1) = ไนโตรฟูราโซน (2) = ไนโตรฟูราโตอิน (3) = ฟูราโซลิโดน (4) = คลอแรมฟีนิคอล



รูปที่ 4.8 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟีนิคอล ที่มีความเข้มข้น 1 ppm เมื่อใช้ 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 2 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท ที่มีค่า pH 3.0 เป็นเฟสเคลื่อนที่ Peak (1) = ไนโตรฟูราโซน (2) = ไนโตรฟูราโตอิน (3) = ฟูราโซลิโดน (4) = คลอแรมฟีนิคอล



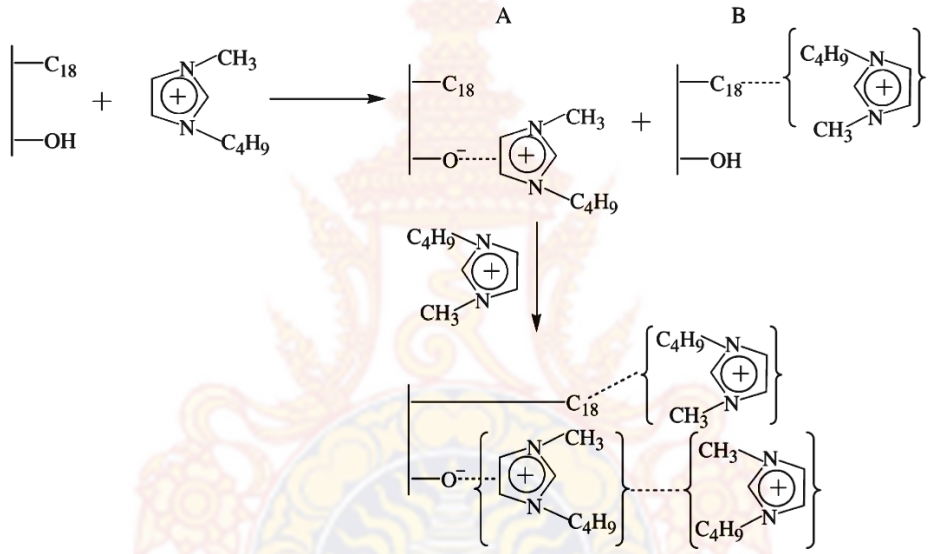
รูปที่ 4.9 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และ คลอแรมฟินิคอล ที่มีความเข้มข้น 1 ppm เมื่อใช้ 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 4 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท ที่มีค่า pH 3.0 เป็นเฟสเคลื่อนที่ Peak (1) = ไนโตรฟูราโซน (2) = ไนโตรฟูราโตอิน (3) = ฟูราโซลิโดน (4) = คลอแรมฟินิคอล

จากรูปที่ 4.7 - 4.9 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมเตตราฟูออโรบอเรท เป็น 1, 2 และ 4 mM ค่าแฟกเตอร์ความจุของสารผสมทั้ง 4 ชนิด ค่อยๆลดลง และคงที่ที่ความเข้มข้น 4 mM

เพราะฉะนั้นจึงเลือก 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 4 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท ที่มีค่า pH 3.0 เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

Yanes และคณะ [7] อธิบายว่า หมู่อิมมิดาโซเลียม(Imidazolium group) ที่มีประจุเป็นบวกจะไม่อยู่เฉพาะในสารละลาย(bulk solution) เท่านั้น แต่มันถูกเคลือบบนผนังแคปปิลลารีเมื่อไอออนิกลิควิดถูกใช้เป็นตัวเติมในสารละลายอิเล็กโตรไลต์(Electrolytes additive) ในเทคนิคแคปปิลลารี อิเล็คโทรโฟริซิส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เมื่อไอออนิกลิควิดถูกใช้เป็นตัวเติมในเฟสเคลื่อนที่(Mobile phase additive) ในเทคนิค HPLC มันจะอยู่ทั้งในสารละลายและถูกเคลือบบน C_{18} คอลัมน์ด้วยเช่นกัน

อิมมิดาโซเลียมแคทไอออน(Imidazolium cation) สามารถเกิดอันตรกริยากับหมู่ไซลา-นอล (Silanol group) บนผิวอัลคิลซิลิกา(Alkylsilica surface) ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ดังนั้นมันสามารถป้องกันหมู่ไซลานอลที่เหลือในคอลัมน์(Residual silanol) ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปรับปรุงรูปร่างของพีก พร้อมกับลดเวลาการคงไว้(Retention time)ของสารที่เราสนใจจะวิเคราะห์ได้อีกด้วย



รูปที่ 4.10 แสดงอันตรกริยาของอิมมิดาโซเลียมแคทไอออนในคอลัมน์ C_{18} [1]

ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมเตราฟลูออโรบอเรท จะทำให้เวลาการคงไว้ของ ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมเฟนิคอล ลดลง ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการที่ฟูราโซลิโดน มีเวลาการคงไว้เพิ่มขึ้นในตอนแรก เนื่องจากเมื่อเริ่มเพิ่มความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมเตราฟลูออโรบอเรท ทำให้อิมมิดาโซเลียมแคทไอออนเกิดอันตรกิริยากับหมู่ไซลานอลบนผิวอัลคิลซิลิกาแบบไฟฟ้าสถิตย์(Electrostatic interaction;A ในรูปที่ 4.10) หรือด้วยหมู่อัลคิลของอิมมิดาโซเลียมแคทไอออนโดยเกิดอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิค (Hydrophobic interaction;Bในรูปที่ 4.10) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณคาร์บอนบนเฟสอยู่กับที่ทำให้เวลาการคงไว้ของฟูราโซลิโดน เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมเตราฟู

ออโรบอเรท ขึ้นเรื่อยๆ อิมมิดาโซเลียมแคทไอออนจะเกิดอันตรกิริยาแบบ A และผลิตโครงสร้างอิเล็กโทรนิกแบบสองชั้น(Bilayer electronic structure) แบบอ่อนๆที่ขับไล่สารที่เราสนใจจะวิเคราะห์ที่มีสมบัติเป็นเบส พร้อมกับเกิดอันตร-กิริยาแบบ B ด้วย(แต่เกิดแบบ A ได้ดีกว่า) ดังนั้นเวลาการคงไว้ของสารที่เราสนใจจะวิเคราะห์จึงลดลงภายใต้อันตรกิริยาแบบขับไล่(Repulsive interaction) และอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิค(Hydrophobic interaction)

จากการศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารละลายมาตรฐาน ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมเฟนิคอล โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ

1.ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกที่เหมาะสม คือ 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 4 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท

2.ความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่เหมาะสมเท่ากับ 270 nm

3.ค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเท่ากับ 3.0

4.อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเท่ากับ 0.3 $mLmin^{-1}$

5.ปริมาตรของสารที่ฉีด เท่ากับ 3 μL

4.2.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมเฟนิคอล

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง คือ คอลัมน์ C_{18} 100 x 2.1 mm. i.d.; 2.6 μm เฟสเคลื่อนที่ คือ 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 4 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท pH 3.0, อัตราการไหลเท่ากับ 0.3 $mLmin^{-1}$, ปริมาตรสารที่ฉีด 3 μL ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 270 nm และสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมเฟนิคอล ซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 1 ppm แสดงผลดังในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูราโตอิน ฟูราโซลิโดน และคลอแรมเฟนิคอล ซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 1 ppm

พารามิเตอร์	ไนโตรฟูราโซน	ไนโตรฟูราโตอิน	ฟูราโซลิโดน	คลอแรมเฟนิคอล
k'	1.929	2.390	3.276	9.683
N	3085	3438	4426	8735
Tailing factor	1.201	1.748	1.543	1.069
α	2.145	3.109	1.974	6.594
R_s	6.226	2.083	3.630	17.940

ซึ่งเกณฑ์การยอมรับค่าของพารามิเตอร์ต่างๆมีดังต่อไปนี้

1. ค่าแฟกเตอร์ความจุ ในกรณีที่ระบบการชะเป็นแบบไอโซเครติกค่าแฟกเตอร์ความจุควรมีค่าอยู่ในช่วง $1 \leq k' \leq 10$

2. ค่าจำนวนเพลท(N) ควรมีค่า $>$ 2000

3. ค่าเทลลิ่งแฟคเตอร์(T) ควรมีค่า $<$ 2

4. ค่าซีเลคติวิตี้(Selectivity; α) ควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.5 – 4.0

5. ค่าความสามารถในการแยก(R_s) ควรมีค่า $\geq$ 1

4.2.3 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2 มาใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สามารถสรุปผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังตาราง ที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

พารามิเตอร์		ไนโตรเตรนไหม	ฟลูราไซมีทาน	ไนโตรเตรนอิตา	คอลเมทริมีทาน
System linearity	intercept	0	0	0	0
	slope	126.2 ± 42.65	213.4 ± 21.45	325.3 ± 97.2	258.3 ± 61.3
	R^2	0.995	0.996	0.995	0.997
	Range(μg/mL)	1-50	1-50	1-50	1-50
Method linearity	intercept	0	0	0	0
	slope	146.2 ± 0	237.1 ± 0	318.3 ± 0	278.2 ± 0
	R^2	0.991	0.993	0.992	0.990
	Range(μg/ml)	1-50	1-50	1-50	1-50
LOD		0.51 ppm	0.31 ppm	0.38 ppm	0.36 ppm
LOQ		1.01 ppm	1.21 ppm	1.01 ppm	1.00 ppm

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (ต่อ)

พารามิเตอร์		ไนโตรฟูราโซน	ฟูราโซลิโดน	ไนโตรฟูราโดอิน	คลอแรมเฟนิคอล
Accuracy	% Recovery	98.11±1.10 (1 ppm)	98.81±1.87 (1 ppm)	101.41±1.08 (1 ppm)	102.76±1.69 (1 ppm)
	% Recovery	97.23±1.37 (25 ppm)	99.42±1.81 (25 ppm)	98.94±1.85 (25 ppm)	99.32±1.23 (25 ppm)
	% Recovery	99.29±1.41 (50 ppm)	97.09±1.90 (50 ppm)	99.75±1.09 (50 ppm)	98.22±1.19 (50 ppm)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ
(Conclusion & Recommendation)

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยพบว่า สามารถใช้ 15/85 % (v/v) Acetonitrile/ 4 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตราฟูออโรบอเรท เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค Semi-micro HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ ไนโตรฟูราโซน ฟูราโซลิโดน ไนโตรฟูราโตอิน และคลอแรมเฟนิคอล ได้พร้อมกัน หลักในการแยกสารคืออาศัยการแข่งขันระหว่างอิมมิดาโซเดียม แคทไอออน(Imidazolium cation) และหมู่ที่มีขั้ว(Polar group) ของสารที่ต้องการจะวิเคราะห์(Analytes) กับหมู่ไซลานอล(Silanol group) บนผิวอัลคิลซิลิกา (Alkylsilica surface) ทำให้เกิดการแยกขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยพบว่าการใช้สารละลายไอออนิกเป็นเฟสเคลื่อนที่นั้นให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ โดยสภาวะที่ใช้คือ อัตราการไหล 0.3 ml/min; ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 270 nm; คอลัมน์ชนิด C_{18} ขนาด 100 mm. x 2.1 mm. โดยที่การวิเคราะห์ไนโตรฟูราโซน มี % recovery อยู่ในช่วง 97.23 – 99.29% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(1, 25 และ 50 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 0.51 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 1.01 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm (R^2 = 0.995) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm(R^2 = 0.991) ไนโตรฟูราโตอิน มี % recovery อยู่ในช่วง 98.94 – 101.41% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(1, 25 และ 50 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 0.38 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ (Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 1.01 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 1 – 50(R^2 = 0.995) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm(R^2 = 0.992) ฟูราโซลิโดน มี % recovery อยู่ในช่วง 97.09 – 99.42% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(1, 25 และ 50 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 0.31 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 1.21 ppm

มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 1 – 50(R^2 = 0.996) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm(R^2 = 0.993) คลอแรมเฟนิคอล มี % recovery อยู่ในช่วง 98.22 – 102.76% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(1,25 และ 50 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 0.36 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 1.00 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm (R^2 = .997) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 1 – 50 ppm (R^2 = 0.990) การใช้สารละลายไอออนิกเป็นเฟสเคลื่อนที่นั้นยังเป็นการลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ ซึ่งโดยทั่วไปการวิเคราะห์ตัวยากลุ่มนี้จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC นอกจากนี้แล้ววิธีการวิเคราะห์ที่ถูกพัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้เป็นการใช้ระบบการชะแบบไอโซเครติกซึ่งง่ายในการปฏิบัติงานอีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยที่พัฒนาขึ้นนี้นับเป็นครั้งแรกที่มีการใช้สารละลายไอออนิกเป็นเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ตัวยาดังกล่าวข้างต้น ควรจะมีการหาสารละลายไอออนิกชนิดใหม่มาใช้แทนหรืออาจจะใช้สภาวะที่ใช้ในการวิจัยนี้กับการวิเคราะห์ตัวยาอื่นแทน

เอกสารอ้างอิง

(References)

[1] http://www.thairath.co.th/column/life/fromfood/191475

[2] สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2556

[3] http://www.acfs.go.th

[4] Robert Ricker, USP Method for HPLC Analysis of Nitrofurantoin, Agilent technologies

[5] Wen-Hui Yu, Tzong-Shean Chin, Hong-Thih Lai, Detection of nitrofurans and their metabolites in pond water and sediments by liquid chromatography (LC)-photodiode array detection and LC-ion spray tandem mass spectrometry, International Biodeterioration & Biodegradation(2013),1-10

[6] Vytautas Tamošiūnas,Julijonas Petraitis and Audrius Padarauskas, Chloramphenicol determination in milk by liquid chromatography – tandem mass spectrometry, CHEMIJA. 2006. Vol. 17. No. 2–3. P. 25–29

[7] Hao-Yu Shen, Hai-Liang Jiang, Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC–UVD, GC–ECD, GC–MS–EI–SIM and GCMS–NCI–SIM methods, Analytica Chimica Acta 535 (2005) 33–41

[8] Lijun He, Wenzhu Zhang, Liang Zhao, Xia Liu, Shengxiang Jiang., Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of Ephrines by liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1007(2003)39-45.

[9] Martyn J. Earle and Kenneth R. Seddon, Ionic liquids. Green solvents for the future, Pure Appl. Chem., 2000, Vol. 72, No. 7, pp. 1391-1398.

[10] Trevor M. Letcher, Urszula Domanska, Malgorzata Marciniak, Andrzej Marciniak, " Activity coefficients at infinite dilution measurements for organic solutes in the ionic liquid

1-butyl-3-methyl-imidazolium 2-(2-methoxyethoxy) ethyl sulfate using g.l.c. at T = (298.15, 303.15, and 308.15) K," J. Chem. Thermodynamics 37 (2005) 587– 593

[11] Fabrice Mutelet, Jean-Noel Jaubert, "Accurate measurements of thermodynamic properties of solutes in ionic liquids using inverse gas chromatography," Journal of Chromatography A, 1102 (2006) 256–267

[12] Zsombor Miskolczy, Krisztina Sebok-Nagy, Laszlo Biczok, Sinem Gokturk, "Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution," Chemical Physics Letters 400 (2004) 296–300

[13]A. Vicent Orchilles, Vicenta Gonzalez-Alfaro, Pablo J. Miguel,Ernesto Vercher, Antoni Martinez-Andreu, "Volumetric properties of binary mixtures of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium octylsulfate with water or propanol in the temperature range of 278.15 K to 328.15 K," J. Chem. Thermodynamics 38 (2006) 1124–1129

[14] Enrique G. Yanes, Samuel R. Gratz, Michael J. Baldwin, Sara E. Robison, and Apryll M. Stalcup, " Capillary Electrophoretic Application of 1-Alkyl-3-methylimidazolium- Based Ionic Liquids," Anal. Chem.(2001)73 3838-3844