

รายงานการวิจัย  
เรื่อง

การใช้ประโยชน์ของเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งร่วมกับเทคนิคฟลูออโรเมตรี  
ในการศึกษาการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ

Application of Solid Phase Extraction Coupled with Fluorometry  
in Photodegradation Study of Estrogen in Water

RCH  
QP  
542  
.F85  
Q866A

โดย  
ผศ.ดร. อูสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....  
สาระเลขหมาย..... 79654  
วัน,เดือน,ปี..... 10 มิ.ย. 2551

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยจากโครงการทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

119 002656  
b.....  
i.....

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าว ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดโครงการวิจัยนี้ จนได้จัดเป็นรูปเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์ของงานวิจัยนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการสลายตัวด้วยแสงหรือโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนสามชนิด ได้แก่ เอสโตรเจน (E1), 17 $\beta$ -เอสตราไดออล (E2) และเอสโตรรอล (E3) ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอสโตรเจนที่เหลือภายหลังจากการสลายตัวด้วยแสงโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง หรือ SPE ร่วมกับเทคนิคฟลูออโรเมทรี ทำการประเมินความสามารถของวัสดุดูดซับสองชนิดที่บรรจุใน SPE cartridge ได้แก่ Oasis HLB และ Bond Elut C18 ในการสกัดเอสโตรเจนในน้ำ จากการศึกษาพบว่าร้อยละการกลับคืนของเอสโตรเจนที่สกัดด้วยวัสดุดูดซับทั้งสองชนิดมีค่าสูงกว่าร้อยละ 95 ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ Bond Elut C18 ซึ่งมีราคาขายต่ำกว่า Oasis HLB เป็นวัสดุในการสกัดเอสโตรเจนในน้ำ สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์เอสโตรเจนด้วยสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์เป็นดังนี้คือ: ใช้ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงที่ 275, 284 และ 277 นาโนเมตร และความยาวคลื่นในการคายแสงที่ 303, 304 และ 306 นาโนเมตร สำหรับเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรรอล ตามลำดับ เตรียมสารละลายเอสโตรเจนโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ชีตจำกัดในการวิเคราะห์สำหรับวิธีการนี้อยู่ที่  $0.040 \pm 0.007$  มิลลิกรัมต่อลิตร  $0.032 \pm 0.006$  มิลลิกรัมต่อลิตร และ  $0.033 \pm 0.006$  มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรรอล ตามลำดับ ผลจากการศึกษาการสลายตัวด้วยแสงของเอสโตรเจน พบว่าเอสโตรเจนสามารถเกิดการสลายตัวเมื่อได้รับแสงจากหลอดยูวี อัตราการสลายตัวด้วยแสงมีค่าสูงขึ้นเมื่อใช้ความเข้มของแสงมากขึ้น ปฏิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำเกิดขึ้นน้อยสุดเมื่อสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 3 ปฏิริยาการสลายตัวเกิดขึ้นเมื่อพีเอชของสารละลายมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 7 และ 10 อัตราการสลายตัวของเอสโตรเจนมีมากขึ้นเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิของสารละลาย ปฏิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ ณ สภาวะที่ศึกษาจัดเป็นปฏิริยาอันดับหนึ่งเทียม (Pseudo First-order reaction) โดยมีค่าคงที่อัตราปฏิริยาการสลายตัวเท่ากับ  $0.0043 \text{ min}^{-1}$   $0.0029 \text{ min}^{-1}$  และ  $0.0028 \text{ min}^{-1}$  สำหรับเอสตราไดออล เอสโตรรอล และเอสโตรเจน ตามลำดับ

**คำสำคัญ :** ฟลูออโรเมทรี การสกัดด้วยเฟสของแข็ง เอสโตรเจน โฟโตไลซิส การสลายตัวด้วยแสง

## Abstract

Photolysis of three estrogens, estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) and etriol (E3), in aqueous solutions radiated by UV-light was studied. Remaining concentration of estrogens after photodegradation was determined using solid phase extraction (SPE) coupled with fluorometry technique. Two SPE sorbents-Oasis HLB and Bond Elut C18 were evaluated with regard to their ability to extract estrogens from water. Results showed that high recoveries (>95%) were obtained from both SPE sorbents. Bond Elut C18 which its price is cheaper than Oasis HLB was chosen for extraction of estrogen from water. Optimal analysis conditions using fluorescence spectrometer are as follows: using  $\lambda$  excitation at 275, 284, and 277 nm and  $\lambda$  emission at 303, 304, and 306 nm for E1, E2, and E3, respectively; using methanol as solvent in preparation of estrogen solution. Limit of detections for this method are at  $0.040 \pm 0.007$  mg/L,  $0.032 \pm 0.006$  mg/L, and  $0.033 \pm 0.006$  mg/L for E1, E2, and E3, respectively. The results from photodegradation study suggest that the photolysis of E1, E2, and E3 in aqueous solutions occurs under irradiation with UV disinfection lamp. The higher the light intensity, the higher photodegradation rate. Photolysis rate of estrogens in aqueous solution was lowest at pH 3.0. Photodegradation reate was greater when pH solution was at pH 7 and 10. Increasing temperature of solution results in greater photodegradation rate of estrogens. The photolysis reaction of E1, E2, and E3 under tested conditions were all in accordance with pseudo-first order rate law with rate constant of  $0.0043 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0029 \text{ min}^{-1}$  และ  $0.0028 \text{ min}^{-1}$  for E1, E2, and E3, respectively.

**Keywords:** Fluorometry, Solid Phase Extraction, Estrogen, Photolysis, Photodegradation

## สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย.....	ซ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
1.5 ทฤษฎี กรอบแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย.....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
<b>บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....</b>	<b>7</b>
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	7
2.2 การตรวจวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี.....	8
2.3 การศึกษาชนิดของ SPE Cartridge ที่เหมาะสมในการสกัดเอสโตรเจน.....	10
2.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนด้วยแสง.....	11
2.4.1 ผลของความเข้มของแสง.....	11
2.4.2 ผลของค่าพีเอชของสารละลาย.....	12
2.4.3 ผลของอุณหภูมิ.....	12
2.5 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจน.....	13
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....</b>	<b>14</b>
3.1 การตรวจวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี.....	14
3.1.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสง.....	14
3.1.2 ชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสม.....	16
3.1.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Liit of detection, LOD).....	18
3.1.4 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์.....	19
3.2 ผลของชนิด SPE Cartridge ต่อประสิทธิภาพในการสกัดเอสโตรเจนด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง.....	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3	ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิบัติการสลายตัวด้วยแสงของเอสโตรเจนในน้ำ.....	21
3.3.1	ผลของความเข้มของแสง.....	21
3.3.2	ผลของพีเอชของสารละลาย.....	22
3.3.3	ผลของอุณหภูมิของสารละลาย .....	23
3.4	จลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ .....	24
<b>บทที่ 4</b>	<b>สรุปและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>28</b>
4.1	สรุปผลการทดลอง.....	28
4.2	ข้อเสนอแนะ.....	29
<b>บรรณานุกรม.....</b>		<b>30</b>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1	ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสงของสารละลาย มาตรฐานเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรออล .....	16
ตารางที่ 3.2	ค่าเฉลี่ย และเบี่ยงเบนมาตรฐาน สารละลายแบบลงค์จากการวัดซ้ำ 20 ครั้ง.....	18
ตารางที่ 3.3	ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการประเมินความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์สารละลาย เอสโตรเจน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	19
ตารางที่ 3.4	ค่าคงที่ของอัตราปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อ ลิตรในน้ำ ณ อุณหภูมิ 60 °C .....	27



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

๕

รูปที่ 2.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction).....	11
รูปที่ 3.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและการคายแสงของสารละลายเอสโตรเจน (ก) เอสโตร รอน, E1 (ข) เอสตราไดออล, E2 และ (ค) เอสไทรออล, E3 .....	15
รูปที่ 3.2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและการคายแสงของสารละลายผสมระหว่างเอสโตรน (E1) เอสตราไดออล (E2) และเอสไทรออล (E3).....	16
รูปที่ 3.3 ความเข้มของการเปล่งแสงของสารละลายมาตรฐาน (ก) E1 (ข) E2 และ (ค) E3 ที่ระดับความเข้มข้น 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท (□) เมทานอล (◆) และน้ำกลั่น (Δ).....	17
รูปที่ 3.4 ร้อยละการกลับคืนของสารละลายเอสโตรเจนเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อ สกัดด้วย Bond Elut C18 (▧) Oasis HLB (■).....	20
รูปที่ 3.5 สัดส่วนความเข้มข้นที่เหลือต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของเอสโตรน (◆) เอสตราได ออล (■) และเอสไทรออล (▲) ในสารละลายภายหลังจากการฉายแสงยูวีที่ระดับ ความเข้มของแสงต่างกัน เป็นเวลา 500 นาที.....	21
รูปที่ 3.6 สัดส่วนความเข้มข้นที่เหลือต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของเอสโตรน (◆) เอสตราได ออล (■) และเอสไทรออล (▲) ในสารละลายที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ภายหลังจาก การฉายแสงยูวีที่ระดับความเข้ม 120 ลักซ์ เป็นเวลา 500 นาที.....	22
รูปที่ 3.7 สัดส่วนความเข้มข้นที่เหลือต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของเอสโตรน (◆) เอสตราได ออล (■) และเอสไทรออล (▲) ภายหลังจากการฉายแสงยูวีในสภาวะที่มีอุณหภูมิ แตกต่างกัน.....	23
รูปที่ 3.8 ความเข้มข้นที่เหลือของเอสโตรน (◆) เอสตราไดออล (■) และเอสไทรออล (▲) ใน สารละลาย pH 10 และควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการ ฉายแสงยูวี 120 ลักซ์ เป็นเวลา 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 และ 500 นาที.....	25
รูปที่ 3.9 กราฟสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเอสโตรเจน ที่เป็นฟังก์ชันกับเวลา (ก) เอสโตรน, ◆ (ข) เอสตราไดออล, ■ และ (ค) เอสไทร ออล, ▲ ในสารละลาย pH 10 และควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ภายหลัง จากการฉายแสงยูวี 120 ลักซ์ เป็นเวลา 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 และ 500 นาที.....	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

E1	เอสโตรน
E2	เอสตราไดออล
E3	เอสโตรออล
LOD	ขีดจำกัดของการวิเคราะห์
pH	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
$\lambda$ excitation	ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง
$\lambda$ emission	ความยาวคลื่นในการคายแสง
$\overline{Y}_B$	ค่าเฉลี่ย
$S_B$	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
% RSD	ร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
$C_0$	ความเข้มข้นเริ่มต้นของเอสโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$C_t$	ความเข้มข้นของเอสโตรเจน ณ เวลา t (มิลลิกรัมต่อลิตร)
t	เวลา (นาที)
min.	นาที
SPE	การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เอสโตรเจน (estrogens) เป็นชื่อเรียกกลุ่มของสารเคมีจำพวกฮอร์โมนเพศหญิงโดยรวม สารในกลุ่มนี้จัดเป็นสารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยชนิดของเอสโตรเจนที่มีบทบาทสำคัญในสิ่งแวดล้อมมีอยู่สามชนิดได้แก่ เอสโตรน (Estrone, E1), 17 $\beta$ -เอสตราไดออล (17 $\beta$ -Estradiol, E2) และเอสโตรออล (Estriol, E3) เอสโตรเจนจัดเป็นมลพิษทางน้ำกลุ่มหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในช่วงหลายปีที่ผ่านมา เนื่องจากสารกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มของสารเคมีที่รบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine Disrupting Compounds, EDCs) โดยมีการรายงานว่า การปนเปื้อนของเอสโตรเจนในแหล่งน้ำเป็นสาเหตุที่ทำให้ลักษณะทางเพศของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำเปลี่ยนแปลงไป เช่น ทำให้ปลาเพศผู้มีลักษณะความเป็นเพศเมียมากขึ้น (Routledge et al., 1998; Belfroid et al., 1999; Metcalfe et al., 2001)

คณะวิจัยหลายคณะได้รายงานระดับการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำทิ้งจากบ้านเรือนและชุมชน Maelle et al. (2004) ตรวจพบการปนเปื้อนของสารเอสโตรเจนในแม่น้ำ Seine ของเมืองปารีส ประเทศฝรั่งเศส โดยพบการปนเปื้อนของ E1, E2 และ E3 ในระดับปริมาณตั้งแต่ 2.7 ถึง 17.6 นาโนกรัมต่อลิตร Kolodziej et al. (2003) ตรวจพบการปนเปื้อนของ E1 และ E2 ในน้ำทิ้งที่ผ่านกระบวนการบำบัด โดยมีปริมาณสูงสุดที่วัดได้เท่ากับ 4 และ 12 นาโนกรัมต่อลิตรตามลำดับ แหล่งที่มาสำคัญของเอสโตรเจนในน้ำเสียจากบ้านเรือนและชุมชนได้มาจากการขับถ่ายของเอสโตรเจนจากร่างกายของสิ่งมีชีวิตทางปัสสาวะในรูปของสารประกอบพวกกลูคูโรไนด์และซัลเฟต (Adlercreutz et al., 1986) ถึงแม้เอสโตรเจนจะถูกขับออกจากร่างกายมนุษย์ในรูปสารประกอบกลูคูโรไนด์และซัลเฟต แต่พบว่าเอสโตรเจนในรูปแบบดังกล่าวมีความเสถียรต่ำ ทำให้การเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นเอสโตรเจนอิสระสามารถเกิดขึ้นได้ ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในแหล่งน้ำธรรมชาติ (Belfroid et al., 1999; Isobe et al., 2003) นอกจากนี้กระบวนการบำบัดน้ำเสียในปัจจุบันไม่สามารถบำบัดเอสโตรเจนได้ทั้งหมด ส่งผลให้น้ำทิ้งจากบ้านเรือนและชุมชนที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมยังคงมีปริมาณของเอสโตรเจนหลงเหลืออยู่ (Johnson et al., 2000; Korner et al., 2000) งานวิจัยที่ผ่านมาได้ตรวจพบการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในน้ำทิ้งที่ผ่านกระบวนการบำบัดแล้ว โดยมีระดับการปนเปื้อนตั้งแต่ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ได้ไปจนถึงความเข้มข้นที่มากกว่า 100 นาโนกรัมต่อลิตร (Desbrow et al., 1998) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการบำบัดเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในน้ำ เพื่อลด

ปริมาณการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในน้ำทิ้งที่ถูกปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ รวมทั้งลดผลกระทบของเอสโตรเจนต่อสิ่งแวดล้อม

กระบวนการสลายตัวด้วยแสงหรือโฟโตไลซิส (Photolysis) เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีการรายงานว่าทำให้ระดับการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในน้ำลดลง (Liu และ Liu, 2003; Coleman et al., 2004; Coleman et al., 2005) การสลายตัวด้วยแสงของ E1 และ E2 เกิดขึ้นได้เมื่อสารละลายได้รับแสง UV ขณะที่ภายใต้แสง UV-Visible light ความเข้มข้น E1 ลดลงแต่ความเข้มข้นของ E2 ไม่เปลี่ยนแปลง (Liu และ Liu, 2003) อย่างไรก็ตามความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำยังมีอยู่ค่อนข้าง งานวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำด้วยแสง โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความเข้มของแสง พีเอช และอุณหภูมิ รวมทั้งทำการศึกษาลงผลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ นอกจากนี้ยังทำการศึกษการใช้ประโยชน์ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอสโตรเจนที่เปลี่ยนแปลงไปในน้ำด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction, SPE) ร่วมกับการวิเคราะห์เชิงฟลูออโรเมทรี

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการตรวจวิเคราะห์เอสโตรเจนในน้ำด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction, SPE) ร่วมกับการวิเคราะห์เชิงฟลูออโรเมทรี
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดเอสโตรเจนระหว่างวัสดุดูดซับประเภทที่บรรจุใน SPE cartridge
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ
4. ศึกษาผลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ

## 1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี โดยพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสงด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ ชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายเอสโตรเจนเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection) ของสารละลายเอสโตรเจน และความเที่ยงตรง (Precision) ของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงฟลูออโรเมทรี
2. ศึกษาชนิดของ SPE Cartridge ที่เหมาะสมในการสกัดเอสโตรเจนในน้ำด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE) โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ

SPE Cartridge ที่มีวัสดุดูดซับต่างประเภทกัน 2 ชนิดได้แก่ Bond Elut C18 และ Oasis HLB ในการสกัดเอสโตรเจนในน้ำ

3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ความเข้มของแสง พีเอชของสารละลาย และอุณหภูมิ
4. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ โดยการติดตามการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำในช่วงเวลาต่าง ๆ

#### 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้ได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร โดยการดำเนินการวิจัยแบ่งได้เป็น 5 ขั้นตอนดังนี้คือ

1. ศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี ทำได้โดยนำสารละลายเอสโตรเจนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนมาทำการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสงด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ จากนั้นทำการศึกษาชนิดตัวทำละลาย ซึ่งได้แก่ เอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำกลั่น เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจนด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ และทำการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection) ของสารละลายเอสโตรเจน และความเที่ยงตรง (Precision) ของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงฟลูออโรเมทรี
2. ศึกษาชนิดของ SPE Cartridge ที่เหมาะสมในการสกัดเอสโตรเจนด้วยเทคนิค SPE ทำได้โดยนำสารละลายเอสโตรเจนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนมาทำการสกัดด้วย SPE Cartridge ที่มีวัสดุดูดซับต่างประเภทกัน 2 ชนิดได้แก่ Bond Elut C18 และ Oasis HLB จากนั้นนำสารละลายเอสโตรเจนที่ผ่านการสกัดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงฟลูออโรเมทรี พร้อมทั้งเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสารละลายเอสโตรเจน
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ความเข้มของแสง พีเอชของสารละลาย และอุณหภูมิ โดยทำการทดลองแบบแบทช์ และแปรค่าปัจจัยที่ทำการศึกษา จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของสารละลายเอสโตรเจนที่เหลือโดยการสกัดเอสโตรเจนในน้ำด้วยเทคนิค SPE และวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เหลือด้วยเทคนิคเชิงฟลูออโรเมทรี

4. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ ทำได้โดยแปรค่าความเข้มข้นของสารละลายเอสโตรเจน ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอสโตรเจนในช่วงเวลาต่าง ๆ คือ 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 และ 500 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอสโตรเจนที่เหลือน้ำโดยการสกัดด้วยเทคนิค SPE และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงฟลูออโรเมทรี
5. ประมวลผลการทดลอง สรุปผลการวิจัย พร้อมเสนอแนะเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ

### 1.5 ทฤษฎี กรอบแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

เอสโตรเจนเป็นชื่อเรียกตระกูลของฮอร์โมนเพศหญิงโดยรวม สารในกลุ่มนี้จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เอสโตรเจนเป็นสารจำพวกสเตียรอยด์ที่สร้างขึ้นมาจากไขมันที่ชื่อว่า คอเลสเตอรอล โดยในร่างกายของผู้หญิงจะถูกสังเคราะห์ขึ้นที่รังไข่และต่อมหมวกไต ในขณะที่เอสโตรเจนถูกผลิตขึ้นในร่างกายของผู้ชายที่อัณฑะและต่อมหมวกไต ชนิดของเอสโตรเจนที่มีบทบาทในงานสิ่งแวดล้อมมีอยู่สามชนิดคือ เอสโตรน (Estrone, E1) 17-เบต้าเอสตราไดออล (17 $\beta$ -Estradiol, E2) และเอสโตรออล (Estriol, E3) ในแต่ละวันร่างกายของมนุษย์ขับถ่ายฮอร์โมนเหล่านี้ออกจากร่างกายทางปัสสาวะ ทำให้น้ำทิ้งที่มาจากบ้านเรือนและชุมชนเป็นแหล่งที่มาสำคัญของเอสโตรเจนที่พบในสิ่งแวดล้อม ระดับปริมาณของเอสโตรเจนในน้ำเสียและน้ำทิ้งจากบ้านเรือนและชุมชนมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง Detection limit ถึง 490 นาโนกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงพอที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้ งานวิจัยของ Metcalfe และคณะ(2001) ทำการศึกษาถึงผลกระทบของปริมาณของ E1 ต่อจำนวนเพศของปลา Japanese Medaka ซึ่งได้รับ E1 ตั้งแต่ที่ยังเป็นไข่ปลาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 100 วัน พบว่าปลา มีลักษณะสองเพศเมื่อได้รับ E1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อลิตร และเปลี่ยนเป็นเพศเมียทั้งหมดเมื่อความเข้มข้นของ E1 เพิ่มขึ้นเป็น 1,000 นาโนกรัมต่อลิตร Routledge และคณะ (1998) ทำการศึกษาติดตามถึงผลกระทบของน้ำทิ้งจากโรงงานบำบัดน้ำเสียจากบ้านเรือนและชุมชนต่อปลาที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่ได้รับน้ำทิ้ง พบว่าจำนวนประชากรของปลาโดยส่วนใหญ่เป็นปลาเพศเมีย ข้อมูลที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการบำบัดเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในน้ำ เพื่อลดผลกระทบของสารเหล่านี้ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำธรรมชาติ

Solid Phase Extraction (SPE) เป็นเทคนิคที่ปัจจุบันนิยมใช้กันมากในการเตรียมตัวอย่าง ก่อนนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการต่าง ๆ SPE เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อทดแทนการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Liquid-liquid Extraction (LLE) SPE มีหลักการแยกสารที่สนใจออกจากตัวอย่างคล้ายคลึงกับ LLE กล่าวคืออาศัยหลักการกระจายตัวของสารที่สนใจระหว่างตัวกลาง

สองชนิด (partition) เทคนิคทั้งสองนี้ต่างกันตรงที่ LLE เป็นการกระจายตัวของสารที่สนใจระหว่างของเหลวสองชนิด ในขณะที่ SPE อาศัยการกระจายตัวของสารที่สนใจระหว่างของเหลวกับของแข็ง ซึ่งก็คือวัสดุดูดซับ (sorbent) ที่บรรจุใน SPE cartridge โดยเทคนิค SPE มีข้อดีคือ ลดปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ใช้ระยะเวลาในการสกัดน้อยลง และลดจำนวนขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนในการสกัดสารด้วย SPE ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักคือ (1) การปรับสภาพคอลัมน์ (conditioning) เป็นการเตรียมวัสดุดูดซับที่บรรจุใน SPE cartridge ให้พร้อมรองรับตัวอย่าง (2) การใส่ตัวอย่าง (Loading) เป็นการป้อนตัวอย่างเข้าสู่ SPE cartridge เพื่อให้สารที่สนใจทำปฏิกิริยากับวัสดุดูดซับที่บรรจุใน SPE cartridge (3) การล้าง (Rinse) เป็นขั้นตอนการขจัดสารที่จับอยู่ที่ส่วนผิวของวัสดุดูดซับได้น้อยออกจากระบบ และ (4) การไล่สารที่สนใจ (Elution) เป็นการดึงสารที่สนใจที่เกาะกับวัสดุดูดซับ ออกจากคอลัมน์เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป ประสิทธิภาพในการสกัดสารที่สนใจขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของวัสดุดูดซับที่บรรจุใน SPE cartridge กับสารที่สนใจ โดยต้องมีความสามารถในการดูดติดสารที่สนใจได้ดี แต่ดูดซับสารรบกวนได้น้อย ระยะเวลาสัมผัสระหว่างวัสดุดูดซับที่บรรจุใน SPE cartridge กับสารที่สนใจ และปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการไล่สารที่สนใจออกจากคอลัมน์

กระบวนการโฟโตไลซิส (Photolysis Process) เป็นกระบวนการสลายตัวของสารที่สนใจด้วยแสง เกิดขึ้นเมื่ออะตอมหรือโมเลกุลของสารได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet) หรือแสงในช่วงที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า (Visible) ซึ่งทำให้เกิดการตกกระทบของโฟตอน (Photon) ที่ผิวหน้าอนุภาคโมเลกุลของสาร อะตอมหรือโมเลกุลดูดกลืนแสงเข้าไป ส่งผลให้อิเล็กตรอนจำนวนหนึ่งในสภาวะพื้น (ground state) ถูกกระตุ้นโดยโฟตอนให้ขึ้นไปอยู่ในชั้นระดับพลังงานที่สูงขึ้น หรือที่เรียกว่าสภาวะกระตุ้น (excited state) โมเลกุลของสารในสภาวะกระตุ้นสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ตัวอย่างเช่น การแตกตัว การจัดเรียงตัวระหว่างโมเลกุล การขจัดอะตอมของไฮโดรเจน หรือการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารอื่น เป็นต้น เพื่อเลื่อนระดับชั้นพลังงานกลับลงมายังระดับพลังงานเดิมของสาร การเปลี่ยนแปลงทางเคมีดังกล่าวโดยส่วนใหญ่ก่อให้เกิดการสลายตัวของสาร (Schwarzenbach et al., 1993)

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของวัสดุดูดซับที่บรรจุใน SPE cartridge ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการสกัด เอสโตรเจนในน้ำตัวอย่าง
2. ทราบถึงวิธีการสกัดและวิเคราะห์เอสโตรเจนในน้ำด้วยเทคนิค SPE ร่วมกับการวิเคราะห์ ด้วยเชิงฟลูออโรเมทรี
3. ทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ
4. เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อกำจัดหรือลดปริมาณของเอสโตรเจนก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม
5. เป็นแนวทางในการนำไปใช้ในการติดตามระดับการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในแหล่งน้ำธรรมชาติ รวมทั้งน้ำทิ้งจากบ้านเรือนและชุมชน



## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

##### 2.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ รุ่น RF-5301 PC บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
2. เครื่องวัดค่าพีเอช รุ่น 215 บริษัท Denver Instrument Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. ตู้อบให้ความร้อน รุ่น ISOTEMP บริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด รุ่น TC-254 บริษัท Denver Instrument Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น ISOTEMP 228 บริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องวัดแสง (Lux meter) รุ่น LX-50 บริษัท Digicon ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. บั้มสุญญากาศ
8. Vaccum manifold
9. SPE Cartridge ชนิด Bond Elute C18 บริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. SPE Cartridge ชนิด Oasis HLB บริษัท Water Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. ไมโครปิเปต ขนาด 10-100 และ 100-1000 ไมโครลิตร รุ่น Nichiryo Le บริษัท Nichiryo ประเทศญี่ปุ่น
12. หลอด UV ขนาด 20, 30 และ 40 วัตต์ บริษัท Narwar ประเทศญี่ปุ่น
13. เซลล์ควอดซ์ชนิดที่มีด้านใส 4 ด้าน
14. เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

##### 2.1.2 สารเคมี

1. เอสโตรน ( $C_{18}H_{22}O_2$ ) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fluka Chemika
2. เอสตราไดออล ( $C_{18}H_{24}O_2$ ) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fluka Chemika
3. เอสไตรออล ( $C_{18}H_{24}O_3$ ) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fluka Chemika
4. เมทานอล ( $CH_3OH$ ) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fisher Scientific
5. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo Erba Co., Ltd
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo Erba Co., Ltd
7. เอทิลอะซิเตท ( $C_4H_8O_2$ ) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo Erba Reagent
8. น้ำปราศจากไอออน (De-ionized water)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## 2.2 การตรวจวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี

### 2.2.1. การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสง สำหรับการวิเคราะห์เชิงฟลูออโรเมทรี

บรรจุสารละลายมาตรฐานเอสโตรเจนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในเซลล์ควอดตซ์ชนิดที่มีด้านใสทั้ง 4 ด้านและนำไปวางในเซลล์ภายในเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ทำการสแกนหาความยาวคลื่นในการคายแสงชั่วคราว ( $\lambda$  emission) โดยตั้งค่าความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง ( $\lambda$  excitation) ไว้ที่ 250 นาโนเมตร นำค่า  $\lambda$  emission ที่ได้ไปทำการสแกนหาสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงของของสารละลายมาตรฐานเอสโตรเจน จะทำให้ได้ค่า  $\lambda$  excitation ที่เหมาะสมสำหรับเอสโตรเจน ตั้งค่า  $\lambda$  excitation ที่หาได้ และทำการสแกนหาสเปกตรัมของการคายแสง จะทำให้ได้  $\lambda$  emission ที่เหมาะสมของสารละลายมาตรฐานเอสโตรเจน ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนสารละลายมาตรฐานเอสโตรเจนเป็นสารละลายเอสตราไดออลและเอสโตรอล ตามลำดับ

### 2.2.2 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี

เตรียมสารละลายผสมระหว่างเอสโตรเจน เอสตราไดออลและเอสโตรอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวเท่ากับ 1, 3, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย เทสารละลายที่เตรียมได้แต่ละความเข้มข้นลงในเซลล์ควอดตซ์ชนิดที่มีด้านใสทั้ง 4 ด้านและนำไปวางในเซลล์ภายในเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ทำการวัดค่าความเข้มของการเปล่งแสง (Relative luminescent intensity) ของสารละลายผสมในแต่ละความเข้มข้น โดยการตั้งค่า  $\lambda$  emission และ  $\lambda$  excitation ที่ได้จากข้อ 2.2.1 สำหรับเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรอลตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้น แต่เปลี่ยนสารละลายผสมเอสโตรเจนที่เตรียมด้วยเอทิลอะซิเตท เป็นสารละลายผสมเอสโตรเจนที่เตรียมด้วยเมทานอล และน้ำกลั่น

### 2.2.3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายผสมระหว่างเอสโตรน เอสตราไดออลและเอสโตรอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวเท่ากับ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ตัวทำละลายที่ได้จากข้อ 2.2.2 เทสารที่เตรียมได้ลงในเซลล์ควอตซ์ชนิดที่มีด้านใสทั้ง 4 ด้านและนำไปวางในเซลล์ภายในเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ทำการวัดค่าความเข้มของการเปล่งแสง (Relative luminescent intensity) ของสารละลายผสมในแต่ละความเข้มข้น โดยการตั้งค่า  $\lambda$  emission และ  $\lambda$  excitation ที่ได้จากข้อ 2.2.1 สำหรับเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรอล ตามลำดับ

### 2.2.4 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในระดับที่สามารถวิเคราะห์ได้

เทตัวทำละลายที่ได้จากหัวข้อ 2.2.2 ใส่เซลล์ควอตซ์ชนิดที่มีด้านใสทั้ง 4 ด้านและนำไปวางในเซลล์ภายในเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ทำการวัดค่าความเข้มของการเปล่งแสง (Relative luminescent intensity) ของตัวทำละลาย โดยการตั้งค่า  $\lambda$  emission และ  $\lambda$  excitation ที่ได้จากข้อ 2.2.1 สำหรับเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรอลตามลำดับ ทำการวัดซ้ำ 20 ครั้ง นำค่าความเข้มของการเปล่งแสง (Relative luminescent intensity) ที่ได้จากการวัดทั้ง 20 ค่า มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของการเปล่งแสง (Relative luminescent intensity) โดยใช้สมการที่ 2.1 และ 2.2 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าทั้งหมดมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจวัด หรือความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้โดยใช้สมการที่ 2.3

$$\text{ค่าเฉลี่ย } (\overline{Y}_B) = \frac{\sum_{j=1}^{n_B} Y_{Bj}}{n_B} \quad (2.1)$$

$$\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน } (S_B) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n_B} (Y_{Bj} - \overline{Y}_B)^2}{(n_B - 1)}} \quad (2.2)$$

$$\text{ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ (LOD)} = \overline{Y}_B + 3(S_B) \quad (2.3)$$

### 2.2.5 การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

เตรียมสารละลายผสมระหว่างเอสโตรน เอสตราไดออลและเอสโตรอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ตัวทำละลายที่ได้จากข้อ 2.2.2 นำสารที่เตรียมได้ใส่เซลล์ควอตซ์ชนิดที่มีด้านใสทั้ง 4 ด้านและนำไปวางในเซลล์ภายในเครื่อง

สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ทำการวัดค่าความเข้มของการเปล่งแสง (Relative luminescent intensity) ของสารละลายผสมในแต่ละความเข้มข้น โดยการตั้งค่า  $\lambda$  emission และ  $\lambda$  excitation ที่ได้จากข้อ 2.2.1 สำหรับเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรอลตามลำดับ ทำการวัดซ้ำ 20 ครั้ง คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของความเข้มข้นของสารละลายผสมเอสโตรเจน นำผลที่ได้มาคำนวณค่า HORRAT โดยใช้สมการที่ 2.4 พร้อมทั้งทำการประเมินการยอมรับได้ของความเที่ยงตรงตามวิธีการที่ระบุใน The AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993) กำหนดค่า HORRAT ที่ยอมรับได้ต้องมีค่าน้อยกว่า 2

$$\text{HORRAT} = \frac{\%RSD_{\text{Lab}}}{\%RSD_{\text{expected}}} \quad (2.4)$$

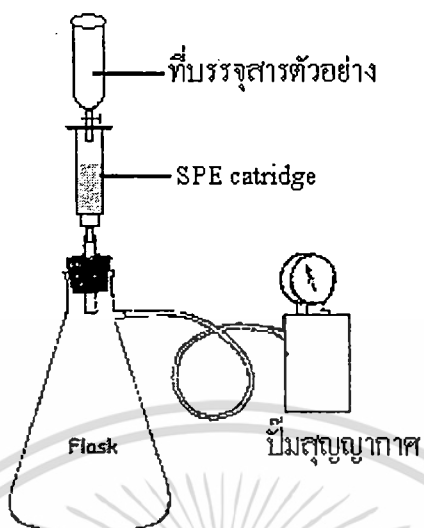
เมื่อ  $\%RSD_{\text{Lab}}$  = ค่าร้อยละของความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลอง

$\%RSD_{\text{expected}}$  = ค่าร้อยละของความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่น่าจะเป็น โดยเป็นค่าที่ได้จากคำนวณโดยใช้ Horwitz's equation (สมการที่ 2.5) กำหนดให้ C คือความเข้มข้นของสารละลายที่ทำการทดสอบ

$$\%RSD_{\text{expected}} = 0.66 \times 2 \times C^{-0.1505} \quad (2.5)$$

### 2.3 การศึกษาชนิดของ SPE Cartridge ที่เหมาะสมในการสกัดเอสโตรเจน

ต่อ SPE Cartridge ชนิด Bond Elut C-18 เข้ากับอุปกรณ์อื่นๆ ดังรูปที่ 2.1 ทำการปรับสภาพ SPE Cartridge ที่ใช้ในการสกัดให้พร้อมรองรับตัวอย่าง โดยเติมเมทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตรอย่างละ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับอัตราการไหลของสารด้วยแรงดันประมาณ 300-350 mm Hg จากนั้นเตรียมสารละลายผสมระหว่างเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย เติมสารละลายเอสโตรเจนที่เตรียมได้ลงใน Bond Elut C-18 ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ทำการปรับอัตราการไหลออกของสารด้วยแรงดันประมาณ 300-350 mm Hg ทำการชะสารเอสโตรเจนที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์ SPE Cartridge โดยการเติมเมทานอลจำนวน 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ลงใน Bond Elut C-18 โดยใช้หลอดทดลองเป็นอุปกรณ์รองรับสารที่ผ่านการชะแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเอสโตรเจนโดยเทคนิคฟลูออโรเมทรี ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ทำเบลนด์โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอสโตรเจน ทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้น แต่เปลี่ยน SPE Cartridge เป็น Oasis HLB



รูปที่ 2.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction)

## 2.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนด้วยแสง

การทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนด้วยแสงทำได้โดยใช้วิธีการทดสอบแบบแบทช์ (batch) ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ความเข้มของแสง ค่าพีเอชของสารละลาย และ อุณหภูมิ

### 2.4.1 ผลของความเข้มของแสง

เตรียมสารละลายผสมระหว่างเอสโตรน เอสตราไดโอดและเอสโตรอด โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย กำหนดให้ความเข้มข้นของสารแต่ละตัวเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ปิดสารละลายที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปตั้งในกล่องทดลองที่บดแสงที่ต่อกับหลอด UV กำลังวัตต์ เท่ากับ 60 ลักซ์ เปิดสวิตช์ไฟเพื่อให้แสงจากหลอด UV เป็นเวลา 500 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำน้ำตัวอย่างไปทำการสกัดด้วยเทคนิค SPE โดยใช้ชนิดของ SPE Cartridge ที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าความเข้มข้นของสารละลายเอสโตรเจนที่เหลือด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ โดยตั้งค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง ( $\lambda$  excitation) และ ความยาวคลื่นในการคายแสง ( $\lambda$  emission) ที่ได้จากข้อ 2.2.1 สำหรับเอสโตรน เอสตราไดโอด และเอสโตรอด ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้งทำชุดควบคุมควบคู่กันไปด้วย โดยชุดควบคุมจะทำการทดลอง

เช่นเดียวกันกับสารตัวอย่าง แต่ไม่มีการให้แสงจากหลอด UV จากนั้นทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้นแต่เปลี่ยนกำลังวัตต์ของหลอด UV เป็น 90 และ 120 ลักซ์

#### 2.4.2 ผลของค่าพีเอชของสารละลาย

เตรียมสารละลายผสมระหว่างเอสโตรเจน เอสตราไดออลและเอสโตรอล โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย กำหนดให้ความเข้มข้นของสารแต่ละตัวเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำการปรับพีเอชของสารละลายให้มีค่าเป็น 3, 7 หรือ 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ และกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปตั้งในกล่องทดลองที่บแสงที่ต่อกับหลอด UV ที่ให้ความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการสลายตัวจากการทดลองข้อ 2.4.1 เปิดสวิตช์ไฟเพื่อให้แสงจากหลอด UV เป็นเวลา 500 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำน้ำตัวอย่างไปทำการสกัดด้วยเทคนิค SPE โดยใช้ชนิดของ SPE Cartridge ที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าความเข้มข้นของสารละลายเอสโตรเจนที่เหลือด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ โดยตั้งค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง ( $\lambda$  excitation) และ ความยาวคลื่นในการคายแสง ( $\lambda$  emission) ที่ได้จากข้อ 2.2.1 สำหรับเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรอล ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้งทำชุดควบคุมควบคู่กันไปด้วย โดยชุดควบคุมจะทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารตัวอย่าง แต่ไม่มีการให้แสงจากหลอด UV

#### 2.4.3 ผลของอุณหภูมิ

เตรียมสารละลายผสมระหว่างเอสโตรเจน เอสตราไดออลและเอสโตรอล โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย กำหนดให้ความเข้มข้นของสารแต่ละตัวเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปตั้งในกล่องทดลองที่บแสงที่ต่อกับหลอด UV ที่ให้ความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการสลายตัวจากการทดลองข้อ 2.4.1 พร้อมทั้งควบคุมอุณหภูมิของสารละลายให้อยู่ที่ 20 องศาเซลเซียส เปิดสวิตช์ไฟเพื่อให้แสงจากหลอด UV เป็นเวลา 500 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำน้ำตัวอย่างไปทำการสกัดด้วยเทคนิค SPE โดยใช้ชนิด SPE Cartridge ที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าความเข้มข้นของสารละลายเอสโตรเจนที่เหลือด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ โดยตั้งค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง ( $\lambda$  excitation) และ ความยาวคลื่นในการคายแสง ( $\lambda$  emission) ที่ได้จากข้อ 2.2.1 สำหรับเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรอล ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้งทำชุดควบคุมควบคู่กันไปด้วย โดยชุดควบคุมจะทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารตัวอย่าง แต่ไม่มีการให้แสงจากหลอด UV จากนั้นทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้นแต่เปลี่ยนอุณหภูมิของสารละลายเป็น 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส

## 2.5 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจน

เตรียมสารละลายผสมระหว่างเอสโตรน เอสตราไดโอดอลและเอสโตรออลโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร เปิดสารละลายที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 9 บีกเกอร์ ปรับพีเอชของสารละลาย ให้มีค่าเท่ากับค่าพีเอชที่ได้จากการทดลองตามข้อ 2.4.2 นำบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายข้างต้นไปวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิโดยปรับอุณหภูมิให้อยู่ที่ค่าเท่ากับการทดลองตามข้อ 2.4.3 นำกล่องทดลองที่บแสงที่ต่อกับหลอด UV ที่มีความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการสลายตัวจากการทดลอง 2.4.1 ไปครอบทับ พร้อมเปิดสวิตซ์ไฟเพื่อให้แสง เกือบตัวอย่างน้ำโดยสูบบีกเกอร์ออกจากกล่องทดลอง ที่เวลา 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 และ 500 นาที มาช่วงเวลาละ 1 บีกเกอร์ นำน้ำตัวอย่างไปทำการสกัดด้วยเทคนิคSPE โดยใช้ชนิดของ SPE Cartridge ที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าความเข้มข้นของสารละลายเอสโตรเจนที่เหลือนด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ โดยตั้งค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง( $\lambda$  excitation) และความยาวคลื่นในการคายแสง ( $\lambda$  emission) ที่ได้จากข้อ 2.2.1 สำหรับเอสโตรน เอสตราไดโอดอลและเอสโตรออล ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้งทำชุดควบคุมควบคู่กันไปด้วย โดยชุดควบคุมจะทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารตัวอย่าง แต่ไม่มีการให้แสงจากหลอด UV

### บทที่ 3

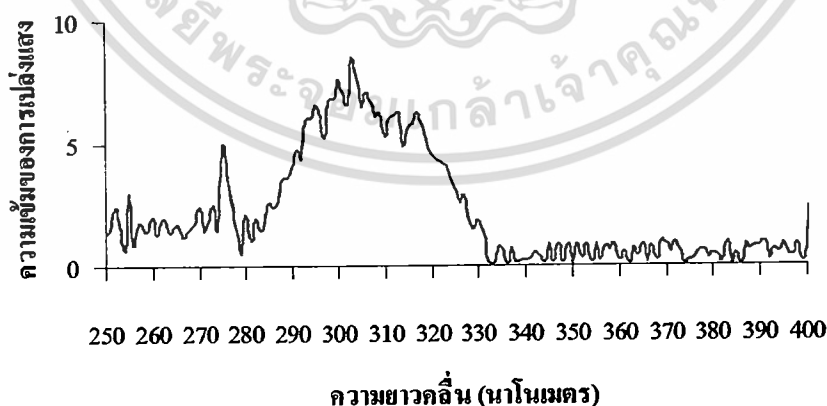
#### ผลการทดลองและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์ของเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งร่วมกับเทคนิคฟลูออโรเมทรีในการศึกษาการสลายตัวของแสงหรือโฟโตไลซิส (Photolysis) ของเอสโตรเจนในน้ำ เอสโตรเจนที่ทำการศึกษามีสามชนิด ได้แก่ เอสโตรน (E1) เอสตราไดออล (E2) และเอสโตรออล (E3) โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ส่วนดังนี้คือ (1) การตรวจวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี (2) การศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดเอสโตรเจนด้วย SPE cartridge และ (3) การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจน (4) การศึกษาจลนพลศาสตร์การสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ ผลการศึกษาที่ได้เป็นดังนี้

#### 3.1 การตรวจวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี

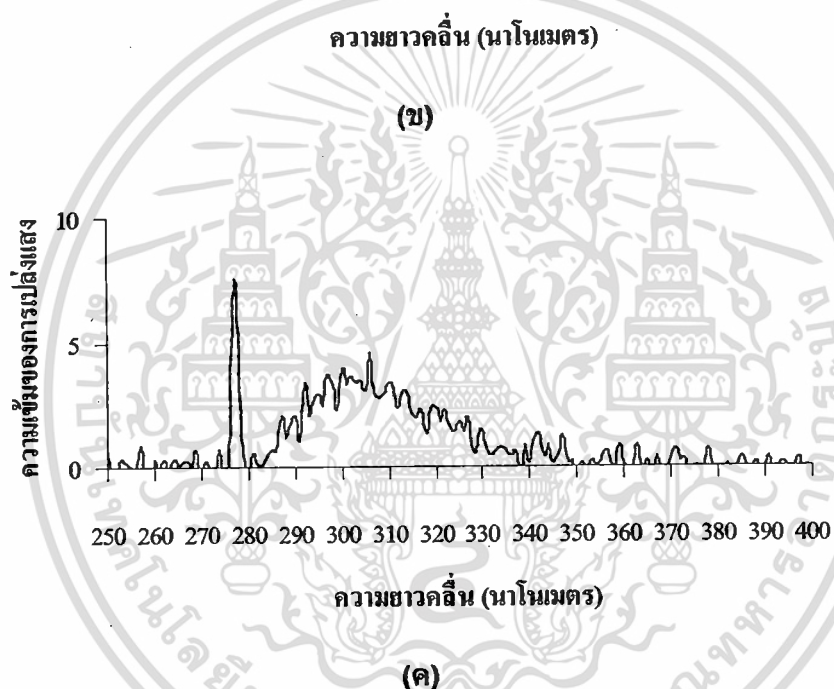
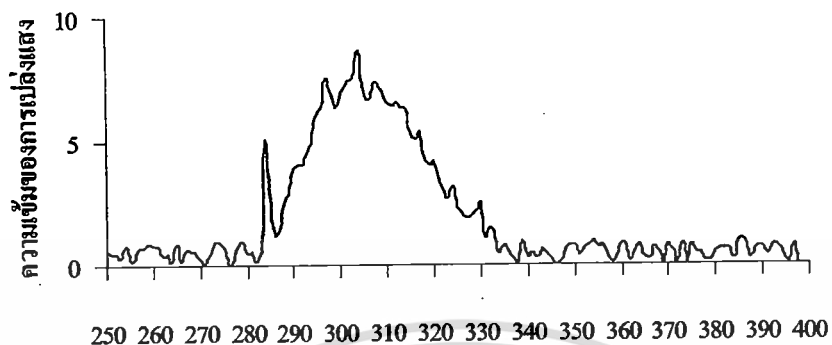
##### 3.1.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสง

ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสงสำหรับการวิเคราะห์เอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี ทำได้โดยการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานเอสโตรเจนทั้งสามชนิด กำหนดความเข้มข้นของสารที่ทดสอบแต่ละตัวเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการสแกนหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสงของสารแต่ละตัว ช่วงความยาวคลื่นที่ทำการสแกนเริ่มต้นที่ 250 นาโนเมตรจนถึง 400 นาโนเมตร จะได้สเปกตรัมความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงและการคายแสงสำหรับ E1, E2, และ E3 ดังแสดงในรูปที่ 3.1



(ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและการคายแสงของสารละลายเอสโตรเจน (ก) เอสโตรน, E1 (ข) เอสตราไดออล, E2 และ (ค) เอสโตรออล, E3

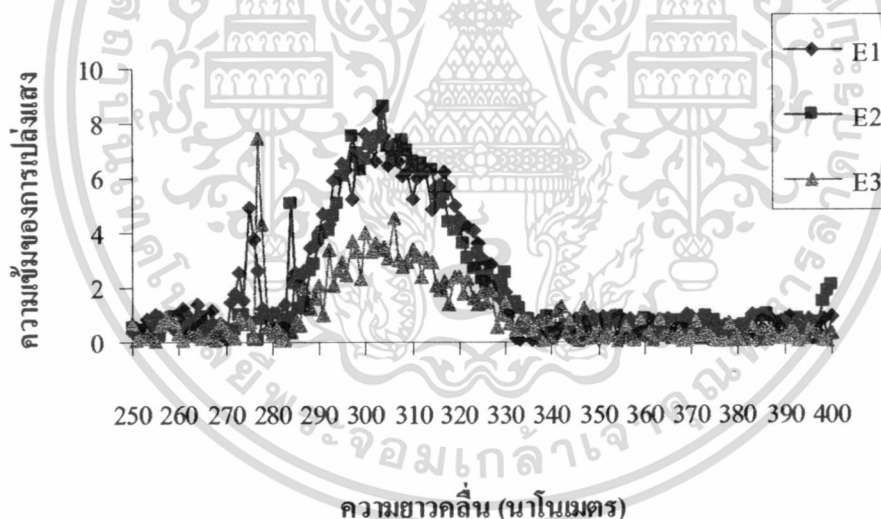
จากลักษณะของสเปกตรัมที่ได้จากรูปที่ 3.1 (ก) (ข) และ (ค) พบว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงของ E1, E2 และ E3 คือ 275, 284 และ 277 นาโนเมตร ตามลำดับ และความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการคายแสงของ E1, E2 และ E3 คือ 303, 304 และ 306 นาโนเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1)



ตารางที่ 3.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงและการคายแสงของสารละลายมาตรฐานเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรออล

สารละลายมาตรฐานเอสโตรเจน	ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่นของการคายแสง (นาโนเมตร)
เอสโตรเจน	275	303
เอสตราไดออล	284	304
เอสโตรออล	277	306

เมื่อนำสารละลายผสมระหว่าง E1, E2 และ E3 เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ กำหนดความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง และความยาวคลื่นในการคายแสงดังแสดงในตารางที่ 3.1 ได้สเปกตรัมของสารละลายผสมเอสโตรเจนดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและการคายแสงของสารละลายผสมระหว่างเอสโตรเจน (E1) เอสตราไดออล (E2) และเอสโตรออล (E3)

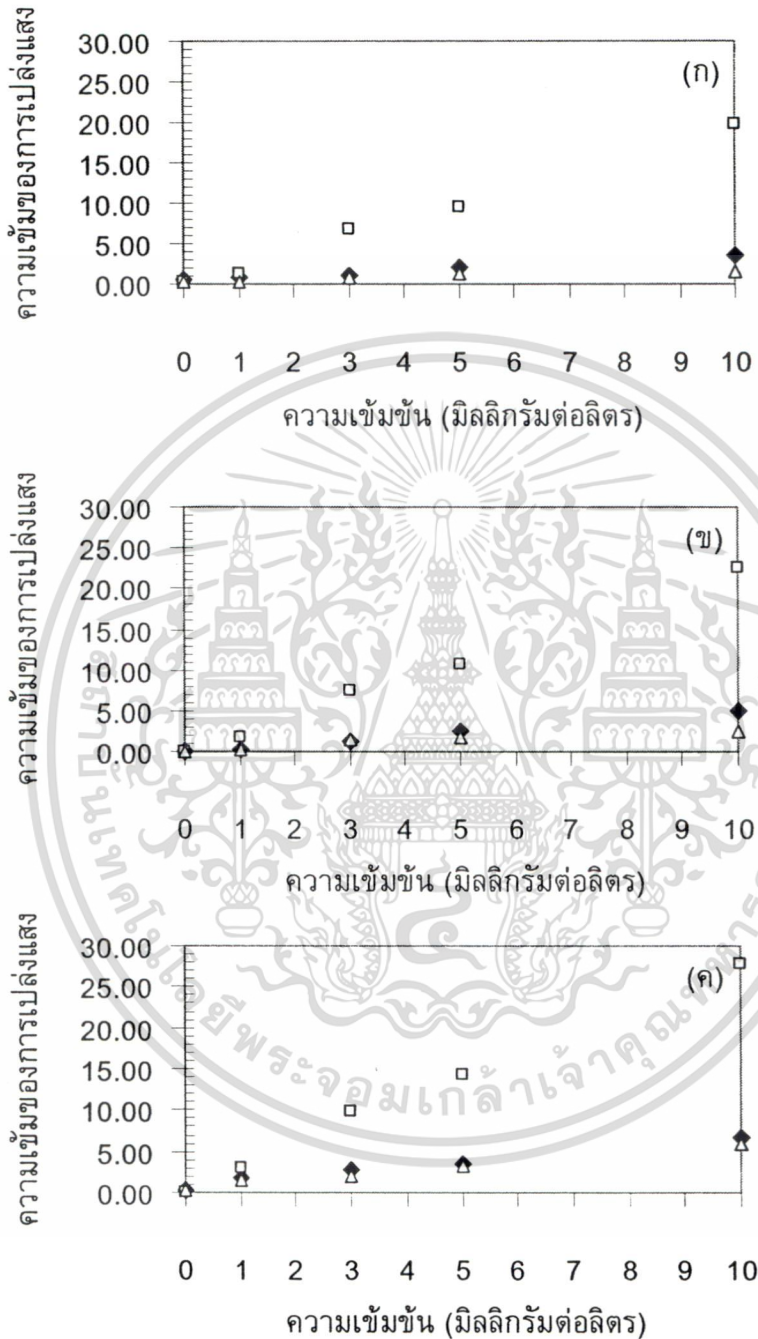
### 3.1.2 ชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสม

ชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เอสโตรเจนด้วยเทคนิคฟลูออโรเมตรี ทำการศึกษาได้โดยเปรียบเทียบความเข้มของการเปล่งแสง (Relative luminescent intensity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ของสารละลาย E1, E2 และ E3 ที่เตรียมโดยใช้ตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำกลั่น ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ความเข้มของการเปล่งแสงของสารละลายมาตรฐาน (ก) E1 (ข) E2 และ (ค) E3 ที่ระดับความเข้มข้น 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท (□) เมทานอล (◆) และน้ำกลั่น (△)

จากรูปที่ 3.3 พบว่าความเข้มข้นของการเปล่งแสงของสารละลายมาตรฐานเอสโตรเจนทั้งสามชนิดที่เตรียมโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย มีค่าสูงกว่าความเข้มข้นของการเปล่งแสงของสารละลายเอสโตรเจนที่ใช้เอทิลอะซิเตทและน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายตามลำดับ ในกรณีน้ำกลั่นซึ่งมีค่าความเข้มข้นของการเปล่งแสงของสารละลายเอสโตรเจนต่ำสุด อาจเป็นผลเนื่องมาจากเอสโตรเจนไม่เกิดฟลูออเรสเซนซ์เมื่อละลายอยู่ในน้ำ (ลาวัลย์, 2544) สำหรับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทิลอะซิเตทและเมทานอล จะมีหมู่แทนที่คือ หมู่  $-COOH$  และ หมู่  $-OH$  ซึ่งสามารถส่งผลต่อความเข้มข้นของการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้ความเข้มข้นของการเปล่งแสงของสารละลายเอสโตรเจนที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้น โดย E1, E2 และ E3 ที่ละลายอยู่ในเมทานอลให้ค่าความเข้มข้นของการเปล่งแสงมากกว่าสารละลาย E1, E2 และ E3 ในเอทิลอะซิเตท ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากเมทานอลสามารถรวมตัวกับสารที่ทำการตรวจวัดได้ดีกว่าเอทิลอะซิเตท จึงมีผลทำให้โครงสร้างของโมเลกุลที่เกิดจากการรวมตัวแข็งแรงมากขึ้น ทำให้ค่าความเข้มข้นของการเกิดฟลูออเรสเซนซ์เด่นชัดมากขึ้นอีกด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสำหรับการเตรียมสารละลาย E1, E2 และ E3 ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี

### 3.1.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD)

การวิเคราะห์หา LOD สำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลาย E1, E2 และ E3 ด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี ทำได้โดยนำสารละลายแบลนด์ (เมทานอล 99 เปอร์เซ็นต์) มาวัดความเข้มข้นของการเปล่งแสงซ้ำ 20 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของการเปล่งแสงที่ได้จากการวัดโดยใช้สมการที่ 2.1 และ 2.2 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าทั้งหมดมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจวัด หรือความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้โดยใช้สมการที่ 2.3 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่าเฉลี่ย และเบี่ยงเบนมาตรฐาน สารละลายแบลนด์จากการวัดซ้ำ 20 ครั้ง

พารามิเตอร์	เอสโตรน	เอสตราได ออล	เอสโตรอล
ค่าเฉลี่ย ( $Y_B$ )	0.019	0.014	0.015
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $S_B$ )	0.007	0.006	0.006
ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้เป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (LOD)	$0.040 \pm 0.007$	$0.032 \pm 0.006$	$0.033 \pm 0.006$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.4 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอสโตรเจนในน้ำด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรีทำได้โดยวัดค่าความเข้มของการเปล่งแสง (Relative luminescent intensity) ของสารละลายมาตรฐานเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรออล เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 20 ครั้ง นำผลที่ได้มาทำการประเมินการยอมรับได้ของความเที่ยงตรงตามวิธีการที่ระบุใน The AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993) ผลที่ได้จากการทดลองและการคำนวณสามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการประเมินความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์สารละลายเอสโตรเจน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

พารามิเตอร์	เอสโตรเจน	เอสตราไดออล	เอสโตรออล
ค่าเฉลี่ย	24.90	23.48	25.81
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.661	0.427	0.520
ค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลอง ( $\%RSD_{Lab}$ )	2.655	1.819	2.015
ค่าร้อยละของความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่น่าจะเป็น ( $\%RSD_{expected}$ )	8.287	8.287	8.287
HORRAT	0.320	0.220	0.243

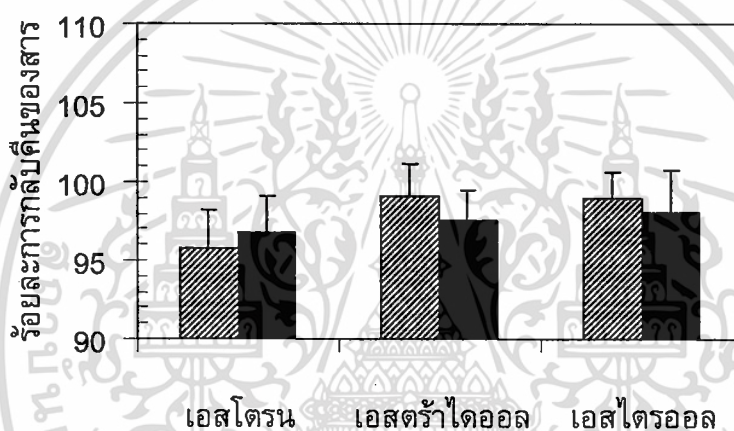
จากตารางพบว่าค่า HORRAT ของสารละลาย E1, E2, และ E3 ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ มีค่าน้อยกว่า 2 แสดงว่า ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วงยอมรับได้

### 3.2 ผลของชนิด SPE Cartridge ต่อประสิทธิภาพในการสกัดเอสโตรเจนด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

จากการศึกษาในหัวข้อ 3.1 พบว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายเอสโตรเจนเพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทรี แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ทำการศึกษาปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ จึงมีความจำเป็นที่ต้องสกัดเอสโตรเจนในน้ำก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ จากการทบทวนเอกสารที่ผ่านมาพบว่าเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction) เป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการเตรียมสารละลายเอสโตรเจนก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยวัสดุดูดซับที่ใช้สกัด (SPE Cartridge) ที่ให้ประสิทธิภาพสูงในการเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เอสโตรเจนคือ Oasis HLB (Hernando et al., 2004; Quintana et al., 2004) อย่างไรก็ตามพบว่า SPE Cartridge ชนิดนี้มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับ Bond Elut C18 ซึ่งถูกนำมาใช้ในการเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เอสโตรเจนในงานวิจัยของ Pawloski et al. (2004) โดยมีราคาจำหน่ายเมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2550 เท่ากับ 254 บาทและ 104 บาทต่ออัน สำหรับ Oasis HLB และ Bond Elut C18 ตามลำดับ นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการสกัดเอสโตรเจนด้วย Bond Elut C18 ยังไม่ได้มีการรายงานถึงในงานวิจัยของ Pawloski et al. (2004) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดเอสโตรเจนของ Bond Elut C18 และ Oasis HLB ด้วยการวิเคราะห์ร้อยละการกลับคืน (% recovery) ของสารละลาย E1, E2, และ E3 ที่ทราบปริมาณ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ร้อยละการกลับคืนของสารละลายเอสโตรเจนเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อสกัดด้วย Bond Elut C18 (▨) Oasis HLB (■)

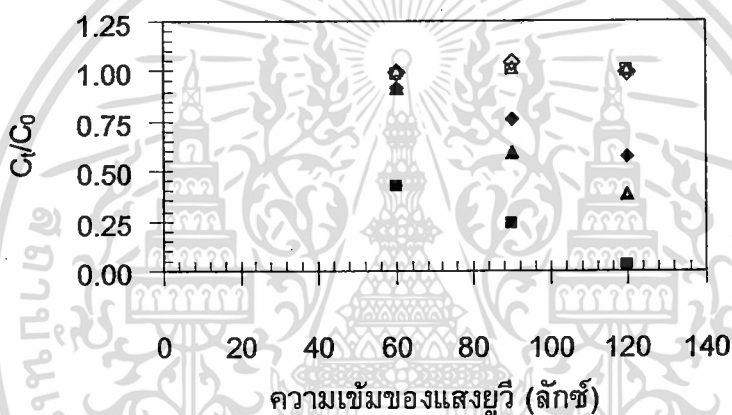
จากรูปที่ 3.4 พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารละลายเอสโตรเจนด้วย Bond Elut C18 และ Oasis HLB มีค่าใกล้เคียงกัน โดยร้อยละการกลับคืนของเอสโตรนที่สกัดโดยใช้ Bond Elut C18 และ Oasis HLB มีค่าเท่ากับ  $95.71 \pm 2.53$  และ  $96.77 \pm 2.33$  ตามลำดับ ในขณะที่ร้อยละการกลับคืนของเอสตราไดออลที่สกัดโดยใช้ Bond Elut C18 และ Oasis HLB มีค่าเท่ากับ  $99.04 \pm 2.05$  และ  $97.56 \pm 1.90$  ตามลำดับ และร้อยละการกลับคืนของเอสโตรออลที่สกัดโดยใช้ Bond Elut C18 และ Oasis HLB มีค่าเท่ากับ  $99.01 \pm 1.69$  และ  $98.05 \pm 2.67$  ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี t-test พบว่าร้อยละการกลับคืนของสารละลายเอสโตรเจนที่สกัดด้วย SPE Cartridge ทั้งสองชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ Bond Elut C18 เป็น SPE

Cartridge ในการสกัดสารละลายเฮสโตรเจนก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

### 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยแสงของเฮสโตรเจนในน้ำ

#### 3.3.1 ผลของความเข้มของแสง

ผลของความเข้มของแสงต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเฮสโตรเจนในน้ำ ทำการศึกษาโดยนำสารละลายเฮสโตรเจน เฮสตราไดคอล และเฮสไตรคอลไปทำการฉายแสงยูวีที่ระดับความเข้มของแสงต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 500 นาที จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นที่เหลือในสารละลาย ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 สัดส่วนความเข้มข้นที่เหลือต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของเฮสโตรเจน (◆) เฮสตราไดคอล (■) และเฮสไตรคอล (▲) ในสารละลายภายหลังจากการฉายแสงยูวีที่ระดับความเข้มของแสงต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 500 นาที สัญลักษณ์เปิด ◊, □, และ △ แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของเฮสโตรเจน เฮสตราไดคอล และเฮสไตรคอลในชุดควบคุม ตามลำดับ

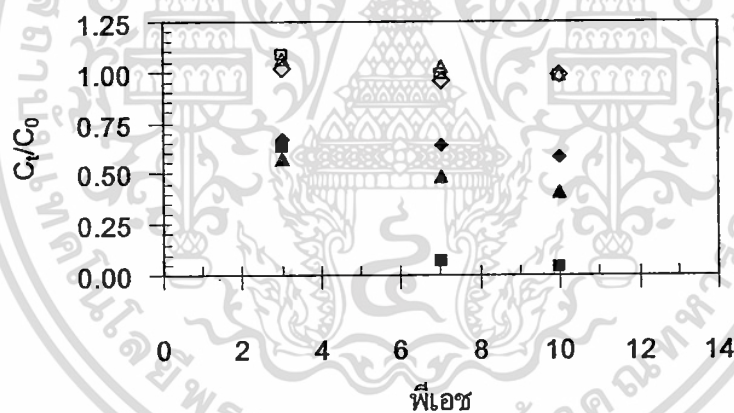
จากรูปพบว่าความเข้มของแสงยูวีมีผลต่อการสลายตัวของเฮสโตรเจนทั้งสามชนิดในน้ำ เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นจาก 60 ลักซ์ เป็น 90 ลักซ์ และ 120 ลักซ์ ความเข้มข้นของเฮสโตรเจนในน้ำมีค่าลดลง ดังจะเห็นได้จากสัดส่วนความเข้มข้นที่เหลือในน้ำเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น ( $C_t/C_0$ ) ของเฮสโตรเจน เฮสตราไดคอล และเฮสไตรคอลมีค่าน้อยกว่า 1 การสลายตัวของเฮสโตรเจนเกิดขึ้นสูงสุด เมื่อสารละลายได้รับแสงจากหลอดยูวี (UV-light) ขนาด 120 ลักซ์ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากความเข้มแสงที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีจำนวนโฟตอนที่มาตกกระทบที่ผิวหน้าอนุภาคโมเลกุลของสารในปริมาณมากขึ้น เพิ่มโอกาสในการถ่ายเทพลังงานจากโฟตอนให้กับโมเลกุลของสารให้มีสูงขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลของสารที่ถูกกระตุ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีมีจำนวนมากขึ้น การสลายตัวของเฮสโตรเจนจึงเกิดเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของความเข้มของแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเปรียบเทียบความว่องไวในปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนทั้งสามชนิด พบว่า ความเข้มข้นที่เท่ากัน สารละลายเอสโตรเจนทั้ง 3 ชนิดมีการสลายตัวได้มากน้อยแตกต่างกัน กล่าวคือ เอสตราไดออลมีการสลายตัวได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 57.69, 76.56 และ 97.93 ณ ความเข้มข้น 60 ลักซ์, 90 ลักซ์ และ 120 ลักซ์ ตามลำดับ รองลงมาคือเอสโตรออล ที่มีการสลายตัวได้ร้อยละ 9.82, 40.62 และ 61.48 ณ ความเข้มข้น 60 ลักซ์, 90 ลักซ์ และ 120 ลักซ์ ตามลำดับ ในขณะที่เอสโตรนเกิดการสลายตัวได้น้อยที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 60 ลักซ์, 90 ลักซ์ และ 120 ลักซ์ เอสโตรนเกิดการสลายตัวได้ร้อยละ 8.84, 24.69 และ 42.99 ณ ความเข้มข้น 60 ลักซ์, 90 ลักซ์ และ 120 ลักซ์ ตามลำดับ

### 3.3.2 ผลของพีเอชของสารละลาย

ผลของพีเอชของสารละลายต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ ทำการศึกษาโดยนำสารละลายเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรออลที่พีเอชต่างกัน ไปทำการฉายแสงยูวีที่ระดับความเข้ม 120 ลักซ์ เป็นเวลา 500 นาที จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นที่เหลือในสารละลาย ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 สัดส่วนความเข้มข้นที่เหลือต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของเอสโตรน (◆) เอสตราไดออล (■) และเอสโตรออล (▲) ในสารละลายที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ภายหลังจากการฉายแสงยูวีที่ระดับความเข้ม 120 ลักซ์ เป็นเวลา 500 นาที สัญลักษณ์เปิด ◇, □, และ △ แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรออลในชุดควบคุมตามลำดับ

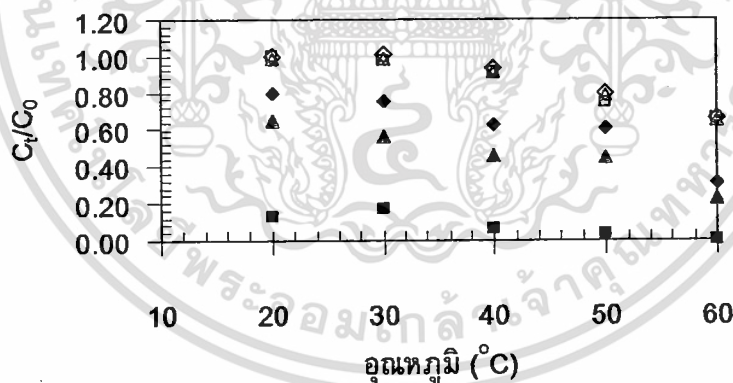
จากรูปพบว่าพีเอชของสารละลายมีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนด้วยแสง เมื่อพีเอชของสารละลายมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 3 เป็น 7 และ 10 ความเข้มข้นของเอสโตรเจนในน้ำมีแนวโน้มลดลง เทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนมีการสลายตัวด้วยแสงเพิ่มมากขึ้นเมื่อพีเอชของสารละลายมีค่าสูงขึ้น โดยการสลายตัวของเอสโตรเจนเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อสารละลายมี

ค่าพีเอชเท่ากับ 10 ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu และ Liu (2003) ที่พบว่าปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสตราไดออลและเอสโตรนเกิดขึ้นได้น้อยสุดในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอชเท่ากับ 5) ในขณะที่ค่าพีเอชที่สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการสลายตัวของเอสตราไดออลและเอสโตรนเพิ่มขึ้น

เมื่อทำการเปรียบเทียบความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนทั้งสามชนิด ที่ทำการศึกษพบว่า เอสตราไดออลเป็นสารที่เกิดการสลายตัวด้วยแสงได้มากที่สุด โดยพบการสลายตัวของเอสตราไดออลได้สูงถึงร้อยละ 88.64, 93.76, และ 96.54 เมื่อสารละลายเอสตราไดออลมีค่าพีเอชเป็น 3, 7, และ 10 ตามลำดับ รองลงมาคือเอสโตรอล และเอสโตรน ตามลำดับโดยเอสโตรอลเกิดการสลายตัวได้ร้อยละ 43.33, 51.87, และ 59.29 ในขณะที่เอสโตรนเกิดการสลายตัวได้ร้อยละ 33.71, 36.39, และ 42.16 เมื่อสารละลายมีค่าพีเอชเป็น 3, 7, และ 10 ตามลำดับ

### 3.3.3 ผลของอุณหภูมิของสารละลาย

ผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพในการสลายตัวของเอสโตรเจนด้วยแสง ทำการศึกษาโดยนำสารละลายเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรอล ไปทำการฉายแสงยูวีที่ระดับความเข้ม 120 ลักซ์ เป็นเวลา 500 นาที ณ สภาวะที่มีอุณหภูมิต่างกัน จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นที่เหลือในสารละลาย ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 สัดส่วนความเข้มข้นที่เหลือต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของเอสโตรน (♦) เอสตราไดออล (■) และเอสโตรอล (▲) ภายหลังจากการฉายแสงยูวีในสภาวะที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน สัญลักษณ์เปิด ◊, □, และ △ แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรอลในชุดควบคุม ตามลำดับ



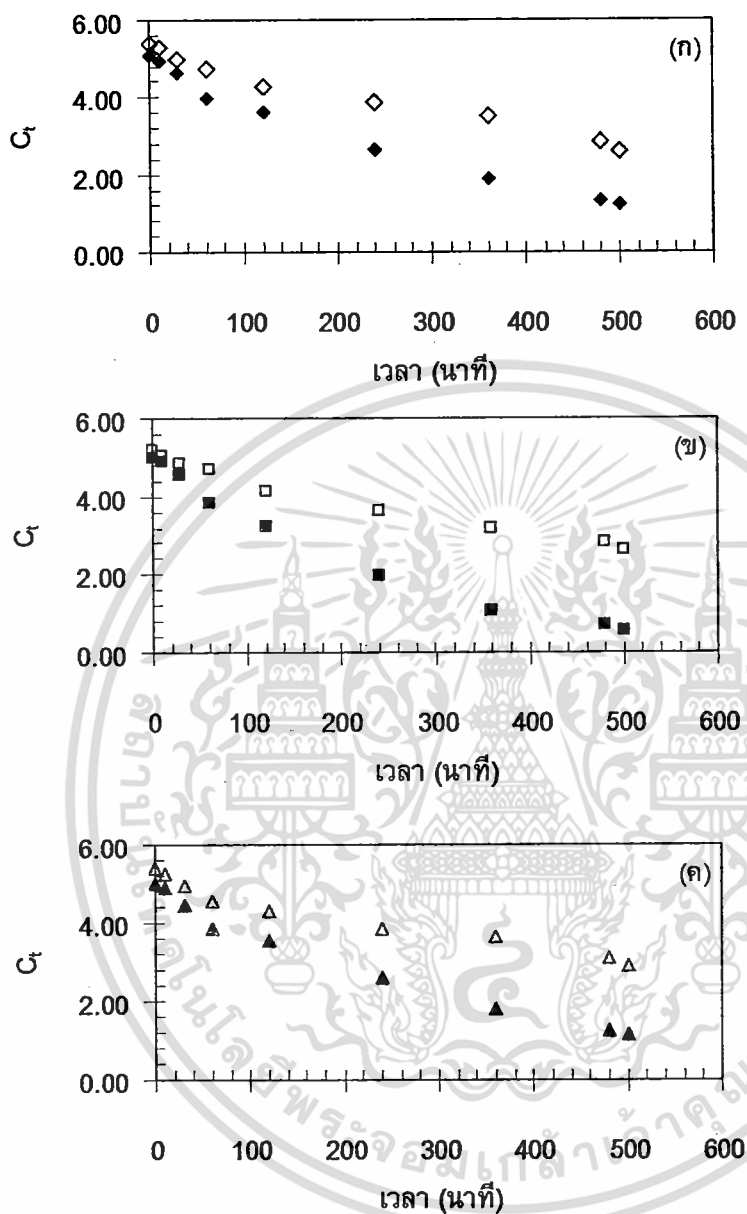
จากรูปพบว่า การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของ เอสโตรเจน เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก  $20^{\circ}\text{C}$  เป็น  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ , และ  $60^{\circ}\text{C}$  ความเข้มข้นที่เหลือของเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรออลในน้ำมีค่าลดลง ดังจะเห็นได้จาก  $\text{Ce}/\text{C}_0$  มีค่าน้อยกว่า 1 นอกจากนี้พบว่า เอสโตรเจนในน้ำสามารถสลายตัวด้วยปฏิกิริยาอื่นๆ นอกเหนือจากปฏิกิริยาโฟโตไลซิสเมื่อสารละลายเอสโตรเจนมีอุณหภูมิมากกว่า  $30^{\circ}\text{C}$  ดังจะเห็นได้จากการลดลงของความเข้มข้นที่เหลือของเอสโตรเจนในชุดควบคุมเมื่อสารละลายมีอุณหภูมิสูงกว่า  $30^{\circ}\text{C}$  สันนิษฐานว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นปฏิกิริยาการระเหยของเอสโตรเจน

เมื่อทำการเปรียบเทียบความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนทั้งสามชนิด ที่ทำการศึกษาพบว่า เอสตราไดออลเป็นสารที่เกิดการสลายตัวด้วยแสงได้มากที่สุด โดยพบการสลายตัวของเอสตราไดออลได้เกินกว่าร้อยละ 80 เมื่ออุณหภูมิของสารละลายเอสตราไดออลมีค่าสูงขึ้น รองลงมาคือเอสโตรออลที่สามารถเกิดการสลายตัวได้ร้อยละ 35-80 ในขณะที่เอสโตรนเกิดการสลายตัวได้น้อยสุด คิดเป็นร้อยละ 20.71, 24.94, 37.01, 39.77, และ 69.35 เมื่ออุณหภูมิของสารละลายมีค่าเป็น  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ , และ  $60^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ

### 3.4 จลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ

จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจน ทำการศึกษาโดยเตรียมสารละลายเอสโตรเจนเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของสารละลายเป็น 10 พร้อมทั้งควบคุมอุณหภูมิของสารละลายให้คงที่ที่ 60 องศาเซลเซียส นำสารละลายดังกล่าวไปฉายแสงยูวีที่ระดับความเข้ม 120 ลักซ์ เป็นเวลา 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 และ 500 นาที จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นที่เหลือของเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรออลในน้ำ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่

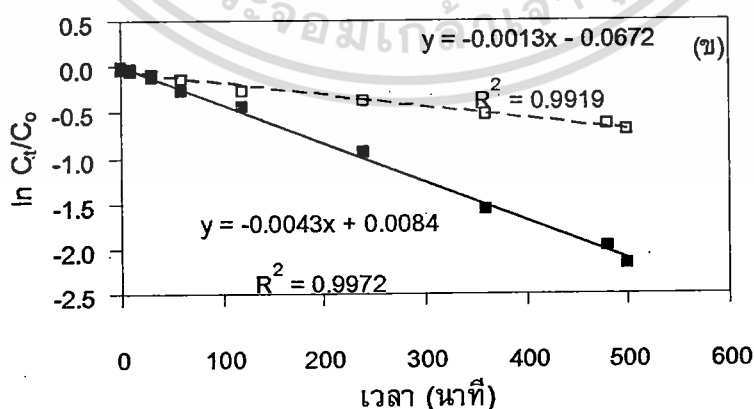
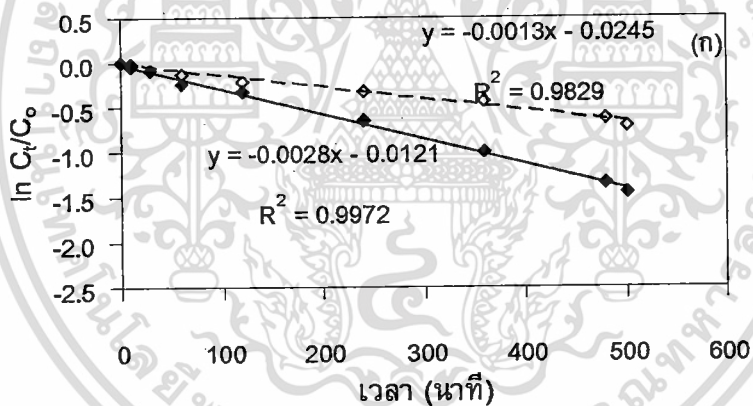
3.8



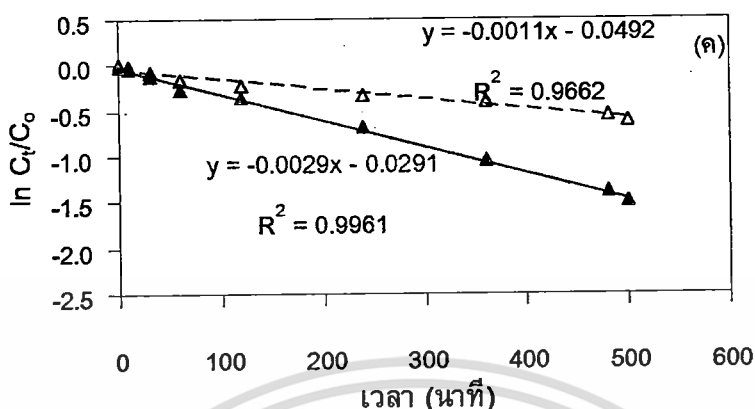
รูปที่ 3.8 ความเข้มข้นที่เหลือของเอสโตรเจน (◆) เอสตราไดออล (■) และเอสโตรออล (▲) ในสารละลาย pH 10 และควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการฉายแสงยูวี 120 ลักซ์ เป็นเวลา 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 และ 500 นาที สัญลักษณ์เปิด ◇, □, และ △ แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรออลในชุดควบคุม ตามลำดับ

จากรูปที่ 3.8 พบว่าความเข้มข้นของเอสโตรเจน เอสตราไดออล และเอสโตรรอลในชุดทดลองที่มีการให้แสงยูวี มีค่าลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายเอสโตรเจนทั้งสามชนิด มีแนวโน้มเช่นเดียวกับผลที่พบในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัว กล่าวคือ เอสตราไดออลมีความเข้มข้นลดลงมากที่สุด รองลงมาคือ เอสโตรรอล และเอสโตรเจนมีความเข้มข้นลดลงน้อยที่สุด นอกจากนี้พบว่าการลดลงของเอสโตรเจนในชุดควบคุม ณ อุณหภูมิที่ทำการทดลอง ( $60^{\circ}\text{C}$ ) แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนสามารถเกิดการสลายตัวด้วยปฏิกิริยาอื่นๆ นอกเหนือจากปฏิกิริยาโฟโตไลซิส สันนิษฐานว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นปฏิกิริยาการระเหยของสาร

อัตราการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ ณ สภาวะที่ทำการทดลอง สามารถหาได้โดยพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอสโตรเจนที่เป็นฟังก์ชันกับเวลา พบว่าการสลายตัวของเอสโตรเจนทั้งสามชนิดในน้ำ จัดเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่งเทียม (Pseudo-First Order) ดังจะเห็นได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $\ln(C_t/C_0)$  กับเวลาในชุดทดลองที่มีการให้แสงยูวีและในชุดควบคุมมีลักษณะเป็นเส้นตรง (รูปที่ 3.9)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น ถ้าทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.9 กราฟสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเอสโตรเจนที่เป็นฟังก์ชันกับเวลา (ก) เอสโตรน, (ข) เอสตราไดออล, (ค) เอสโตรออล, ▲ ในสารละลาย pH 10 และควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส หลังจากการฉายแสงยูวี 120 ลักซ์ เป็นเวลา 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 และ 500 นาที สัญลักษณ์เปิด ○, □, และ ▲ แสดงความเข้มข้นของเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรออลในชุดควบคุม ตามลำดับ

ค่าคงที่อัตราปฏิกิริยาสามารถหาได้จากค่าความชันของฟังก์ชันสมการเส้นตรงที่คำนวณได้จากวิธี least square fit ซึ่งผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ค่าคงที่ของอัตราปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตรในน้ำ ณ อุณหภูมิ 60 °C

ชนิดของเอสโตรเจน	ชุดทดลองที่ให้แสงยูวี (ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส+ปฏิกิริยาอื่นๆ) (min. <sup>-1</sup> )	ชุดควบคุม (ปฏิกิริยาอื่นๆ) (min. <sup>-1</sup> )
เอสโตรน	0.0028	0.0013
เอสตราไดออล	0.0043	0.0013
เอสโตรออล	0.0029	0.0011

จากตารางพบว่า การสลายตัวของเอสโตรเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาอื่นๆ เกิดขึ้นในอัตราค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าคงที่อัตราปฏิกิริยาการสลายตัวอยู่ในช่วงระหว่าง 0.0011-0.0013 min.<sup>-1</sup> เมื่อมีการให้แสงยูวีกับสารละลาย ณ อุณหภูมิดังกล่าว พบว่าค่าคงที่อัตราปฏิกิริยามีค่าเพิ่มขึ้น โดยเอสตราไดออลมีค่าคงที่อัตราปฏิกิริยามากที่สุด รองลงไปที่เอสโตรออล และเอสโตรน

## บทที่ 4

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### 4.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์ของเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งร่วมกับเทคนิคฟลูออโรเมทรีในการศึกษาการสลายตัวของแสงหรือโฟโตไลซิส (Photolysis) ของเอสโตรเจนในน้ำ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้คือ

1. เทคนิคฟลูออโรเมทรีสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอสโตรเจนน้ำ โดยความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสง ( $\lambda$  excitation) ของเอสโตรน เอสตราไดออล และ เอสโตรรอลคือ 275, 284 และ 277 นาโนเมตร ตามลำดับ และความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการคายแสง ( $\lambda$  emission) ของเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรรอลคือ 303, 304 และ 306 นาโนเมตร ตามลำดับ เมทานอลจัดเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลาย เอสโตรเจนก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ วิธีการนี้มีขีดจำกัดในการวิเคราะห์ (Limit of Detection) อยู่ที่  $0.040 \pm 0.007$  มิลลิกรัมต่อลิตร  $0.032 \pm 0.006$  มิลลิกรัมต่อลิตร และ  $0.033 \pm 0.006$  มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเอสโตรน เอสตราไดออล และเอสโตรรอลตามลำดับ โดยมีความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เมื่อทำการประเมินการยอมรับได้ของความเที่ยงตรงตามวิธีการที่ระบุใน The AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993)

2. เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction) สามารถนำมาใช้ในการสกัดเอสโตรเจนในน้ำก่อนที่นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดเอสโตรเจนในน้ำด้วย SPE cartridge 2 ชนิดได้แก่ Bond Elut C18 และ Oasis HLB ซึ่งมีราคาที่แตกต่างกัน พบว่า Bond Elut C18 มีความเหมาะสมในการใช้ SPE cartridge ในการสกัดเอสโตรเจนในน้ำ เนื่องจากมีราคาขายต่ำกว่าและให้ประสิทธิภาพในการสกัดเอสโตรเจนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ Oasis HLB

3. ความเข้มของแสงมีผลต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ ความเข้มข้นของเอสโตรเจนในน้ำมีค่าลดลง เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นจาก 60 ลักซ์ เป็น 90 ลักซ์ และ 120 ลักซ์ โดยเอสตราไดออลเกิดการสลายตัวได้ดีที่สุด รองลงไปที่เอสโตรรอล และเอสโตรน ตามลำดับ

4. พีเอชของสารละลายมีผลต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ โดยพบว่า การสลายตัวของเอสโตรเจนเกิดได้น้อยสุด เมื่อสารละลายมีค่าพีเอชเป็น 3 และเมื่อพีเอชของสารละลายมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 7 และ 10 ปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำเกิดได้ดีขึ้น

5. อุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ โดยพบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจาก  $20^{\circ}\text{C}$  เป็น  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ , และ  $60^{\circ}\text{C}$  ส่งผลให้เอสโตรเจนเกิดการสลายตัวได้ดีขึ้น ดังจะเห็นได้จากความเข้มข้นที่เหลือของเอสโตรนีน เอสตราไดออล และเอสโตรออลในน้ำมีค่าลดลง นอกจากนี้พบว่าเมื่ออุณหภูมิของสารละลายมีค่ามากกว่า  $30^{\circ}\text{C}$  เอสโตรเจนสามารถสูญเสียได้ด้วยกระบวนการอื่น นอกเหนือจากปฏิกิริยาโฟโตไลซิส

6. การศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายตัวในน้ำ พบว่าปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจนในน้ำ ณ อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  จัดเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่งเทียม (Pseudo First-order reaction) โดยมีค่าคงที่อัตราปฏิกิริยาการสลายตัวเท่ากับ  $0.0043 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0029 \text{ min}^{-1}$  และ  $0.0028 \text{ min}^{-1}$  สำหรับเอสตราไดออล เอสโตรออล และเอสโตรนีน ตามลำดับ

#### 4.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติหรือน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนเอสโตรเจน มาใช้ทดสอบความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SPE ร่วมกับฟลูออโรเมตรี
2. พัฒนารูปแบบที่สามารถตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นเอสโตรเจนในระดับที่ใกล้เคียงกับการปนเปื้อนในน้ำธรรมชาติ
3. ควรตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาโฟโตไลซิสของเอสโตรเจนในน้ำ
4. ควรศึกษาต้นทุนค่าใช้จ่ายและพลังงานที่ใช้ในการบำบัดเอสโตรเจนในน้ำด้วยปฏิกิริยาโฟโตไลซิส

### บรรณานุกรม

- ลาวัลย์ ศรีพงษ์. 2544. การวิเคราะห์เชิงฟลูออโรเมทรี. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร. หน้า 2-66.
- Adlercreutz H., Fostis Y., bannwart C., Hamalainen E., Bloigu S., Ollus A., 1986. Urinary estrogen profile determination in young Finnish vegetarian and omnivorous women. **J. Steroid. Biochem.** 24: 289-296.
- Aldo L., Alessandro B., Ilaria D.L., Angelo F., Giovanna F. Alessandra M., 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica. Chimica. Acta.** 501: 79-88.
- AOAC Peer Verified Method Program, 1993. **Manual on Policies and Procedures.** Arlington, USA.
- Belfroid A.C., van der Horst A., Vethaak A.D., Schafer A.J., Rijs G.B.J., Wegener J., Cofino W.P., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in the Natherlands. **Sci. Total. Environ.** 225: 101-108.
- Coleman H.M., Abdullah M.I., Egginsa B.R. and Palmer F.L. 2005. Photocatalytic degradation of 17 $\beta$ -oestradiol, oestriol and 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol in water monitored using fluorescence spectroscopy. **Appl. Catalyst. B** 55: 23-30.
- Coleman H.M., Routledge E.J., Sumpter J.P., Eggins B.R., Byrne J.A., 2004. Rapid loss of estrogenicity of steroid estrogens by UVA photolysis and photocatalysis over an immobilized titanium dioxide catalyst. **Water Research.** 38: 3233-3240.
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldock M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. I. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environ. Sci. Technol.** 32: 1549-1558.
- Franke R. and Franke C., 1999. Model reactor for photocatalysis degradation of persistent chemicals in ponds and waste water. **Chemosphere.** 39: 2651-2659.
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Gómez, M.J., Malato, O., Aqüera, A., Fernández-Alba, A.R. 2004. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivertization and gas chromatography-tandem mass

spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. **J. Chromatogr. A.** 1047: 129-135.

Isobe T., Shiraishi H., Yasuda M., Shinoda A., Suzuki H., Morita M., 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** 984: 195-202.

Johnson A.C., Belfroid A., Di Corcia A., 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Sci. Total. Environ.** 256: 163-173.

Jurgens M.D., Holthaus K.E., Johnson A.C., Smith J.J.L., Hetheridge M., Williams R.J., 2002. The potential for estradiol and ethylestradiol degradation in English rivers. **Environ. Toxicol. Chem.** 21: 480-488.

Korner W., Bolz U., Sussmuth W., Hiller G., schuller W., Hanf V., Hagemaiier H., 2000. Input/Output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. **Chemosphere.** 40: 1131-1142.

Liu B., and Liu X., 2003. Direct photolysis of estrogens in aqueous solution. **Sci. Total. Environ.** 320: 269-274.

Maelle, C., Daniel, P., Asmaa, M.S., Sara, T.K., Yves, L., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). **Sci. Total. Environ.** 324: 55-66.

Matcalfe C.D., Metcalfe T.L., Kiparissis Y., Koenig B.G., Khan C., Hughes R.J., Croley T.R., March R.E., Potter T., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environ. Toxicol. Chem.** 20, 297-308.

Pawlowski, S., Ternes, T.A., Bonerz, M., Rastall, A.C., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2004. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. **Toxicol. In Vitro.** 18: 129-138.



Quintana, J.B., Carpinteiro, J., Rodriguez, I., Lorenzo, R.A., Carro, A.M., Cela, R. 2004.

Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. **J. Chromatogr. A.** 1024: 177-185.

Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P., 1998.

Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. **Environ. Sci. Technol.** 32: 1559-1565.

Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. 1993. **Environmental Organic Chemistry.** New York: John Wiley & Sons, Inc.

Segmuller B.E., Armstrong B.L., Dunphy R., Oyler A.R., 2000. Identification of autoxidation and photodegradation products of ethynylestradiol by on-line HPLC-NMR and HPLC-MC. **J. Pharmaceutical Anal.** 23: 927-937.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้