สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในน้ำนมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

T107769

นางสาวบุญหทัย ฉัตร์วีระสกุล
นางสาวอธิชา จันทร์ลา

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ส15947
2548

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 107769
วัน,เดือน,ปี 10 พ.ค. 2553

b 17210229
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of Tetracycline in milk by High-Performance Liquid Chromatography

Boonhatai Chutvirasakul

Athicha Chanla

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง	การตรวจวัดปริมาณเตตราซัยคลินในน้ำนมวัวด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง
นักศึกษา	บุญหทัย ฉัตร์วีระสกุล
	อธิชา จันทร์ลา
ภาควิชา	เคมี คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล	.....
กรรมการ	ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ	.....
กรรมการ	ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์	.....

.....

(ผศ.ดร.ประยงค์ ดวงดี)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง	การตรวจวัดปริมาณเตตราซัยคลินในน้ำ-นมวัวด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง	
นักศึกษา	นางสาวบุญหทัย	ฉัตร์วีระสกุล
	นางสาวอธิชา	จันทร์ลา
ภาควิชา	เคมี	คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์	
ปีการศึกษา	2548	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.คณิตา	ตังคณานุรักษ์

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการปรับสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคโครมาโท - กราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography) ด้วยการตรวจวัดยูวี (HPLC–UV) เพื่อการตรวจวัดเตตราซัยคลิน (Tetracycline) ในน้ำนมวัว น้ำนมตัวอย่างถูกสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Solid phase extraction (SPE) C_{18} Cartridge และทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ HPLC-UV ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ใช้ กรดออกซาลิก- แอซิโทไนไทรล์ – เมทานอล (75:18:7, ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 0.1 โมลต่อลิตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้คอลัมน์ C_{18} (เส้นผ่าศูนย์กลาง 250×4.60 นาโนเมตร และขนาดอนุภาค 5 ไมครอน) ความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวัดได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ (LOQ) มีค่าอยู่ในช่วง 75-400 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร และความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) มีค่าอยู่ระหว่าง 50-75 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงของสารที่เราสนใจ ; ไม่มีสิ่งรบกวนปรากฏในช่วงเวลาของรีเทนชัน ความถูกต้องของวิธี (accuracy) แสดงในรูปของค่าร้อยละการได้คืนกลับ (% recovery) อยู่ในช่วง 79.1233-84.1283% (n=3)สำหรับเตตราซัยคลินจากตัวอย่างที่ถูกเติม (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น (75, 250 and 400 ppb) ความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์มีค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 1% ค่าเหล่านี้แสดงถึงความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์วิธีนี้

คำสำคัญ : เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography), เตตราซัยคลิน (Tetracycline), Solid phase extraction (SPE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Determination of Tetracycline in bovine milk by High-Performance Liquid Chromatography
Name	Boonhatai Chutvirasakul
	Athicah Chanla
Department	Chemistry Faculty of Science
Program	Industrial Chemistry-Analytical Instrumentation
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Asst.Prof. Kanita Tungkananuruk

ABSTRACT

This special project is aimed to study the optimization of a High-performance liquid chromatography with UV detection method (HPLC–UV) for determination of tetracycline in bovine milk. Milk samples were extracted and purified using a solid-phase extraction C_{18} cartridge and analysed using HPLC–UV set at 360 nm. The analyses were carried out using the mobile phase of 0.01 *M* oxalic acid–acetonitrile–methanol (75:18:7, v/v/v) on a C_{18} column (250×4.60 mm i.d. and 5 μm). The limits of quantitation (LOQ) are approximately 75-400 ng/mL and the limits of detection (LOD) are 50-75 ng/mL, depending on the compound ; no interferences are present at their retention times. Accuracy expressed in term of recoveries were in the range from 79.1233 to 84.1283 % (n=3) for tetracycline from spiked samples at the 3 concentrations (75, 250 and 400 ppb). Precision of method in terms of the relative standard deviation is not more than 1%. This figures of merit indicated the validity of this method.

Keyword : High-performance liquid chromatography, tetracycline, solid-phase extraction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงงานพิเศษสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีในครั้งนี้ สืบเนื่องจากการได้รับการดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือ การอำนวยความสะดวก และการแนะนำที่เป็นประโยชน์ของคณาจารย์และผู้ที่เกี่ยวข้องแก่ผู้จัดทำ ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์ เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหา เอาใจใส่ดูแล ตลอดจนการให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล และ ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ อาจารย์และคณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษที่ให้ความกรุณาแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้การทำโครงงานพิเศษนี้ดำเนินไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านในคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ และให้คำแนะนำที่ดีในการทำโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้คำปรึกษาที่ดีและให้กำลังใจมาโดยตลอด ขอบคุณเพื่อนในภาควิชาเคมีทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลืออย่างดีตลอดการทำโครงงานพิเศษ

นอกจากนี้บุคคลที่มีส่วนช่วยที่มิได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

นางสาวบุญหทัย ฉัตร์วีระสกุล

นางสาวอธิชา จันทร์ลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัย	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 เตตราซัยคลิน	5
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	8
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	8
3.2 สารเคมี	8
3.3 วิธีการเตรียมสารละลาย	9
3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC	10
3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิค SPE	11
3.6 การเตรียมกราฟมาตรฐาน	12
3.7 การประเมินผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ	12
3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างนม	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	14
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC	14
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิค SPE	15
4.3 การประเมินผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ	15
4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างนม	17
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	22
ภาคผนวก ก. เตตราซัยคลินและอนุพันธ์	22
ภาคผนวก ข. Solid Phase extraction (SPE)	31
ภาคผนวก ค. เทคนิควิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง	39
ภาคผนวก ง. สเปกตรัมที่ได้จากการทดลอง	53
ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลอง	54
ภาคผนวก จ. กราฟมาตรฐานของเตตราซัยคลินที่ได้จากการทดลอง	63
ภาคผนวก ฉ. ผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ	64
ภาคผนวก ช. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.4 ขั้นตอนการวิจัย	4
4.1 แสดงผลการศึกษาความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์	15
4.2 แสดงผลการศึกษาความแม่น (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์	16
4.3 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินที่ตกค้างในตัวอย่างนม	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงสูตรโครงสร้างของเตตราซัยคลิน	5
4.1 แสดงผลการศึกษาการตอบสนองเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ผ่านการสกัดด้วย Solid Phase Extraction (SPE)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ปัญหาและสถานภาพของยาและสารตกค้างในน้ำนมในแต่ละประเทศหรือแต่ละภูมิภาคของโลกอาจเหมือนหรือแตกต่างกันด้วยปัจจัยหลายประการ เช่น ในประเทศซึ่งมีการสั่งห้ามใช้สารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์แกโนคลอรีนย่อมมีอุบัติการณ์ของการตรวจพบสารดังกล่าวในน้ำนมลดลงไปด้วย ปัญหายาและสารตกค้างในน้ำนมของประเทศไทย อาจแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

1. ยาสัตว์ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ ยาต้านจุลชีพ ยาถ่ายพยาธิและยากำจัดพยาธิภายนอก รวมทั้งยาฆ่าเชื้อที่ใช้ทำความสะอาดเต้านมและหัวนมโค
2. สารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน
3. ยาฆ่าแมลงหรือสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกโนคลอรีน
4. โลหะหนักและมลพิษในสิ่งแวดล้อม เช่น ตะกั่ว และ ไดอ๊อกซิน (Dioxin)

ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคเต้านมอักเสบและโรคติดเชื้ออื่น ๆ ในโคนมอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในประเทศไทยเนื่องจากยังไม่มีกฎหมายควบคุมการใช้ยา ทำให้เกษตรกรหรือผู้เลี้ยงสัตว์สามารถหาซื้อยาเหล่านี้ได้อย่างเสรี ผลกระทบที่อาจเกิดจากการใช้ยาดังกล่าวคือ การมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพตกค้างอยู่ในน้ำนมดิบ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการได้แก่ การใช้ยาในปริมาณที่สูงเกินไปหรือบ่อยเกินไป ทำให้ระดับยาในน้ำนมสูงเกินระดับปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ (Maximum Residue Limits , MRL_s) โดยอาจมีสาเหตุมาจากในระยะที่มีการรีดนม เกษตรกรละเลยการหยุดใช้ยาในเวลาที่เหมาะสม (Withdrawal period) หรือการที่แม่โคบางตัวมีระยะขจัดยานานกว่าปกติ หรืออาจเกิดการปนเปื้อนน้ำนมที่มีระดับปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ (Maximum Residue Limits , MRL_s) ตกค้าง

ในงานวิจัยมุ่งเน้นการหาปริมาณสารตกค้างในตัวอย่างน้ำนมที่เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลิน (Tetracycline) คือ เตตราซัยคลิน (Tetracycline) ซึ่งจัดเป็นยาปฏิชีวนะที่มีความปลอดภัยสูง ถ้าใช้อย่างถูกต้องตามขนาดและระยะเวลาที่กำหนดไว้คือ ตามประกาศของคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข อนุญาตให้มียาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ตกค้างอยู่ได้ไม่เกิน 100 ppb [3]

อันตรายที่เกิดจากอาหารที่มียาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ตกค้างเกินที่กำหนด [3] คือ ตัวยาอาจไปตกค้างในน้ำนมและในเนื้อซึ่งจะทำให้เราได้รับสารพิษโดยตรง การแพ้ (Allergic reaction) โดยจะพบอาการดังกล่าวตั้งแต่มีผื่นคัน (Urticaria) ผิวหนังอักเสบ (Dermatitis) หายใจลำบากจากเยื่อบุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางเดินหายใจมีอาการบวมน้ำ (Edema) ไปจนถึงอาการแพ้ที่รุนแรงได้แก่สภาวะอนาไฟแลคติคช็อค (Anaphylactic shock) ที่เป็นอันตรายถึงชีวิตได้

จากอันตรายหรือความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลินตกค้างในอาหาร โดยเฉพาะในน้ำนมซึ่งเป็นอาหารที่มีความจำเป็นต่อมนุษย์ทุกเพศทุกวัย และประกอบกับความนิยมใช้ เตตราซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะ คณะผู้วิจัยจึงได้เห็นความสำคัญของการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในน้ำนมโดยใช้เทคนิคที่มีความเหมาะสมคือ เทคนิควิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography , HPLC)

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อพัฒนาเทคนิควิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงให้มีความเหมะสมในการวิเคราะห์เตตราซัยคลิน

1.2.2 เพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำนมในท้องตลาดที่มีโอกาสมียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินตกค้างเกินมาตรฐานกำหนด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาคุณสมบัติและวิธีการวิเคราะห์เตตราซัยคลิน

1.3.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณเตตราซัยคลินโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เช่น เฟสเคลื่อนที่ โดยทดลองกับสารละลายมาตรฐานและเตรียมกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve Method)

1.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำนมโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

1.3.4 นำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (Mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation), การตอบสนองเป็นเส้นตรง (Linearity), ความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection), ความเที่ยงตรง (Precision), และความแม่นยำ (Accuracy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการวิจัย

งานที่ทำ	มิ.ย. 2548	ก.ค. 2548	ส.ค. 2548	ก.ย. 2548	ต.ค. 2548	พ.ย. 2548	ธ.ค. 2548	ม.ค. 2549	ก.พ. 2549	มี.ค. 2549
การศึกษาและค้นคว้าข้อมูล	←	—	—	→						
การจัดทำและเสนอเค้าโครงงานวิจัย				↔	↔					
การเตรียมอุปกรณ์และสารเคมี					↔	↔				
ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่						↔	↔			
การเก็บตัวอย่างนมโค							↔	↔		
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำการสกัดน้ำนมโดยใช้ SPE								↔	↔	
การตรวจวัดปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างน้ำนม ด้วยเทคนิค HPLC								↔	↔	
วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง									↔	↔
จัดทำรูปเล่มและเสนอโครงงานพิเศษ										↔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของเตตราซัยคลินที่มีอยู่ในน้ำนมด้วยความถูกต้องและแม่นยำ

2.เป็นแนวทางในการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ที่ตกค้างในอาหารต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

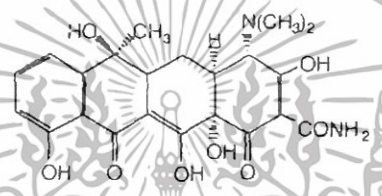
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เตตราซัยคลิน (Tetracycline)

Active Substance : Tetracycline Hydrochloride

Molecular formula : $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$

Molecular weight : 444



รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างของเตตราซัยคลิน

คุณสมบัติ : ลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้ดี ถูกทำลายได้ง่ายโดยสารละลายด่างแก่และสารละลายกรดที่มี pH ต่ำกว่า 2

การใช้ยา : ใช้เป็นยาปฏิชีวนะรักษาโรคติดชื้ออย่างเฉียบพลันในวัว สิวอักเสบ ใช้ขจัดแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ เช่น ปอดบวม โรคที่เป็นสาเหตุจากการติดเชื้อ *rickettsiosis* โรคติดเชื้อแบคทีเรียจำพวก *Brucella* ซึ่งทำให้สัตว์แท้งได้ โรคปอดอักเสบซึ่งเกิดจากเชื้อ *chlamydia* และโรคที่เกิดจากติดเชื้อแบบไม่รุนแรงซึ่งมีสาเหตุจาก การไวต่อแบคทีเรียแกรมลบรูปทรงกลมและแบคทีเรียแกรมบวกรูปทรงกลมโดยจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคปอดบวม

ผลข้างเคียง : **ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน** ตัวยาเตตราซัยคลินจะไปยับยั้งการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *lymphoid* tissue แต่ยาจะไม่มีผลทำลายภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดมาจากแม่ผ่านทางน้ำนมเหลือง ดังนั้นจึงไม่ควรฉีดยานี้ก่อนฉีดวัคซีน 2 วัน และหลังจากฉีดวัคซีนแล้ว 10 วัน

ผลต่อกระดูกและฟัน ตัวยาเตตรซัยคลินจะเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของกระดูกและฟัน โดยที่ตัวยาจะไปเกาะกับแคลเซียมในกระดูกและฟันเพื่อเกิดเป็นสารเชิงซ้อน ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ยานี้กับลูกสัตว์ที่มีอายุน้อย เพราะยากลุ่มนี้จะทำให้สี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของฟันผิดปกติเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและกระดูกเปราะได้ นอกจากนี้ไม่ควรใช้ยานี้กับสัตว์ที่กำลังตั้งท้อง เพราะยาบางส่วนจะผ่านรกไปยังลูกอ่อนและไปเกาะกับแคลเซียมในกระดูกของลูกอ่อนได้

ผลของการใช้ยาที่มีต่อสิ่งแวดล้อม ตัวยาเตตรซัยคลินที่ผสมในอาหารไม่ว่าจะเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูป หรืออาหารสด พบว่า ประมาณ 20-30% ของยาที่ผสมในอาหารเท่านั้นที่สัตว์น้ำจะได้รับเข้าไป ส่วนที่เหลือของยาบางส่วนก็อาจจะลายน้ำและรวมตัวกับสารต่างๆ รวมทั้งตะกอนดินในน้ำบริเวณที่มีการเลี้ยงปลา ซึ่งอาจมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในบริเวณดังกล่าว ซึ่งอาจทำให้เชื้อเหล่านี้ดื้อยาและได้มีการศึกษาผลของแสงที่มีต่อการสลายตัวของยา จากการศึกษาพบว่าทั้งอุณหภูมิและแสงสว่างมีผลต่อการสลายตัวของยาเตตราซัยคลินในน้ำทะเล

ข้อควรระวัง : ไม่ควรใช้ยาเพื่อป้องกันโรค ใช้ยาเมื่อมีความจำเป็นเท่านั้น ควรตรวจวินิจฉัยโรคก่อนใช้ยา เลือกใช้ยาให้เหมาะสมกับโรค ควรใช้ยาที่จดทะเบียนอย่างถูกต้องกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อ.ย.) ไม่ควรใช้ยาที่โฆษณาออกฤทธิ์ครอบจักรวาล ใช้ยาตามเอกสารกำกับยา ไม่ควรใช้ยาในปริมาณที่สูงหรือต่ำกว่าปริมาณที่แนะนำ

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

A.L. Cinquina และ คณะ (2003) [8] ศึกษาการเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อให้เป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมและทำให้มีผลดีต่อการตรวจหาสารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำนมและเนื้อเยื่อของวัว น้ำนมและเนื้อเยื่อตัวอย่างจะถูกสกัดและทำให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ solid-phase extraction HLB Oasis cartridge และทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัด ยูวี ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ใช้กรดออกซาลิก- อะซิโทไนไทรล์-เมทานอล (60:25:15 , ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 0.1 โมลต่อลิตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้ Column C_8 (250×4.6 nm เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร) ค่าร้อยละการได้คืนกลับ (% recovery) ของสารกลุ่มเตตราซัยคลินจากสารตัวอย่างที่ถูก spike 3 ความเข้มข้น (0.5 , 1 และ 1.5) ของกำหนดระดับปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์น้ำนมต้องสูงกว่า 81.1% และในกล้ามเนื้อต้องสูงกว่า 83.2% เพื่อให้ผลเป็นที่ยอมตามข้อตกลงของสหภาพยุโรป

Wendy C. Andersen และคณะ (2004) [9] ตรวจหาเตตราซัยคลินที่ตกค้างในกุ้งและนมที่มีไขมันเนย โดยใช้ลิควิดโครมาโทกราฟีด้วยการ ตรวจวัดแสงยูวี และการหาระดับสารตกค้างด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมสสเปกโทรมิเตอร์ 2 วิธีที่ถูกพัฒนาเพื่อการตรวจวัดเตตราซัยคลิน, ออกซีเตตราซัยคลิน และ คลอโรเตตราซัยคลิน ในกุ้งและนมที่มีไขมันเนย วิธีเหล่านี้ถูกออกแบบการสกัดตัวอย่างและขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ให้ง่ายและรวดเร็วและสะดวกในการทดสอบประจำวันตามข้อกำหนด ทั้งสองวิธีนี้ใช้การสกัดเมทริกซ์ของกุ้งและนมที่ง่ายด้วยกรดซัคซินิค ตามด้วยการแยกบนเฟสของแข็งของโคพอลิเมอร์ที่อยู่ในคอลัมน์การสกัด การแยกโครมาโทกราฟีทำได้โดยใช้คอลัมน์ C_8 กับเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยกรดอินทรีย์, อะซีโทไนไทรล์ และเมทานอล ซึ่งประกอบด้วย 0.1%กรดฟอร์มิค หรือ 0.1%กรดออกซาลิค ซึ่งในบรรดา 3 ตัวที่ตกค้างกรดฟอร์มิคถูกยืนยันได้โดยตรง ด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเด็มแมสสเปกโทรมิเตอร์ (liquid chromatography-tandam mass spectrometry, LC-MS-MS) ลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีค่าการดูดกลืนแสงยูวี 370 นาโนเมตรให้ผลในการหาปริมาณสารตกค้างของสารทั้ง 3 ตัวจากกุ้งและตัวอย่างนมความเข้มข้นที่ 50, 100, 200, 300 และ 400 นาโนกรัมต่อกรัม ค่าเฉลี่ยร้อยละการได้คืนกลับมีค่ามากกว่า 75% ค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 10% สารตกค้างทั้ง 3 พบว่าในตัวอย่างกุ้ง (25-400 นาโนกรัมต่อกรัม) และนม (50-300 นาโนกรัมต่อกรัม) โดย LC-MS-MS

White CR และ คณะ (1993) [10] วิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลว (liquid chromatographic,LC) ถูกพัฒนาสำหรับการศึกษาทั้งทางปริมาณและทางคุณภาพของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน (oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline) ในน้ำนม น้ำนมตัวอย่าง (5 มิลลิลิตร) ถูกนำไปกำจัดเอาโปรตีนออกโดยการเติมกรดไฮโดรคลอลิก เข้มข้น 1 N จำนวน 1 มิลลิลิตร และอะซีโทไนไทรล์ 24 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรอง แล้วนำส่วนที่ได้จากการกรองไปเติมด้วย ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน 15 มิลลิลิตร จากนั้นแยกเอาชั้นน้ำออก และล้างชั้นอินทรีย์ที่เหลือด้วยน้ำปราศจากไอออนและจากนั้นนำไปรวมกับชั้นน้ำที่แยกไว้แล้วแล้วปรับปริมาณเป็น 4 มิลลิลิตร นำสารตัวอย่างที่เตรียมมา 1000 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง LC ความเข้มข้นน้อยสุดที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้คือ 5 ppb ของสารในกลุ่มตตราซัยคลินทั้งสามตัว และไม่มีตัวรบกวนที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่สนใจ ค่าร้อยละการได้คืนกลับที่ได้จากการ spike น้ำนมในช่วงความเข้มข้น 0.01-1 ppm คือ 87 – 99 % และค่าความเที่ยงตรงก็ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ (High-performance liquid chromatography, HPLC) ปั๊มรุ่น P1000 Isocratic pumps, ตัวตรวจวัดยูวี รุ่น UV 1000 ของบริษัท Shimadzu
2. คอลัมน์ Luna C_{18} ของบริษัท Phenomenex ขนาด 250×4.60 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5.0 ไมครอน
3. เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectroscopy) รุ่น UV 160 ของบริษัท Shimadzu
4. เครื่องกรองแบบสุญญากาศพร้อมขวดกรองแบบสุญญากาศ 1000 มิลลิลิตร
5. กระดาษกรอง เบอร์ 2 ขนาด 70 มิลลิเมตร ของบริษัท Toyo Roshi Kaisha, Ltd.
6. เข็มฉีด ขนาด 60 ไมโครลิตร
7. Syring cartridge พร้อมกระดาษกรองที่มีขนาดรู 0.45 ไมครอน บริษัท Natinal Solentific
8. เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-254 บริษัท Denver Instrument Company
9. เครื่องอุลตร้าโซนิค (Ultrasonic bath) บริษัท Fisher Scienctific Worldwide
10. SPE C_{18} Cartridge , 500 มิลลิกรัม , 3 มิลลิลิตร ของบริษัท Vertical chromatography
11. เครื่องแก้ว

3.2 สารเคมี

1. สารมาตรฐานเตตราซัยคลิน (Tetracycline,$C_{22}H_{24}N_2O_8$) ความบริสุทธิ์ ≥ 95.0% ยี่ห้อ Fluka BioChemika
2. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) HPLC grade ของบริษัท Carlo Erba
3. อะซีโทไนไทรล์ (Acetonitrile, C_2HBr_2N) HPLC grade ของบริษัท Carlo Erba
4. กรดออกซาลิก (Oxalic acid, $C_2H_2O_4$) Reagent grade ของบริษัท Merck

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายเฟสเคลื่อนที่กรดออกซาลิก : เมทานอล : แอซิโทไนไทรล์

นำสารละลายกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร (กรดออกซาลิก 2.5214 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรจนเป็น 1 ลิตร) เมทานอล และ อะซิโทไนไทรล์ ที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องสุญญากาศเรียบร้อยแล้ว มาเตรียมเป็นสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราส่วนสารละลายกรดออกซาลิก : อะซีโทไนไตรด์ : เมทานอล เท่ากับ 60:25:15 และ 75:18:7 สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำไปไล่แก๊สในเครื่องอุลตร้าโซนิค เป็นเวลา 20 นาที

3.3.2 สารละลายมาตรฐานสต็อกเตตราซัยคลิน เข้มข้น 500 ppm

ชั่งสารมาตรฐานเตตราซัยคลินมา 0.05 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วย เมทานอล เก็บไว้ที่ -20°C สารละลายจะคงสภาพได้อย่างน้อย 4 สัปดาห์

3.3.3 สารมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 50 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานสต็อกเตตราซัยคลิน เข้มข้น 500 ppm มา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่

3.3.4 สารมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 500 ppb

ปิเปตสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 50 ppm จากข้อ 3.3.3 มา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่

3.3.5 สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 1000 ppb

ปิเปตสารมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 50 ppm จากข้อ 3.3.3 มา 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรจนเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่

3.3.6 สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ที่ความเข้มข้น 50, 75, 100, 125, 250, 375 และ 400 ppb สำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 500 ppb จากข้อ 3.3.4 มา 100, 150, 200, 250 500, 750 และ 800 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ไมโครลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 การเตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำนม

3.3.7.1เตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำนมสำหรับศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 1000 ppb มา 800 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตน้ำนมตัวอย่าง 1200 ไมโครลิตร จะได้น้ำนมที่มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน 400 ppb จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.7.2เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 75, 250 และ 400 ppb

โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 1000 ppb จากข้อ 3.3.5 มา 150, 500 และ 800 ไมโครลิตร เติมลงในตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 1850, 1500 และ 1200 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน เตรียมซ้ำอีก 1 ชุด

3.3.7.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างนมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

จากน้ำนมตัวอย่าง 6 แหล่ง ปิเปตตัวอย่างน้ำนมจากแต่ละแหล่ง 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน เตรียมซ้ำอีก 1 ชุด

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการวิเคราะห์เตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิค HPLC

3.4.1 การศึกษาหาความยาวคลื่นของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโครปี

ศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 50 ppm สแกนหาค่าความยาวคลื่นของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยใช้เมทานอลเป็นแบลงค์

3.4.2 การศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ทดสอบหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่มีอัตราส่วนต่างๆ กัน ดังนี้ 60:25:15 และ 75:18:7 โดยปริมาตร โดยการทดลองใช้สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 50 ppm ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิค SPE

3.5.1 การเตรียมสารที่บรรจุใน SPE C_{18} cartridge ให้พร้อมใช้งาน

ปิเปตเมทานอล 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน SPE C_{18} Cartridge ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ค่อย ๆ ปล่อยสารละลายออกมาอย่างช้า ๆ จนสังเกตว่ามีเมทานอลเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย จึงหยุดปล่อยสารละลายออกมา จากนั้นทำการเติมน้ำปราศจากไอออน 15 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ ปล่อยสารละลายออกมาเช่นเดิมโดยห้ามปล่อยให้ cartridge แห้ง

3.5.2 การใส่ (Load) สารตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำนมที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.7.1 มา 2 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ปล่อยสารละลายออกจาก SPE C_{18} cartridge อย่างช้า ๆ ปล่อยออกจน cartridge แห้ง และทิ้งไว้ 3 นาที

3.5.3 การล้าง (Rinse) สารตัวอย่าง

เปลี่ยนภาชนะที่ใช้รองรับ จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร ลงใน SPE C_{18} cartridge ปล่อยน้ำที่เติมลงไปอย่างช้าๆ นำสารละลายที่เก็บไปกรองและตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อตรวจว่ามีสารเตตราซัยคลินถูกชะออกมาหรือไม่

3.5.4 การชะ (Elution) เตตราซัยคลิน

เปลี่ยนภาชนะที่ใช้รองรับจากนั้นทำการเติมเมทานอล 2 มิลลิลิตร SPE C_{18} cartridge ค่อย ๆ ปล่อยออกมาอย่างช้าๆ จนเมทานอลแห้ง เปลี่ยนภาชนะรองรับ เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร ปล่อยเม-ทานอลที่เติมลงไปอย่างช้าๆ นำสารละลายเมทานอลที่ปล่อยออกมา 1 มิลลิลิตรไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้ง จากนั้นนำมาปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรอง และฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สังเกตโครมาโทรแกรมที่ได้ถ้ามีพีกของเตตราซัยคลินปรากฏก็ให้ทำการเพิ่มเมทานอลทีละ 1 มิลลิลิตร และทำซ้ำขั้นตอนเดิม จนไม่ปรากฏพีกของเตตราซัยคลินในโครมาโทแกรม แสดงว่าปริมาตรเมทานอลที่ใช้ทั้งหมดนั้นเหมาะสมในการชะเตตราซัยคลินที่อยู่ในน้ำนมตัวอย่าง

3.6 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

3.6.1 กราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ที่ผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge

นำสารละลายมาตรเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น จากข้อ 3.3.6 มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge จากนั้นนำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยเฟส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรอง และฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ 6 ซ้ำ ต่อ 1 ชุด

3.7 การประเมินผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ

3.7.1 ความเที่ยง (Precision) จากร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

ศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐานจากข้อ 3.3.6 มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้นต่างๆ กัน

3.7.2 ความแม่น (Accuracy) จากร้อยละการได้คืนกลับ (% recovery)

นำชุดสารละลายน้ำนมที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.7.2 แต่ละชุด มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ต่อ 1 ชุด และคำนวณและแสดงค่าความแม่นโดยการเทียบปริมาณเตตราซัยคลินที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ คิดเป็นร้อยละการได้คืนกลับของปริมาณเตตราซัยคลินที่เติมลงไป (% recovery)

3.7.3 การศึกษาการตอบสนองความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐานจากข้อ 3.3.6 มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีก

3.7.4 ความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection)

ศึกษาโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ทราบปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์และวัดสัญญาณในระดับความเข้มข้นต่ำที่ทราบค่า แล้วกำหนดเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยใช้อัตราส่วนของ signal-to-noise ratio เป็น 2:1 หรือ 3:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.5 ความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวัดได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ (limit of quantitation)

ศึกษาโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ทราบปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์และวัดสัญญาณในระดับความเข้มข้นต่ำที่ทราบค่า แล้วกำหนดเป็นความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวัดได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ โดยใช้อัตราส่วนของ signal-to-noise ratio เป็น 10:1

3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างนม

ปิเปตสารละลายตัวอย่างนมจากข้อ 3.3.7.3 มา 2 มิลลิลิตร ผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge จากนั้นนำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรอง และฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ 2 ซ้ำต่อ 1 ชุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการวิเคราะห์เตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิค HPLC

4.1.1 การศึกษาหาความยาวคลื่นของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตโฟโตมิเตอร์

การทดสอบใช้สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 50 ppm สแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

จากการทดสอบพบว่า ความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน คือ 360 นาโนเมตร

4.1.2 การศึกษาอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่

สืบเนื่องจากงานวิจัยของ A.L. Cinquina et al. [8] และ Wendy C. Andersen et al. [9] พบว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 60:25:15 และ75:18:7 โดยปริมาตร สามารถแยกสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบสารละลายที่อัตราส่วนดังกล่าว โดยใช้สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 50 ppm ในการทดสอบ

จากการทดสอบพบว่า เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล ที่อัตราส่วน 60:25:15 โดยปริมาตร นั้นไม่สามารถแยกสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินได้ แต่เฟสเคลื่อนที่ที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร สามารถแยกสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินได้

ดังนั้นจึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่สารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไตรด์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร เนื่องจากมีความแรงของตัวทำละลายสำหรับการแยกเหมาะสมที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิค SPE

จากการศึกษาพบว่า

ขั้นการเตรียม SPE C_{18} Cartridge ให้อยู่ในสภาวะที่ใช้งานได้ต้องผ่านเมทานอล 5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน 15 มิลลิลิตร

ขั้นการใส่ (Load) สารตัวอย่าง ใช้สารละลายตัวอย่างน้ำนม 2 มิลลิลิตร

ขั้นการล้าง (Rinse) สารตัวอย่างใช้น้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร

ขั้นการชะ (Elution) เตตราซัยคลิน ใช้เมทานอล 3 มิลลิลิตร

4.3 การประเมินผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ

4.3.1 ความเที่ยง (Precision) จากร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

ศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังแสดงในตาราง 4.2

สารละลายมาตรฐาน	RSD (%) (n=6)
เตตราซัยคลิน (ppb)	Repreatability
75	0.0861
125	0.1708
250	0.1008
375	0.1603
400	0.0153

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการศึกษาความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

4.3.2 ความแม่น (Accuracy) จากร้อยละการได้คืนกลับ (% recovery)

นำชุดสารละลายน้ำนมที่เตรียมไว้ 3 ความเข้มข้น มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ต่อ 1 ชุด และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

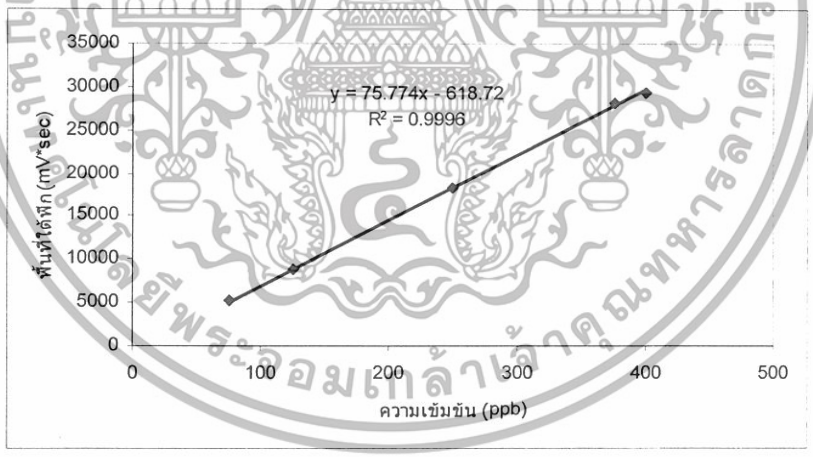
คำนวณและแสดงค่าความแม่นโดยการเทียบปริมาณเตตราซัยคลินที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ คิดเป็นร้อยละการได้คืนกลับของปริมาณเตตราซัยคลินที่เติมลงไป (% recovery) ดังแสดงในตาราง 4.1

ปริมาณเตตราซัยคลิน (ppb)	Recovery (%) (n=3)
150	84.1283
250	79.1233
400	83.4457

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาความแม่น (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

4.3.3 การศึกษาการตอบสนองความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีก และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.1 แสดงผลการศึกษาการตอบสนองเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ผ่านการสกัดด้วย Solid Phase Extraction (SPE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.3.4 ความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection)

ศึกษาโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 50 ppb ทำการวัดสัญญาณจากสารละลายมาตรฐานเทียบกับแบลงค์ ซึ่งพบว่าค่าอัตราส่วนของ signal-to-noise ratio เป็น 2:1 ดังนั้นจึงกำหนดความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection) คือ 50 ppb

4.3.5 ความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวัดได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ (limit of quantitation)

ศึกษาโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 75 ppb ทำการวัดสัญญาณจากสารละลายมาตรฐานเทียบกับแบลงค์ ซึ่งพบว่าค่าอัตราส่วนของ signal-to-noise ratio เป็น 8.5:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกับค่าอัตราส่วนของ signal-to-noise ratio ที่ยอมรับได้คือ 10:1 ดังนั้นจึงกำหนดความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection) คือ 75 ppb

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างนม

นำสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3.3.7.3 2 มิลลิลิตร มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยฉีดซ้ำจำนวน 3 ซ้ำโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด และคำนวณหาปริมาณเตตราซัยคลินที่ตกค้างในตัวอย่างนมทั้ง 6 ตัวอย่าง ดังแสดงในตาราง 4.4

ตัวอย่างนม	ปริมาณเตตราซัยคลินที่ตกค้าง (ppb)
แหล่งที่ 1	ND
แหล่งที่ 2	210.9297
แหล่งที่ 3	ND
เมจิ	ND
โฟโมสต์	ND
ไทยเดนมาร์ก	96.8679

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินที่ตกค้างในตัวอย่างนม

หมายเหตุ ND = Non Detect

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
107769

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาหาความยาวคลื่นของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 50 ppm สแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด พบว่า ความยาวคลื่นของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 360 นาโนเมตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกในการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลิน จากการเปรียบเทียบผลการศึกษาเฟสเคลื่อนที่โดยใช้ สารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 60:25:15 และ 75:18:7 โดยปริมาตร พบว่า สารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร มีความแรงของตัวทำละลายสำหรับการแยกที่เหมาะสม โดยใช้เวลารีเทนชัน 6.50 นาที โดยให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิค SPE ทดสอบโดยใช้นมที่มีเตตราซัยคลินอยู่ 400 ppb ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พบว่าขั้นตอนที่เหมาะสมเป็นดังนี้

ขั้นการเตรียม SPE C_{18} Cartridge ให้อยู่ในสภาวะที่ใช้งานได้ต้องผ่านเมทานอล 5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน 15 มิลลิลิตร

ขั้นการใส่ (Load) สารตัวอย่าง ใช้สารละลายตัวอย่างน้ำนม 2 มิลลิลิตร

ขั้นการล้าง (Rinse) สารตัวอย่างใช้น้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร

ขั้นการชะ (Elution) เตตราซัยคลิน ใช้เมทานอล 3 มิลลิลิตร

จากการศึกษาความเที่ยง (Precision) จากร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) โดยใช้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 75, 125, 250, 375 และ 400 ppb มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้ดังนี้ 0.0861, 0.1708, 0.1008, 0.1603 และ 0.0153 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาความแม่น (Accuracy) จากร้อยละการได้คืนกลับ (% recovery) โดยนำชุดสารละลายนมที่เตรียมไว้ความเข้มข้น 75, 250 และ 400 มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ต่อ 1 ชุด และคำนวณและแสดงค่าความแม่นโดยการเทียบปริมาณเตตราซัยคลินที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ คิดเป็นร้อยละการได้คืนกลับของปริมาณเตตราซัยคลินที่เติมลงไป (% recovery) ได้ดังนี้ 84.1283, 79.1233 และ 83.4457 ตามลำดับ

การศึกษาการตอบสนองความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินในช่วงความเข้มข้น 75-400 ppb ทำให้ทราบถึงสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ซึ่งกราฟมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดจะเป็นกราฟมาตรฐานค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่าใกล้เคียง 1 ในการทำการวิเคราะห์ได้ กราฟมาตรฐานที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9996

การศึกษาความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection) โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 50 ppb ทำการวัดสัญญาณจากสารละลายมาตรฐานเทียบกับแบลงค์ ซึ่งพบว่าค่าอัตราส่วนของ signal-to-noise ratio เป็น 2:1 ดังนั้นจึงกำหนดความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection) คือ 50 ppb

การศึกษาความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวัดได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ (limit of quantitation) โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 75 ppb ทำการวัดสัญญาณจากสารละลายมาตรฐานเทียบกับแบลงค์ ซึ่งพบว่าค่าอัตราส่วนของ signal-to-noise ratio เป็น 8.5:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกับค่าอัตราส่วนของ signal-to-noise ratio ที่ยอมรับได้คือ 10:1 ดังนั้นจึงกำหนดความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection) คือ 75 ppb

การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างนม ทำโดยนำสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3.3.7.3 2 มิลลิลิตร มาผ่านการสกัดด้วย SPE C_{18} Cartridge นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและนำมาปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่เหมาะสม กรองและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยฉีดซ้ำจำนวน 3 ซ้ำโดยโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด และคำนวณหาปริมาณเตตราซัยคลินที่ตกค้างในตัวอย่างนมทั้ง 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างนมวัว 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างนมสดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ 3 ตัวอย่าง พบเตตราซัยคลินตกค้างอยู่ในตัวอย่างนมวัว 1 แหล่ง และตัวอย่างนมสดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ 1 ตัวอย่าง คือนมสดยี่ห้อ ไทยเดนมาร์ก โดยพบอยู่ในปริมาณ 210.9297 และ 96.8679 ppb ตามลำดับ ซึ่งปริมาณเตตราซัยคลินที่ตกค้างในตัวอย่างนมวัวแหล่งที่ 2 นั้นค่ามากเกินกว่ากำหนดระดับปริมาณยาตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ ในน้ำนม (MRL)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการศึกษาสภาวะที่จะใช้ในการวิเคราะห์ให้เหมาะสมมากที่สุดเพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์

5.2.2 ควรทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารเตตราซัยคลินในน้ำนมด้วย SPE เพื่อให้ผลการสกัดที่ได้ออกมามีค่าร้อยละการได้คืนกลับ (% recovery) ใกล้เคียงค่า 100ให้ได้มากที่สุด

5.2.3 ควรทำการศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] กมลชัย ตรงวานิชนาม, **ยาต้านจุลชีพในสัตว์.** ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ช่อนนทรี. พ.ศ. 2543.

[2] แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์. พ.ศ. 2539.

[3] รุ่งทิพย์ ชวนชื่น และ เกรียงศักดิ์ สายธนู, **คุณภาพน้ำนมโคดิบ.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พ.ศ. 2541.

[4] สุทธาทิพย์ จันทรสกุล, **Analytical Method Validation.**[เอกสารอัดสำเนา] กรุงเทพฯ : [ม.ป.ป.].

[5] เพอชา เฮงตระกูล และปรีชญา เถาสุวรรณ. **การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Solid Phase Extraction.** ค้นเมื่อ 15 มกราคม 2549, จาก http://www.sithiporn.co.th/newweb/newsletter/31-3-2005-1112256707.pdf

[6] _____, และปรีชญา เถาสุวรรณ. **การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Solid Phase Extraction (ต่อ).** ค้นเมื่อ 15 มกราคม 2549, จาก http://www.sithiporn.co.th/newweb/newsletter/31-3-2005-1112256782.pdf

[7] ชูชีพ พึ่งสมวงศ์. **การเตรียมตัวอย่างโดยวิธี Solid Phase Extraction.** ค้นเมื่อ 15 มกราคม 2549, จาก http://www.sithiporn.co.th/newweb/newsletter/18-5-2005-1116388436.pdf

[8] A.L. Cinquina, F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti and R. Cozzani. "Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle" **Journal of Chromatography A.,** Vol. 987, 2003, pp. 227–233.

[9] Wendy C. Andersen, Jos´e E. Roybal, Steve A. Gonzales,Sherri B. Turnipseed, Allen P. Pfenning and Laura R. Kuck. "Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry" **Analytica Chimica Acta.,** Vol.529, 2005, pp.145–150.

[10] White CR, Moats WA, Kotula KL. "Optimization of a liquid chromatographic method for determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk" **Journal of AOAC International.,** Vol.76, 1993, pp. 549-54.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

เตตราซัยคลินและอนุพันธ์

การค้นพบยาต้านจุลชีพในสารกลุ่มเตตราซัยคลินเกิดขึ้นจากการตรวจสอบตัวอย่างบนดินที่รวบรวมมาจากแหล่งต่าง ๆ ของโลกเพื่อค้นหาเชื้อจุลชีพที่สร้างยาปฏิชีวนะได้โดยทีมนักวิจัยชาวอเมริกา 11 คน พวกเขาพบว่า เชื้อราในตระกูล *Streptomyces* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์วงกว้างได้ ยาตัวแรกในกลุ่มนี้ที่พวกเขาพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1948 คือคลอเตตราซัยคลิน ซึ่งแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* อีก 2 ปีต่อมาค้นพบออกซิเตตราซัยคลินโดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces rimosus* และได้มีการพิสูจน์ยืนยันว่า การที่ยาทั้ง 2 ชนิดมีการออกฤทธิ์และคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่เหมือนกันนั้นเนื่องมาจากโครงสร้างทางเคมีของยาทั้ง 2 ที่คล้ายกันนั่นเอง ต่อมาในปี ค.ศ. 1952 สามารถผลิตยากลุ่มนี้ในรูปกึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาได้โดยการดึงเอา chlorine atom ออกจากคลอเตตราซัยคลินยาที่ผลิตได้ใหม่เรียกว่าเตตราซัยคลินและได้นำชื่อนี้มาเป็นชื่อกลุ่มยานี้ด้วย

ปัจจุบันได้มีการผลิตยาในกลุ่มชนิดใหม่ขึ้นมาอีกหลายชนิด ได้แก่ ดอกซิซัยคลิน , เมทามัยซิน และมิโนมัยซิน เป็นต้น

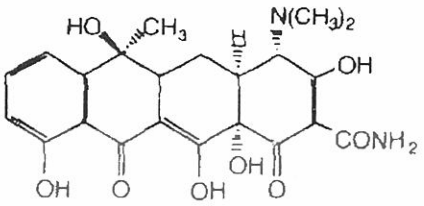
ก.1 คุณสมบัติของยา

กลุ่มยาเตตราซัยคลิน มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองรสขมและละลายน้ำได้จำกัดที่มี pH เท่ากับ 7 ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์สูงสุดที่ pH ระหว่าง 5.5-6 ภายใต้อุณหภูมิและ pH ที่ไม่เหมาะสม ยากลุ่มเตตราซัยคลินจะเกิดการสลายตัวโดยการเกิดทั้ง degradation และ rearrangement ของสูตรโครงสร้างทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการรักษาโรค นอกจากนี้ที่ pH ต่ำ (2.0-6.0) กลุ่มยานี้จะเกิด epimerization เกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วถ้า pH สูง กลุ่มยาเตตราซัยคลินจะเกิด isomerization ไปเป็น isotetracyclines โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาคลอเตตราซัยคลินจะเกิดการสลายตัวได้เร็วที่สุด จะเปลี่ยนเป็นไอโซคลอเทเตตราคลินทันทีที่ pH 7.5 คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของกลุ่มยานี้คือสามารถที่จะรวมตัวกับอิออนของพวกไดวาเลนท์และไตรวาเลนท์ เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ถ้าตัวยาเกิดการรวมตัวกับอิออนก่อนที่จะเกิดการสลายตัวในกระเพาะอาหารแล้วยาก็จะไม่มีการดูดซับเข้าสู่กระแสโลหิต

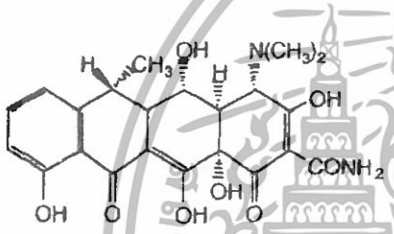
ยาทุกตัวในกลุ่มนี้มีโครงสร้างหลักเหมือนกันคือ hydronapthacene skeleton (หรือเรียกว่า tetracycline nucleus) ยาแต่ละตัวในกลุ่มนี้จะแตกต่างกันที่สูตรเคมีที่เข้าไปแทนที่ในตำแหน่งต่าง ๆ บน tetracycline nucleus (ตารางที่ 1) ตัวอย่างเช่นตรงตำแหน่งที่ C-5 ของเตตราซัยคลินจะมีไฮโดรเจน (H) 2 อะตอมเกาะแต่ตรงตำแหน่งนี้ของออกซิเตตราซัยคลินจะมี OH group 1 กลุ่มแทนที่ไฮโดรเจน 1 อะตอม ส่วนคลอเตตราซัยคลินจะแตกต่างจากเตตราซัยคลินที่ตำแหน่ง C-7 โดยที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

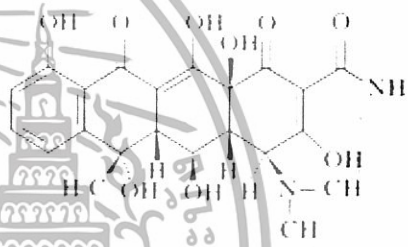
ตำแหน่งนี้ของคลอเตตราซัยคลิน จะมี chlorine atom มาเกาะในขณะที่ตำแหน่งนี้ของเตตราซัยคลิน จะเกาะด้วยไฮโดรเจนอะตอม



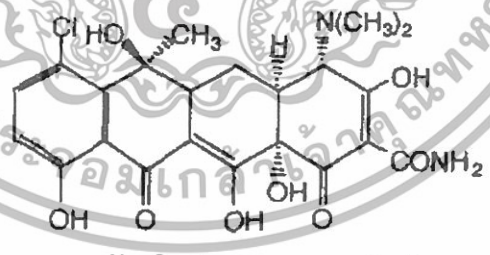
เตตราซัยคลิน (Tetracycline)



ดอกซิซัยคลิน (Doxycycline)



ออกซิเตตราซัยคลิน (Oxytetracycline)



คลอเตตราซัยคลิน (Chlortetracycline)

รูปที่ ก.1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 ยากลุ่มเตตราซัยคลินและส่วนแทนที่

ยา	ส่วนที่แทนที่(Substituent)	ตำแหน่ง
ออกซิเตตราซัยคลิน	-OH, -H	5
คลอเตตราซัยคลิน	-Cl	7
เมทาซัยคลิน	-OH, -H; -Cl	5;6
ดอกซิซัยคลิน	-OH, -H; -CH3, -H	5;6

ก.2 การแบ่งยากลุ่มเตตราซัยคลิน

ยากลุ่มเตตราซัยคลินที่ใช้กันอยู่นั้น สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ทั้งตามวิธีการสังเคราะห์และระยะเวลาในการออกฤทธิ์

ก.2.1 แบ่งตามวิธีการสังเคราะห์

สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. **Natural Tetracyclines**

ยาในกลุ่มนี้แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยตรง มี 2 ชนิด คือ ออกซิเตตราซัยคลิน แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces rimosus* และคลอเตตราซัยคลิน แยกได้จากเชื้อ *Steptomyces aureofaciens*

2. **Semisynthetic Tetracycloines**

ยาในกลุ่มนี้เป็นยาที่มีส่วนหนึ่งแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces* spp. อีกส่วนสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี เช่นเตตราซัยคลิน , ดอกซิซัยคลิน , เมทามัยซิน และมิโนมัยซิน

ก.2.2แบ่งตามระยะเวลาออกฤทธิ์

สามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม คือ

1. **Short-acting** ได้แก่ เตตราซัยคลิน , ออกซิเตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน
2. **Intermediate-acting** ได้แก่ เมทามัยซิน
3. **Long-acting** ได้แก่ ดอกซิซัยคลินและมิโนมัยซิน

ก.3 วิธีให้ยา

ยาในกลุ่มนี้ที่นำมาใช้ในทางสัตวแพทย์และการผลิตสัตว์จะมีจำหน่ายหลายรูปแบบตั้งแต่รูปยาฉีด ยาเม็ด ลูกกลอน ยาผง ยาเติมในอาหารสัตว์ (feed additive) ยาใส่เต้านมจนถึงขี้ผึ้ง แต่อย่างไรก็

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามการใช้ยากลุ่มนี้นั้น นอกจากจะพิจารณาถึงรูปแบบของยาที่ใช้แล้ว ควรจะคำนึงถึงชนิดของสัตว์ป่วย และลักษณะการติดเชื้อร่วม

ก.3.1 ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (Intravenous injection)

โดยปกติแล้ว จะไม่แนะนำให้ยากลุ่มนี้โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ แต่จะให้โดยวิธีนี้เมื่อไม่สามารถให้สัตว์กินยาได้ หรือเมื่อให้กินยาแล้วเกิดความผิดปกติของทางเดินอาหาร เช่น เกิดอาการท้องอืด (bloat) และอาเจียน รวมทั้งเมื่อต้องการรักษาโรคติเชื้อเฉียบพลันรุนแรง (severe acute disease) เพราะเมื่อให้ยาเข้าหลอดเลือดยาจะถึงระดับที่ให้ผลในการรักษาทันที

กลุ่มยาเตตราซัยคลินที่ฉีดเข้าหลอดเลือดควรเป็นเตตราซัยคลินใน sodium glyconate และขนาดที่แนะนำให้ใช้คือ 4.4-11 mg/kg วันละ 1 ครั้ง ซึ่งอาจจะเพิ่มขนาดยาได้อีก 1-2 เท่าในการรักษาบางโรค ในกรณีที่เกิดการติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน ควรแบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อให้ยาออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพดี และยังช่วยลดโอกาสที่จะเกิดอาการช็อกและโลหิตเป็นพิษ (toxemia) จาก bacteria debris ได้ด้วย

เมื่อฉีดออกซิเตตราซัยคลินเข้าหลอดเลือดในครั้งแรกด้วยขนาด 10 mg/kg และฉีดครั้งต่อๆมาด้วยขนาด 7.5 mg/kg ทุก 12 ชั่วโมง จะทำให้ระดับยาในกระแสเลือดสูงเพียงพอสำหรับทำลายเชื้อที่ไวต่อยานี้

ก.3.2 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Intermuscular injection)

การฉีดเข้ากล้ามเนื้อเป็นวิธีการให้ยาแบบฉีดที่นิยมมากกว่าการให้ยาแบบฉีดเข้าหลอดเลือดดำและช่องท้อง ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินที่แนะนำให้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ได้แก่ออกซิเตตราซัยคลินและเตตราซัยคลิน ส่วนคลอเตตราซัยคลินนั้น ห้ามฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพราะจะทำให้เกิดการระคายเคืองอย่างรุนแรง จนทำให้เกิดเนื้อตายตรงบริเวณที่ฉีดได้

ต้องฉีดออกซิเตตราซัยคลินหรือเตตราซัยคลินเข้ากล้ามเนื้อลึกๆ และผสม 5% magnesium chloride และ 2% procaine ด้วยสำหรับเป็นยาชาเฉพาะแห่งเพื่อลดความเจ็บปวดบริเวณที่ฉีด แต่ถ้าใช้ออกซิเตตราซัยคลินหรือเตตราซัยคลินซึ่งละลายใน propylene glycol-water solution จะผสมหรือไม่ผสมยาชาเฉพาะแห่งก็ได้ แต่ต้องฉีดเข้ากล้ามเนื้อลึกๆเช่นกัน

ออกซิเตตราซัยคลินและเตตราซัยคลินจัดเป็น shrot-acting tetracycline ดังได้กล่าวมาแล้ว จึงทำให้ต้องฉีดยาให้บ่อยๆ เพื่อรักษาระดับของยาที่จะให้ผลในการรักษา ทำให้เสียเวลาและไม่สะดวกในทางปฏิบัติโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ในฟาร์ม ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้ผลิตออกซิเตตราซัยคลินและเตตราซัยคลินที่มีฤทธิ์ยาวนานออกมาจำหน่ายโดยการผสมสื่อ (carrier) ต่างๆ เช่น 5% povidone ถึงแม้จะสะดวกในการใช้ แต่ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เพราะอาจจะทำลายเนื้อเยื่อและตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3.3 ให้กิน (Oral administration)

การให้ยากลุ่มเตตราซัยคลินด้วยวิธีให้กินสามารถให้ได้กับสัตว์กินเนื้อ (carnivore) สัตว์กินทั้งพืชและเนื้อ (omnivore) และลูกสัตว์กินหญ้าที่เกิดใหม่ (newborn herbivore) แต่ไม่แนะนำให้ใช้กับสัตว์กินหญ้า (herbivore) ในรูปให้กิน เพราะยาจะไปยับยั้งการเกิด fermentation ของเซลลูโลสโดยเชื้อแบคทีเรียทีอยู่ใน rumen ทำให้ท้องอืด (bloat) ได้

การให้โดยวิธีการให้กินนิยมมากในการรักษาสัตว์เล็ก (เช่น สุนัข และแมว) จะให้ในขนาด 33-110 mg/kg ต่อวัน และแบ่งให้วันละ 2-3 ครั้ง

นอกจากนี้ยังใช้กับสัตว์เศรษฐกิจ (เช่น สุกร) ด้วย แต่จะให้ยาในรูปยาเติมในอาหาร (feed additive) เพื่อให้สัตว์กินอาหารและน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และยังช่วยป้องกันโรคติดเชื้อด้วย

ก.3.4 ฉีดเข้าเต้านม (Intramamary infusion)

ใช้วิธีนี้ในโค แพะ และแกะ เพื่อรักษาโรคเต้าอักเสบที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อยากลุ่มนี้ อาจจะใช้ยาในกลุ่มนี้ชนิดใดชนิดหนึ่งก็ได้ แต่ต้องอยู่ในรูป hydrochloride ฉีดเข้าเต้านมที่อักเสบในขนาด 400 มิลลิกรัมต่อเต้า

ก.3.5 ใช้เฉพาะแห่ง (Local application)

ใช้ในรูปขี้ผึ้งป้ายตา (ophthalmic ointment) ที่มีตัวยาเตตราซัยคลินอยู่ 1 มิลลิลิตร ต่อขี้ผึ้ง 1 กรัม เพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อที่เยื่อตาขาว (conjunctival membrane) แต่ถ้าติดเชื้อที่ตาโดยตรง เช่น กระจกตาอักเสบ (keratitis) ควรใช้ยากลุ่มเตตราซัยคลินในสารละลายที่มี pH เป็นกลาง (buffered aqueous solution) ซึ่งมีตัวยา 5 mg/ml

อย่างไรก็ตาม ถ้ามียาต้านจุลชีพชนิดอื่นที่เหมาะสม ควรจะหลีกเลี่ยงการใช้ยากลุ่มนี้ เพราะเชื้อจะดื้อยาเร็วมาก

ก.4 คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์

ก.4.1 การดูดซึมยา

ในพวกสัตว์กินเนื้อ ภายหลังจากที่ให้กินยากลุ่มนี้แล้ว ยาจะดูดซึมได้ดีจากกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ยาจะถึงระดับสูงสุดในกระแสเลือดภายใน 2-4 ชั่วโมง และคงอยู่ในระดับสูงได้นาน 6 ชั่วโมง พวกโลหะหนัก เช่น แคลเซียม และแมกนีเซียมในทางเดินอาหารจะเกิดเป็น chelate complex กับยากลุ่มนี้ได้ทำให้ยาดูดซึมได้น้อยลง ฉะนั้นจึงไม่ควรให้ยากลุ่มนี้พร้อมกับอาหาร นม หรือยาลดกรดพวก aluminium hydroxide gel ควรให้ยานี้หลังจากกินอาหารแล้วประมาณ 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายหลังจากที่ดูดซึมแล้ว ยาบางส่วนจะไปอยู่ที่ตับแล้วขับออกมากับน้ำดีและบางส่วนจะถูกดูดซึมกลับที่ลำไส้เล็กอีก เรียกว่าเกิด enterohepatic recycling จึงทำให้ยังมียาบางส่วนคงอยู่ในกระแสเลือดเป็นเวลานาน ซึ่งแตกต่างจากยาปฏิชีวนะอื่นที่ขับถ่ายออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว มีรายงานว่า เมื่อให้กินยาตามขนาดที่แนะนำจะตรวจพบยาในกระแสเลือดได้นานถึง 24 ชั่วโมงหลังใช้ยา

แต่เมื่อฉีดเตตราซัยคลินและออกซิเตตราซัยคลินเข้ากล้ามเนื้อ จะตรวจพบยาในกระแสเลือดภายใน 15 นาทีหลังฉีด และยาจะถึงระดับสูงสุดภายใน 1 ชั่วโมง ยาจะคงอยู่ในระดับที่ให้ผลในการรักษาโรคนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงจนตรวจพบเพียงเล็กน้อยภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดยานี้ในสัตว์เศรษฐกิจ (food producing animal) ไม่ควรฉีดยานี้เข้ากล้ามเนื้อแต่ละตำแหน่งเกิน 10 มิลลิลิตร เพราะนอกจากยาจะทำให้ระคายเคืองแล้ว ยังทำให้ยาดูดซึมได้ยาก มีผลทำให้ยาตกค้างและระดับยาในกระแสเลือดไม่ค่อยสูงขึ้นมากนัก

ไม่ควรฉีดยากลุ่มเตตราซัยคลินที่ผสมยาชาเฉพาะแห่งเข้าหลอดเลือดดำ เพราะยาชาที่ผสมอยู่จะไปมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของกลไกการนำกระแสประสาทของหัวใจ (cardiac conduction mechanism) ได้

ในม้า ฉีด ออกซิเตตราซัยคลินเข้ากล้ามเนื้อจะดีกว่าเข้าหลอดเลือดดำ เพราะยาจะออกฤทธิ์ได้นานกว่า เนื่องจากค่ากึ่งชีวิตของออกซิเตตราซัยคลิน เมื่อฉีดเข้ากล้ามเนื้อจะเท่ากับ 15.7 ชั่วโมง แต่เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำจะเท่ากับ 10.5 ชั่วโมง

ออกซิเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลินยังดูดซึมได้เล็กน้อยจากเต้านมภายหลังจากการให้ยาเหล่านี้เข้าทางเต้านม เพราะเมื่อฉีดยาเข้าเต้านมที่อักเสบจะพบยาในเต้านมอื่นๆด้วย

ก.4.2 การกระจายตัวของยา

ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินจะเกาะกับโปรตีนในพลาสมา (plasma protein) แบบไม่ถาวร และแพร่กระจายไปได้ทั่วร่างกาย พบความเข้มข้นสูงสุดที่ไต ตับ ม้าม และปอด ตามลำดับ ยังพบยากลุ่มนี้ที่ส่วนของกระดูกที่กำลังเกิด ossification คือที่ส่วน d*iaphysis* และ *epiphysis* และยังพบในส่วน *prostatic fluid* ด้วย จึงเป็นยากลุ่มที่มีประโยชน์มากในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ต่อมลูกหมาก (prostate gland) ยากลุ่มนี้ยังแพร่กระจายผ่านรกไปยังลูกอ่อน และพบยาในเปลือกไข่ไก่และไก่วงด้วย

ยากลุ่มนี้จะแพร่กระจายผ่านเข้าไปอยู่ในน้ำเลี้ยงสมอง (cerebrospinal fluid) ได้เพียงเล็กน้อย และเตตราซัยคลินจะแพร่กระจายเข้าไปได้ดีกว่าออกซิเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลิน

ตัวทำละลายของยานี้จะมีผลต่อการแพร่กระจายของยากลุ่มนี้ด้วย พบว่าเมื่อให้ออกซิเตตราซัยคลินในรูปสารละลาย (aqueous vehicle) จะใช้เวลาในการที่ยาจะถึงระดับสูงสุดเร็วกว่ายานี้ในรูปน้ำมัน เพราะยาในรูปน้ำมันจะดูดซึมได้ช้ากว่าในรูปสารละลายนั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4.3 การเปลี่ยนแปลงของยา

ยากลุ่มเตตราซัยคลินมีการเปลี่ยนแปลงได้หลายระดับ (various degree) แต่ส่วนใหญ่พบในปัสสาวะ อุจจาระ และเนื้อเยื่อ จะอยู่ในรูป parent tetracycline ในปัสสาวะจะพบยากลุ่มเตตราซัยคลินในรูป parent tetracycline อยู่ถึงร้อยละ 30

ก.4.4 การขับถ่ายยา

ยากลุ่มเตตราซัยคลินจะขับถ่ายออกจากร่างกายได้หลายทาง เช่น ทางปัสสาวะโดยผ่านไตทางอุจจาระ และทางน้ำนม เป็นต้น แต่ส่วนใหญ่จะขับถ่ายโดยผ่านทางไต เมื่อให้ยานี้เพียงครั้งเดียวจะพบยาขับถ่ายออกทางปัสสาวะประมาณ 20 – 30 % ยาในกลุ่มนี้แต่ละชนิดจะขับถ่ายออกจากร่างกายโดยใช้เวลาต่างๆกันขึ้นอยู่กับค่า pharmacokinetic parameters ของยาชนิดนั้นๆ

หลังจากที่กินยาในกลุ่มนี้แล้ว จะพบยามีความเข้มข้นสูงสุดในปัสสาวะนาน 2-8 ชั่วโมง แต่ยังมีระดับสูงพอที่จะออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียอีกเป็นเวลา 3 วันหรือนานกว่านั้น และเมื่อให้กินยาซ้ำความเข้มข้นของยาในปัสสาวะจะสูงเกิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าระดับความเข้มข้นที่ใช้เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อยานี้

ยานี้จะขับถ่ายออกมากับอุจจาระโดยจะไม่ขึ้นกับวิธีการให้ยา เพราะยาจะถูกขับออกมากับน้ำดีแล้วบางส่วนจะดูดซึมกลับแต่บางส่วนก็ถ่ายออกมากับอุจจาระ ยาในกลุ่มนี้จะขับออกทางนี้ไม่เกิน 10% ของขนาดยาที่ให้

ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินจะขับออกมากับน้ำนมด้วย ไม่ว่าโดยการกิน ฉีด หรือฉีดเข้าเต้านมโดยตรง พบยานี้ในน้ำนมด้วยขนาดความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของระดับยาในกระแสเลือด มีรายงานว่าในโคนมเมื่อฉีด เตตราซัยคลินด้วยขนาด 2-4 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม ยาจะขับออกมากับน้ำนมด้วยระดับยาสูงสุดถึง 0.9-1.9 ไมโครกรัมต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร ในเวลา 6 ชั่วโมง และยาจะค่อย ๆ ขับออกมาน้อยลงจนตรวจพบได้เพียงเล็กน้อยภายหลังจากฉีดยาแล้ว 48 ชั่วโมงเตตราซัยคลินที่ฉีดเข้าเต้านมด้วยขนาด 400 มิลลิกรัม หรือมากกว่าพบว่ามียาบางส่วนขับออกมากับน้ำนมด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบเตตราซัยคลินในน้ำนมภายหลังจากการให้ยาเข้ามดลูกเพื่อรักษาโรคมดลูกอักเสบและรกค้าง

ถึงแม้ยาจะถูกขับถ่ายออก แต่ก็มียาบางส่วนตกค้างในร่างกายของสัตว์ได้ เพราะฉนั้นจึงต้องมีการกำหนดระยะเวลาให้หยุดยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ก่อนส่งโรงฆ่า เช่นเมื่อฉีดเตตราซัยคลินต้องทิ้งระยะเวลาก่อนส่งโรงฆ่าดังนี้

ในโค ทิ้งระยะเวลา 22 วัน

ในสุกร ทิ้งระยะเวลา 26 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.5 กลไกการออกฤทธิ์

ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินเป็นยาต้านจุลชีพที่มีขอบเขตในการออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ เชื้อ *anaerobicbacteria, rickettsiae, chlamydiae, Mycoplasma, spiro-chetes* และ *protozoa* บางชนิดการออกฤทธิ์โดยตัวยาไปจับกับสารแมกนีเซียมบนส่วนพลาสม่าเมมเบรน ของแบคทีเรีย แล้วเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์และมีการรวมตัวกับส่วน 30s ของไรโบโซมในเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์นั้นๆ ยากลุ่มเตตราซัยคลินเป็น chelating agents ที่ดี ดังนั้นยา กลุ่มนี้สามารถรวมตัวกับอิออนชนิดต่างๆ เช่น แคลเซียมหรือแมกนีเซียมในอาหารหรือรวมตัวกับอิออนในน้ำ ทำให้เสื่อมฤทธิ์ไปได้ง่าย ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำเท่าที่มีรายงานมี 3 ตัวคือ คลอเตตราซัยคลิน ออกซิเตตราซัยคลิน และดอกซิซัยคลิน นิยมให้ยาทางปากไม่ว่าจะผสมอาหารหรือป้อนยาให้กินโดยตรง ยาจะมีการดูดซึมหลังจากที่ยาผ่านเข้าไปในกระเพาะอาหารและลำไส้ คุณสมบัติทั้งทางเคมีและฟิสิกส์ของยาที่สัตว์ได้รับจะมีผลต่อการดูดซึมที่แตกต่างกันในส่วนกระเพาะอาหารและลำไส้เป็นอย่างมาก หลังจากดูดซึมแล้วบางส่วนของยาจะเกิดเมตาบอลิซึม ค่า bioavailability (ค่าแสดงบริเวณยาที่มีสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้จริง) ของยาในกลุ่มเตตราซัยคลินมีค่าค่อนข้างต่ำทั้งในปลาและกุ้งกุลาดำเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่มีรายงานในคน ดังนั้นการใช้ยากลุ่มเตตราซัยคลินต้องใช้บ่อยทำให้เสียค่าใช้จ่ายและเสียเวลามาก

ก.6 อันตรายและฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ของยา

ก.6.1 Hypersensitivity reaction

ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินอาจทำให้เกิดการแพ้ขึ้นได้ มีอาการตั้งแต่อาการบวมน้ำของหนังตา ผิวหนังอักเสบ จนถึงขั้นทำให้ตายได้

ก.6.2 การติดเชื้อแทรกซ้อน

เมื่อพบว่าสัตว์มีอาการผิดปกติหลังจากให้ยากลุ่มเตตราซัยคลินเป็นเวลานาน เช่นท้องเสีย อาเจียน ปอดบวม และช่องคลอดอักเสบ ต้องปฏิบัติดังนี้

1. หยุดให้ยากลุ่มนี้ทันที
2. เปลี่ยนไปใช้ยาต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียนั้นแทน
3. ถ้ามีการติดเชื้อยา ต้องให้ยาต้านเชื้อราร่วมด้วย

ก.6.3 ผลต่อกระดูกและฟัน

ยากลุ่มเตตราซัยคลินจะยับยั้งการเจริญเติบโตของกระดูกและฟัน เพราะยาจะไปเกาะกับแคลเซียมในกระดูกและฟันเพื่อเกิดเป็นสารเชิงซ้อน ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ยานี้กับลูกสัตว์ที่มีอายุน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพราะยากลุ่มนี้จะทำให้สีของฟันผิดปกติเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและกรพดูกเปราะได้ นอกจากนี้ไม่ควรใช้ยานี้กับสัตว์ที่กำลังตั้งท้องอยู่ เพราะยาบางส่วนจะผ่านรกไปยังลูกอ่อนและไปเกาะกับแคลเซียมในกระดูกของลูกอ่อนได้

ก.6.4 ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน

ยากลุ่มเตตราซัยคลินมีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วย โดยจะไปยับยั้งการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *lymphoid* tissue แต่ยาจะไม่มีผลทำลายภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดมาจากแม่ผ่านทางน้ำนมเหลือง ดังนั้นจึงไม่ควรฉีดยานี้ก่อนฉีดวัคซีน 2 วัน และหลังจากฉีดวัคซันแล้ว 10 วัน

ก.6.5 ผลของการใช้ยาที่มีต่อสิ่งแวดล้อม

ยาเตตราซัยคลินที่ผสมในอาหารไม่ว่าจะเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูป หรืออาหารสด พบว่าประมาณ 20-30% ของยาที่ผสมในอาหารเท่านั้นที่สัตว์น้ำจะได้รับเข้าไป ส่วนที่เหลือของยาบางส่วนก็อาจละลายน้ำและรวมตัวกับสารต่างๆ รวมทั้งตะกอนดินในน้ำบริเวณที่มีการเลี้ยงปลา ซึ่งอาจมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในบริเวณดังกล่าว ซึ่งอาจทำให้เชื้อเหล่านี้ดื้อยาและได้มีการศึกษาผลของแสงที่มีต่อการสลายตัวของยา จากการศึกษาพบว่าทั้งอุณหภูมิและแสงสว่างมีผลต่อการสลายตัวของยาออกซิเตตราซัยคลินในน้ำทะเล [1]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

Solid Phase extraction (SPE)

การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากสิ่งสกปรกในตัวอย่างสามารถทำให้คอลัมและระบบอุดตันได้ จึงต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ดีและถูกต้อง

การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลามาก ประมาณได้เป็น 60-70% ของเวลาทั้งหมดที่นักเคมีใช้ไปกับ การวิเคราะห์ นอกเหนือจากเวลาที่ต้องเสียไปแล้ว เรายังสูญเสียตัวทำละลาย ไปอีกด้วย จากการประเมินทั่วไปพบว่าเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างที่ใช้กันมากที่สุดคือ Liquid-Liquid Extraction (LLE) LLE มีข้อเสียตรงที่อาจเกิด emulsion กรณีใช้กับตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ การที่ต้องใช้เครื่องแก้วมากมายทำให้เป็นการเพิ่มสิ่งสกปรกต่าง ๆ ที่จะมารบกวนการวิเคราะห์ให้มากขึ้น ผลที่ได้ก็อาจไม่ถูกต้อง solvent ที่ใช้มีราคาแพงและใช้ในปริมาณมาก ดังนั้นเราควรลดปริมาณการใช้ลง และควรคำนึงถึงการทิ้งตัวทำละลายเหล่านั้นหลังการใช้งานว่ามีผลต่อสิ่งแวดล้อมอย่างไรด้วย

Solid Phase Extraction (SPE) เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้แทน LLE ได้ โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก วิธีของ SPE มีหลักการคล้ายกับ LLE ตรงที่ใช้หลักการ partition เหมือนกัน โดยที่ SPE ไม่ได้เกิดระหว่างของเหลวกับของเหลวเหมือนกับของ LLE แต่จะเกิดระหว่างของแข็ง (คือ absorbent ที่อยู่ในแท่ง SPE) กับของเหลวหรือตัวทำละลาย

ข.1 ข้อได้เปรียบของการใช้ SPE ในการสกัดเมื่อเปรียบเทคนิค LLE

1. ลดปริมาณตัวทำละลายที่จำเป็นต้องใช้
2. ประหยัดเวลา
3. ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้น้อยลงหรือเหลือขั้นตอนเดียว
4. สามารถใช้กับระบบการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้
5. เลือกใช้ได้กับตัวทำละลายหลายชนิด

ดังนั้นจะเห็นว่า SPE เป็นเทคนิคที่ปัจจุบันนิยมใช้กันมากที่สุดในการเตรียมตัวอย่างการใช้ SPE ไม่เพียงแต่ทำความสะอาดตัวอย่างขจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ออกเท่านั้น แต่ยังเป็นการช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงได้นำเอา SPE มาใช้ในการสกัดน้ำนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 ขั้นตอนการสกัดด้วย SPE

Condition : เป็นการเตรียม sorbent หรือ packing ที่บรรจุอยู่ในแท่ง SPE ให้พร้อมรองรับสารตัวอย่าง

Load : เป็นการใส่ตัวอย่างลงไปเพื่อให้จับกับ sorbent

Rinse : เป็นการขจัดเอาสารที่จับกับ sorbent ได้น้อยหรือจับอยู่ที่ส่วนผิวของ sorbent ออก

Elution : เป็นการดึงเอาสารที่เราสนใจที่เกาะกับ sorbent ออกเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

Solid Phase Extraction เป็นวิธีเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ HPLC วิธีหนึ่งซึ่งใช้หลักการ Partition เหมือนกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ต่างกันที่ใช้ของแข็งเป็นตัวจับสารที่เราสนใจ โดยของแข็งจะถูกบรรจุอยู่ในแท่ง SPE เรียกว่า Sep-Pak

ข.3 ข้อดีของการใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ HPLC มีดังนี้

- ประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากใช้สารละลายและอุปกรณ์น้อย
- ให้ค่า Recovery สูง เพราะมีการถ่ายเทสารน้อยครั้ง
- ประหยัดเวลา เพราะมีขั้นตอนการเตรียมน้อย
- มีความปลอดภัยสูง ไม่เกิดปฏิกิริยารุนแรง
- ให้ความแม่นยำสูงเมื่อทำปริมาณวิเคราะห์ ไม่เกิดการปนเปื้อนจากสารอื่น
- สารไม่เปลี่ยนสภาวะสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ทันที
- ลดอันตรายจากสารตัวอย่างที่ระเหยได้ง่าย ลดปัญหาเครื่องแก้วแตก

ตาราง ข1 แนะนำการเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	การวิเคราะห์ที่ใช้
C_{18}	Hydrophobic bonded silica	- แยกสาร Hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous - ยาและ metabolite ของยา ในเลือด น้ำเหลือง และปัสสาวะ - สารอินทรีย์ปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำน้ำเสีย - กรดอินทรีย์ ในพวกเครื่องดื่มและไวน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	การวิเคราะห์ที่ใช้
C_8	Hydrophobic non-polar bonded	- แยกสาร Hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous - ใช้เมื่อต้องการให้สาร retain น้อยลงกว่า C_{18} - ยาและ metabolite ของยาในเลือด น้ำเหลือง และปัสสาวะ - Peptide ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย
Silica	Hydrophilic Polar (Neutral)	- แยกสารละลายที่มี polarity ต่ำ ถึงปานกลาง ออกจากสารละลาย non-aqueous - ไวตามิน A D E K - ยาฆ่าแมลง - ไขมันชนิดต่าง ๆ - สารสกัดจากธรรมชาติ pigment จากพืช - สารอินทรีย์สังเคราะห์
Florisil	Hydrophilic Polar (Slightly basic)	- แยกสารละลายที่มี polarity ต่ำถึงปานกลางออก จากสารละลาย non-aqueous - วิธีตาม AOAC และ EPA - ตัวอย่างที่มีไขมันสูง - ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช ในอาหารและอาหารสัตว์ - สาร Polychlorinated biphenyls ใน Transformer oil

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sorbent หรือ Packing Material	**คุณสมบัติที่ผิว**	**การวิเคราะห์ที่ใช้**
Alumina A	Hydrophilic Polar (Acidic)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - มีสมบัติเป็น Cation exchanger เล็กน้อย - แยกน้ำตาล คาเฟอินในเครื่องดื่มประเภทโคลา - ไวตามินในอาหารและอาหารสัตว์ - ยาปฏิชีวนะ - สารผสมในอาหาร และอาหารสัตว์
Alumina N	Hydrophilic Polar (Neutral)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - ยาฆ่าวัชพืช - ปิโตรเลียมและน้ำมัน - สารผสมในอาหาร - สารอินทรีย์สังเคราะห์
Alumina B	Hydrophilic Polar (Basic)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - มีสมบัติเป็น Cation exchange เล็กน้อย - ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช น้ำเสีย - พวก Steroid ต่าง ๆ
Accell plus CM	Hydrophilic Polar (acidic) Cation exchange	- แยกพวก Ion ที่มีประจุบวก ในสารละลาย aqueous หรือ non-aqueous - สกัดโปรตีน เอนไซม์ และ Immunoglobulin ต่าง ๆ ที่มีสภาวะเป็นด่างอ่อน - สารอินทรีย์สังเคราะห์ - แยก Peptide ขนาดต่าง ๆ

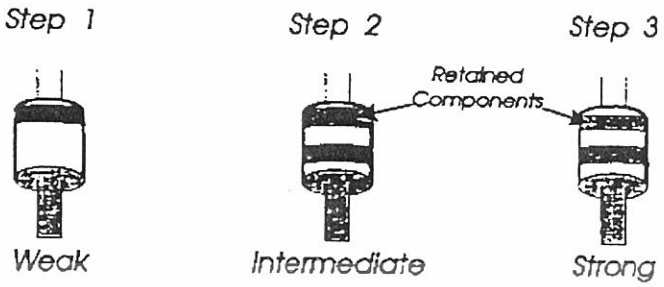
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	การวิเคราะห์ที่ใช้
Aminopropyl NH2	Hydrophilic moderately polar (Slightly basic)	- ใช้เป็น weak anion exchanger - ยาและ metabolite ของยา - อุตสาหกรรมปิโตรเลียม และ lube oil - Saccharides - สารพวก Phenol และ pigment พวก Phenolic
Diol	Hydrophobic moderately non-polar neutral phase	- วิเคราะห์สารที่ละลายใน aqueous หรือ organic - ธาตุที่มีปริมาณน้อยในน้ำ - ยาปฏิชีวนะในเครื่องสำอาง - แยก Peptide และโปรตีนต่าง ๆ

ข.4 ขั้นตอนการใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่าง

1. นำสารตัวอย่างผ่าน Sep-Pak โดยสารตัวอย่างละลายใน Weak Solvent (ตัวทำละลายที่ทำให้สารที่สนใจจับกับ Sep-Pak ได้ โดยไม่พาสารที่สนใจหลุดออกมาด้วย) โดยพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่างที่เราสนใจและชนิดของ Sep-Pak ตามหลักการของ Chromatography
2. ใช้สารละลายที่เป็น Intermediate Solvent ผ่าน Sep-Pak เพื่อชะสารที่ไม่ต้องการออกจาก Sep-Pak หรือเพื่อต้องทำการแยกชนิดของสารที่สนใจออกมา
3. ใช้สารละลายที่เป็น Strong Solvent เพื่อชะสารที่เราสนใจออกจาก Sep-Pak หรือ เพื่อไล่สารที่ตกค้างใน Sep-Pak ออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

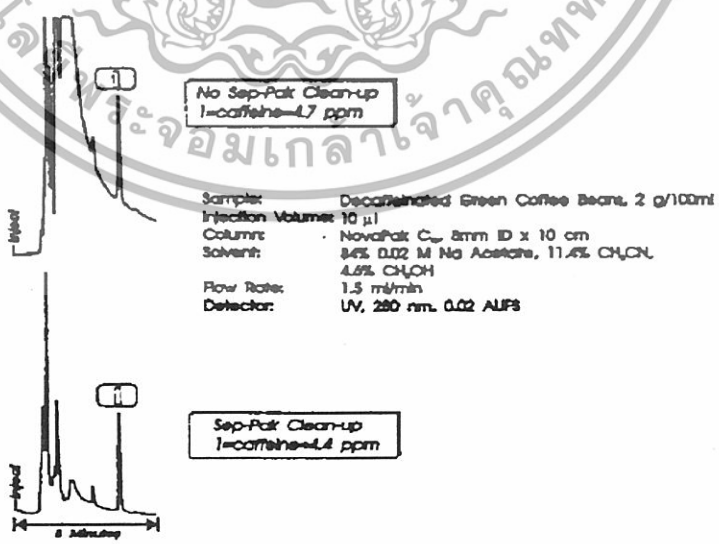


รูปที่ ข.1 แสดงขั้นตอนการใช้ Sep-Pak C_{18} Cartridge ในการเตรียมสารตัวอย่าง

ข.5 หลักการใช้งานทั่วไปของ Sep-Pak Cartridge

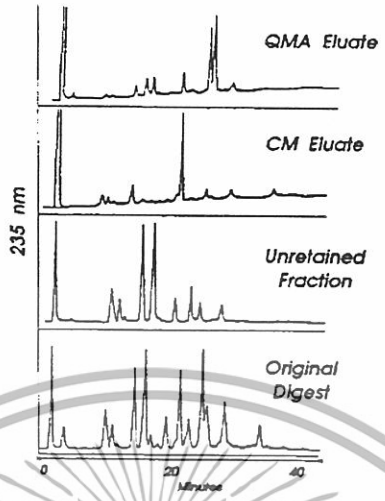
ข.5.1 การทำความสะอาดตัวอย่าง เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุดในการกำจัดสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการออกจากตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการคำนวณทางด้านปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งจะใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย

ข.5.2. การเตรียมสารตัวอย่างที่ยุ่งยากซับซ้อน อาทิเช่น ตัวอย่างประเภทที่มีโปรตีนสูง ได้แก่ ตัวอย่างประเภทเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งก่อนที่จะนำตัวอย่างผ่าน Sep-Pak ต้องมีการปรับสภาพของตัวอย่างให้เหมาะสมเสียก่อน โดยทำให้เนื้อเยื่ออยู่ในรูปของสารละลายโดยการนำไปย่อยเป็นต้น สารที่ได้หลังจากการย่อยมักจะประกอบไปด้วยสารประกอบหลายชนิดที่มีคุณสมบัติต่างกัน ถ้านำมาฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC โดยไม่ผ่าน Sep-Pak อาจเกิดปัญหาของการแยกของ Peak ไม่ชัดเจน



รูปที่ ข.2 แสดงโครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่างก่อนและหลังผ่าน Sep-Pak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.3 โครมาโทแกรมแสดงสารประกอบที่ได้จากการนำตัวอย่างผ่าน Sep-Pak เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่าน Sep-Pak

ข.5.3 การเตรียมสารตัวอย่างที่มีปริมาณต่ำ ได้แก่ ตัวอย่างทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การวิเคราะห์หา Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) ในแหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นต้น วิธีนี้ทำโดยนำน้ำตัวอย่างปริมาณมาก (ประมาณ 500-1000 มิลลิลิตร) ผ่าน Sep-Pak โดยใช้ระบบปั๊มสูญญากาศ ทำการปั๊มด้วยอัตราที่เหมาะสมเพื่อเก็บสารตัวอย่างให้อยู่ใน Sep-Pak หลังจากนั้นจึงทำการชะสารตัวอย่างออกจาก Sep-Pak

ข.6 การเลือกใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่าง

ข.6.1 การเลือกโดยพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่าง

- ตรวจสอบคุณสมบัติของสารตัวอย่างทั้งหมด ได้แก่ คุณสมบัติการละลาย ความมีขั้ว-ไม่มีขั้ว ความเสถียรของสารตัวอย่าง เป็นต้น
- เลือกชนิดของ Sep-Pak ให้เหมาะสมกับสารตัวอย่าง โดยให้สารที่สนใจสามารถจับกับ Packing ที่บรรจุใน Sep-Pak ได้ หรืออาจพิจารณาจากระบบ HPLC ที่มีอยู่ เช่น Reverse Phase หรือ Normal Phase
- เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการใส่ตัวอย่างลงใน Sep-Pak และเลือกตัวทำละลายที่ใช้ชะสารออกจาก Sep-Pak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.6.2 การเลือกจาก Waters Sep-Pak Cartridge Application Bibliography

Waters Sep-Pak Cartridge Application Bibliography เป็นหนังสือที่รวบรวมเกี่ยวกับ Application ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้ Sep-Pak สำหรับเตรียมสารภายในหนังสือจะแสดงชื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ ประเภทของตัวอย่าง ชนิดของ Sep-Pak ที่ใช้ ตลอดจนเอกสารอ้างอิงจากวารสารที่ได้รับการตีพิมพ์ในทางวิชาการซึ่งมีมากกว่า 2000 เรื่อง หนังสือเล่มนี้สามารถขอดูได้จากบริษัท หรือ แจกให้ในกรณีซื้อ Sep-Pak ในปริมาณมาก

Sep-Pak นี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะช่วยให้การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยระบบ HPLC เป็นเรื่องที่ง่ายขึ้นเพราะเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ประหยัดและปลอดภัยในการทำงาน สามารถนำไปใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังจะช่วยให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

ข.7 การเลือกตัวทำละลาย

การเลือกตัวทำละลายจะมีผลต่อการเตรียมตัวอย่างในแง่ที่ว่าจะได้ตัวอย่างออกมาสะอาดแค่ไหนและได้ค่า recovery เป็นอย่างไร ถ้าเราเลือกตัวทำละลายได้เหมาะสมสำหรับ rinse หรือ elute ตัวอย่าง ตัวอย่างก็จะสะอาด และได้ค่า recovery ดี การเลือกสามารถทำได้ง่ายด้วยการทดลองใช้ solvent ที่มี strength ต่าง ๆ กันเหมือนกับหลักการเลือกตัวทำละลายและคอลัมน์ ในระบบ HPLC เราจะ load สารที่เราสนใจลงไปบน sorbent สารที่เราสนใจควรมีความเข้มข้นพอเหมาะต่อไป เราจะเลือกใช้ ตัวทำละลายเป็นชุด ๆ ที่ทราบปริมาตร แล้วค่อย ๆ เพิ่ม strength ขึ้นเรื่อย ๆ แล้วเก็บแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่า สารที่เราสนใจถูก elute ออกมาเท่าใด

ข.8 อัตราการไหล (Flow rate)

การที่จะปรับสภาพของ sorbent ให้เรียบร้อยก่อน load ตัวอย่าง การ load ตัวอย่างและขบวนการ elute จะต้องทำที่อัตราการไหลของตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาจากตัวอย่างไม่ถูกกักหรือ retain อย่างสมบูรณ์ หรือไม่ถึง equilibrium โดยทั่วไปแล้ว เราสามารถปรับสภาพ cartridge ได้โดยใช้อัตราการไหลสูงถึง 25 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนการ load ตัวอย่างและการ elute นั้นจะดีที่สุดเมื่อเราใช้อัตราการไหลไม่เกิน 10 มิลลิลิตรต่อนาที แต่ก็เป็นไปได้ที่ว่าค่า recovery อาจจะยอมรับได้เมื่อเราใช้อัตราการไหลสูงถึง 20 มิลลิลิตรต่อนาที (ซึ่งควรตรวจสอบโดยใช้ standard เสียก่อน) กรณีใช้ sorbent ซึ่งเป็นพวก Ion exchange จะแนะนำให้ใช้อัตราการไหลต่ำกว่า เช่น 1-2 มิลลิลิตรต่อนาที Sep-Pak บางชนิด เช่น Sep-Pak light จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าแบบอื่น ก็ให้ลดอัตราการไหลลง 3 เท่า [5], [6], [7]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

เทคนิควิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

ค.1 หลักการ

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เป็นของเหลวจะถูกปั๊มผ่านคอลัมน์แยกสาร ที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) เมื่อตัวอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของเหลว ถูกนำเข้าสู่ระบบปกติโดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (injector) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล หน้าที่ของเฟสเคลื่อนที่ คือล้างตัวอย่างในขณะที่ไหลผ่านคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วยอันตรกิริยา ขององค์ประกอบกับเฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่ แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มฉีดจนกระทั่งออกจากปลายคอลัมน์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาส่วนใหญ่ของการเดินทาง เป็นช่วงเวลาที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว (characteristic time) ของแต่ละสาร แต่อย่างไรก็ดีต้องระมัดระวังว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมของการแยกนั้น สารบางชนิดมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน อาจใช้เวลาในการแยกใกล้เคียงกันจนเกิดการทับซ้อนกันได้ กฎโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการแยกคือ องค์ประกอบใดที่สามารถเกิด interaction หรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสอยู่กับที่ ได้ดีกว่าก็จะใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่าและในทางตรงกันข้าม สารใดที่มี interaction หรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่า ก็จะถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า หรือใช้เวลาในคอลัมน์น้อยนั่นเอง

ในการทดลองด้วยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีนั้น จะต้องมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งใช้ในการแยกจะมีลักษณะ ดังนี้

ค.1.1 เฟสอยู่กับที่ (stationary phase)

ลักษณะของเฟสอยู่กับที่จะทำการบรรจุอยู่ในcolumn ใน LC หรือ HPLC วัสดุเหล่านี้สามารถจัดประเภทได้เป็น rigid gels , semi-rigid gels และ soft gels. เฟสอยู่กับที่ที่นิยม คือ C_{18} alkyl group ซึ่งจะเกิดพันธะที่พื้นผิว silica(silica surface) ส่วนใหญ่นิยมใช้ silica gel เป็น Stationary Phase ใน open-column chromatography ดั้งเดิม และ TLC ส่วนใหญ่มักจะใช้ reversed-phase chemically-bonded packingsในการวิเคราะห์ ใน HPLC ส่วนใหญ่ใช้ในbiological sciences, การวิเคราะห์โดยมากเป็น water-soluble หรือ solute-stationary phase – mobile phase interactions สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ทั้งคู่

silica gel มีพื้นที่ของการใช้ที่มันเป็นที่เข้ากันได้อย่างดีเยี่ยม อย่างไรก็ดีส่วนมากมันได้รับการสนับสนุน adsorbent เพื่อใช้ในการเตรียมหรือการแยก ,ง่ายต่อการนำกลับมาใช้ โดยการกลั่นเป็นข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้เปรียบของ Silica gel และ Other normal-phase เป็น packings ที่นิยมมากกว่า เพื่อการแยกของสารประกอบเป็นกลุ่ม และเพื่อการแยกของ isomers reversed-phase packings , บนที่มีส่วนเกี่ยวข้องอื่นๆ น่าจะเป็นที่นิยมเพื่อการแยกของ homologues และเพื่อสารประกอบซึ่งคงสภาพเดิมอย่างแข็งแกร่ง,หรือที่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า silica gel

การเลือก Stationary Phase ควรจะเน้นที่ข้อแตกต่างของการแยกที่อยู่ในสารประกอบ , ความแตกต่างในคุณสมบัติ และเลขขั้วของหมู่ functional, the normal- phase packings

มีความแตกต่างกับ GC คือ GC ทำที่อุณหภูมิสูง, เฟสอยู่กับที่อาจเพิ่ม back ground อย่างต่อเนื่องที่ detector ซึ่งไม่พบใน HPLC นอกจาก PH ของเฟสเคลื่อนที่ทำให้เฟสอยู่กับที่มีประสิทธิภาพเสื่อมลง กรณีนี้ทำให้เพิ่ม back ground และลด chromatographic performance

ค.1.2 เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

HPLC ต้องการเฟสเคลื่อนที่ซึ่ง analyte สามารถละลายได้ การแยกของ HPLC ส่วนใหญ่ใช้ชนิด reversed phase chromatography คือเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วมากกว่าเฟสอยู่กับที่ในระบบนี้ analyte ที่มีขั้วมากกว่า จะelute รวดเร็วกว่า analyte ที่มีขั้วน้อยกว่า

การใช้เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลายเดี่ยวและตัวทำละลายผสมซึ่งมีประสิทธิภาพในการแยกอาจไม่เพียงพอ แต่เฟสเคลื่อนที่สามารถใช้ได้ในขอบเขตที่กว้าง แม้จะมีปัญหาอยู่เมื่อของผสมประกอบด้วย analyte ที่มีขั้วสูง ซึ่งจะใช้เวลานาน ส่วนใน non-polar analyte ให้ผลในทางตรงกันข้าม ในกรณีนี้การแยกจะประสบความสำเร็จโดยใช้เพียงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่ที่ทำให้เกิดการแยกโดยองค์ประกอบคงที่ เรียกว่า isocratic elution เมื่อองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ถูกเปลี่ยน เรียกว่า gradient

บัฟเฟอร์ก็สามารถใช้ได้แต่ส่วนใหญ่ใช้เป็นสารจำพวก inorganic และ involatile material เช่น potassium phosphate หรือ sodium phosphate

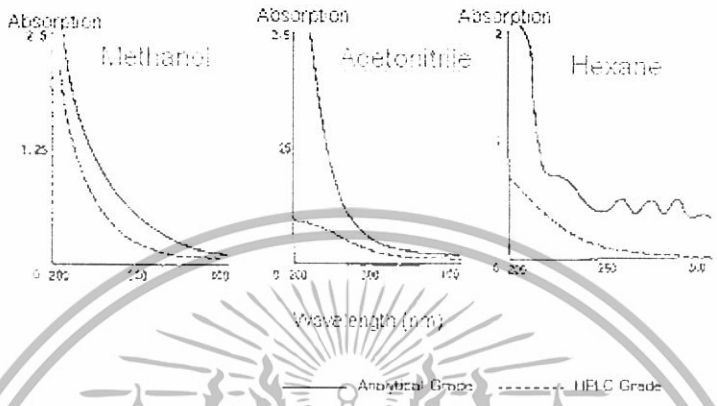
เมื่อพิจารณาเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้การวิเคราะห์ประสบความสำเร็จ และยืดอายุการทำงานขององค์ประกอบต่างๆ ของ HPLC ต้องคำนึงถึงสิ่งต่างๆ ดังนี้

ค.1.2.1 เกรดของตัวทำละลาย (Solvent grade)

ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่เป็น HPLC grade เนื่องจากมี cut off point ที่ wavelength ต่ำกว่า Analytical grade ทั่วไปและควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มี cut off point ต่ำกว่า wavelength ที่จะทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ เพราะว่าถ้าตัวทำละลายมี background absorption จะทำให้ Noise มีค่าสูง, Baseline stability จะไม่ดี และ Linear range จะแคบลง

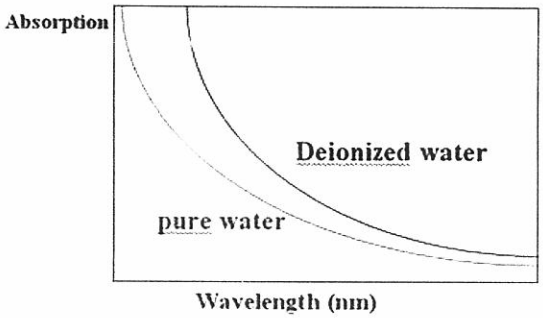


รูปที่ ค.1 แสดงโครมาโทแกรมของ เมทานอล อะซีโทรไนโทรล์ และเฮกแซน

นอกจากนี้ตัวทำละลายบางตัวก็มีข้อจำกัดอื่นๆ เพิ่มเติมด้วย ตัวอย่างเช่น Tetrahydrofuran (THF) ใน analytical grade จะมีการเติม Butylated hydroxytolune (BHT) สำหรับทำหน้าที่เป็น oxidation inhibitor ซึ่งสารเคมีตัวนี้จะมีการดูดกลืนที่สูงมากในช่วง UV ทำให้ไม่สามารถใช้กับ UV-detector ได้แต่จะไม่มีการเติมสารนี้ใน HPLC grade ดังนั้นในการใช้ THF ที่เป็น HPLC grade จะต้องทำการเก็บ THF ไว้ในที่มืดและเย็นหลังจากการเปิดเพื่อป้องกันการระเบิด เช่นเดียวกันกับคลอโรฟอร์ม ถ้าเป็น analytical grade จะมีการเติม 3% เอทานอล เพื่อป้องกันการ generation ของ phosgene ซึ่งเป็น Toxic gas แต่การมีเอทานอล ในคลอโรฟอร์มนี้จะมีผลต่อการแยกของสารใน Normal phase mode แต่ใน HPLC grade จะไม่มีการเติมเมทานอล เมื่อทำการเปิดขวดก็ควรจะเก็บในที่มืดและเย็นเพื่อป้องกันการเกิด generation

การเลือกใช้เกรดของตัวทำละลายรวมไปถึงการเลือกใช้น้ำให้เหมาะสมด้วย น้ำที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีให้เลือกด้วยกัน 3 เกรด คือ Pure water, Distilled water และ Deionized water ได้มีการทำการวัดค่าการดูดกลืนของ deionized water เทียบกับ pure water จากกราฟจะเห็นว่า deionized water จะให้การดูดกลืนที่สูงกว่าและอาจเป็นสาเหตุของการเกิด ghost peak เมื่อทำการวิเคราะห์แบบ Gradient elution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.2 แสดงโครมาโทแกรมของการดูดกลืนของ deionized water เปรียบเทียบกับ pure water

ค.1.2.2 สารละลายบัฟเฟอร์

สำหรับ Mobile phase ที่เป็น buffer solution ในการเตรียมต้องระวังในหลายๆ เรื่อง เช่น

- การเลือกชนิดของเกลือให้เหมาะสมกับช่วงของ pH ที่จะใช้และต้องเลือกชนิดของเกลือที่จะไม่มี การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการวิเคราะห์จนมีปัญหากับ Baseline, Noise หรือ linear range
- ในการเตรียมต้องระวังเรื่อง ionic strange และ buffer capacity ด้วย
- สารละลายเมื่อเตรียมเสร็จแล้วต้องทำการกรอง (< 0.45 ไมครอน) ก่อนนำมาใช้ในการใช้ยังต้องหลีกเลี่ยงที่จะไม่ทิ้งบัฟเฟอร์ ไว้ในระบบของ HPLC เพื่อป้องกันการเกิด crystallization และอาจ

เป็นสาเหตุของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งจะมีผลกระทบโดยตรงกับปั๊ม, คอลัมน์และ flow-line

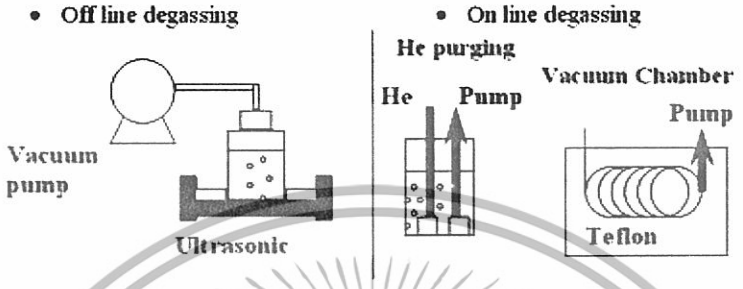
ค.1.2.3 เมื่อทำการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

สำหรับการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่จะต้องคำนึงถึงความสามารถในการละลายและต้องเป็นการเปลี่ยนแบบค่อยเป็นค่อยไปในการเปลี่ยนความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้สามารถเปลี่ยนเฟสได้อย่างสมบูรณ์และไม่ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างซึ่งจะเป็นปัญหาในการวิเคราะห์ และต้องระวังเรื่องการปนเปื้อนระหว่างเฟสเคลื่อนที่เดิมและเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.1.2.4 Degassing

ปริมาณของอากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อ stability ของ detector baseline และ detector sensitivity การ degassing ในระบบ HPLC สามารถเลือกได้ 2 แบบคือ



รูปที่ ค.3 แสดงระบบของ degassing

ค.1.2.4.1 ปัญหาที่เกิดจากการมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่

การมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ การเกิดฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่และการมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

ค.1.2.4.1.1 การเกิดฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่

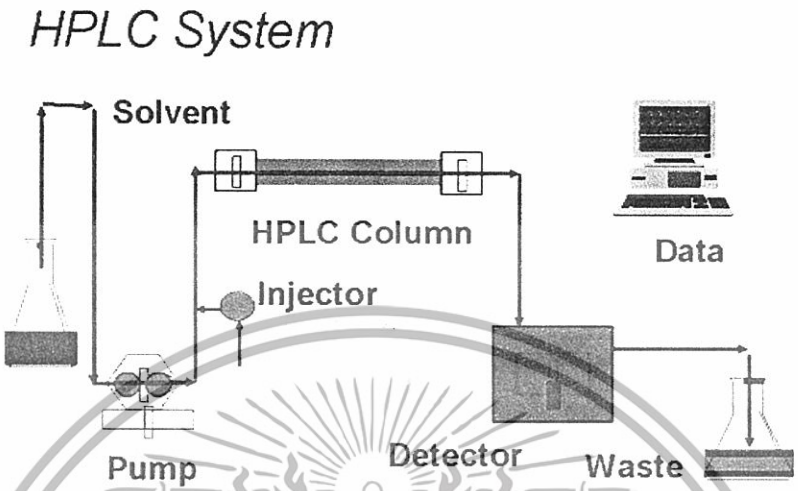
ปัญหาที่เกิดตามมาคือฟองอากาศจะเป็นสาเหตุให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่คงที่ทำให้ Retention time และพื้นที่พีกของสารไม่คงที่ และถ้ามีฟองอากาศในคอลัมน์จะทำให้ได้พีกที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ และถ้ามีการสะสมของฟองอากาศที่ตัวตรวจวัดก็จะเป็นสาเหตุของการเกิด Noise ของ Baseline

ค.1.2.4.2 การมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

ปัญหาที่จะเกิดอาจมาจากการที่ออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ทำการ Oxidized ตัวอย่าง หรือสารที่เป็นองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสอยู่กับที่ นอกจากนี้การที่มีออกซิเจนละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ในปริมาณมากจะทำให้ Sensitivity ของ Fluorescence detector ลดลงและอาจเป็นสาเหตุของการเกิด Noise

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.2 องค์ประกอบเครื่อง HPLC



รูปที่ ค.4 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง HPLC

ค.2.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir)

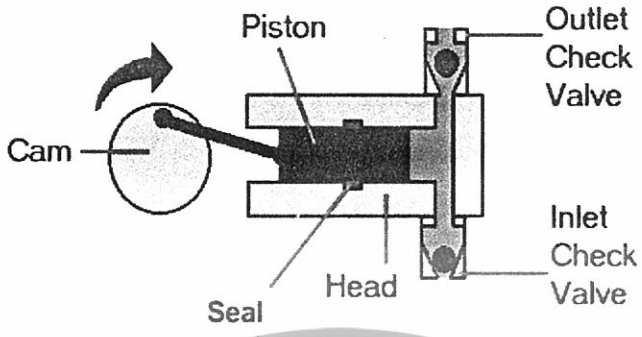
เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในทางวิเคราะห์ ขวดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่นี้ควรมีขนาดความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน preparative HPLC ความจุของขวดควรจะมากกว่านี้ ในปัจจุบันขวดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น ออกซิเจน

จุดประสงค์ของการไล่อากาศในเฟสเคลื่อนที่คือต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจไปทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่ การไล่ก๊าซที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว และมีบางบริษัทที่ผลิตเครื่อง HPLC สามารถใช้กับระบบที่ไม่ต้องไล่ก๊าซออกก่อน

ค.2.2 ปั๊ม (Pump)

ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆและคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันสูงเพื่อดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไปหรือใช้เพื่ออัดของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ด้วยความดัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.5 แสดงภาพตัดขวางของเครื่องปั๊ม

ค.2.3 Sample Introduction (Injector)

ถึงแม้ว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่ดีที่สุดก็ตาม แต่ถ้าการฉีดสารตัวอย่าง เข้าสู่เครื่อง HPLC นั้นไม่มีความระมัดระวังก็จะทำให้การแยกสารนั้นไม่ได้ผลดี ตามหลักการแล้วควรฉีดสารด้วยปริมาณน้อยๆ ตรงบริเวณกึ่งกลางของหัวคอลัมน์และต้องคอยระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศในขณะฉีดสารเพื่อจะให้เกิดประสิทธิภาพการแยกเกิดขึ้นสมบูรณ์

ชนิดของ injector ที่แตกต่างกัน สามารถใช้ด้วยกันได้ และเลือกให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ single type ของ injector ถูกใช้ใน HPLC ซึ่งต่างจาก GC Loop injector (บางที่ก็เรียก valve injector) เป็นการนำตัวอย่างที่เป็นของเหลวเข้าสู่ liquid stream และทำให้มีปริมาณที่เหมาะสมในการนำตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ โดยใช้ conventional syringe เมื่อ loop เติมเฟสเคลื่อนที่แล้วนั้นจะถูกปั๊มเข้าไปด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมจากนั้นผ่านวาล์วไปยังคอลัมน์ที่เก็บคอลัมน์อยู่ในภาวะสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่และรักษาระบบการทำงานของโครมาโทกราฟีเมื่อจะinjection rotating switch จะถูกเคลื่อนและ flow ถูกพาเข้าไปใน loop ทำให้มีระดับความสูงเท่ากันในคอลัมน์

พารามิเตอร์ 2 พารามิเตอร์ ที่สำคัญ คือ ความถูกต้อง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ความถูกต้องของการหาปริมาณวิเคราะห์ขึ้นกับขนาดของ loop โดยปกติจะเติม loop ได้เต็มสมบูรณ์ โดยใน Conventional syringe ให้ปริมาตรที่มากกว่าความจุ loop (ของเหลวที่มากเกินพอจะเป็นของเสียไปที่ Waste) ซึ่งฟองอากาศจะไม่ถูกนำเข้าไปในตัวอย่าง และสิ่งสำคัญ คือ ต้องแน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศเข้าไปแทนตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้ได้ความแม่นยำและถูกต้องดีที่สุด

การทำปริมาณวิเคราะห์ทำได้โดยใช้วิธี internal standard ควรถูกเลือกใช้ และถ้าตัวอย่างไม่เพียงพอ สามารถเติมที่ loop ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Loop ที่ไม่ถูกเทียบมาตรฐาน (Calibrate) จะมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งไม่มีผลต่อความแม่นยำของการวัด

Loop ที่เหมือนกัน ถูกใช้ในการทำกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณและสำหรับการหา unknown, ความถูกต้องของการวัด ถ้า injector คำนึงถึงเรื่องอื่นน้อยกว่าการมีอากาศเข้าสู่ injector อาจทาง liquid flow ซึ่งเป็นผลให้ได้สัญญาณที่ไม่เสถียรจาก mass spectrometer

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ในเทคนิค HPLC มีด้วยกัน 3 วิธี คือ

1) Septum injector

วิธีการนำสารเข้าเครื่องอันนี้จะคล้ายกับใน GC มากแต่เข็มฉีดใน GC จะใช้กับความดันเพียง 100 บาร์ ในกรณีที่ความดันสูงๆ จะนำมาใช้ฉีดสารไม่ได้ จึงได้มีการสร้างเข็มฉีดที่ใช้กับความดันสูงๆ ถึง 600 บาร์ ขึ้นมา และ บางทีมันอาจเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดจากวิธีทั้งหมด คือการออกแบบที่ไม่แน่นอน ทำให้มันง่ายที่จะสร้างสำหรับใช้ในห้องทดลองโดยใช้วัสดุอย่างง่ายๆในการสร้าง

ข้อดี ของการฉีดสารผ่านเซปตัมคือ

- ฉีดในปริมาตรตามที่เราต้องการได้
- ปริมาณน้อยๆก็สามารถฉีดสารได้
- วิธีการฉีดสารง่ายและราคาถูก
- เป็นการฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง จงทำให้สัมผัสกับเฟสที่อยู่กับที่ได้โดยตรง

ความแม่นยำในการนำสารตัวอย่างเข้าจะดีขึ้นถ้าประกอบด้วย on-column injection แต่มีข้อเสียของการใส่วัตถุนั้นโดยที่มันจะไปรบกวนการส่งผ่านของสารตัวอย่างตรงบริเวณศูนย์กลาง ปัญหานี้แก้ไขได้โดยการใช้ capillary tube นำสารเข้าที่บริเวณส่วนหัวของ column

2) Sampling valves

ระบบฉีดสารประเภทนี้ถือว่าเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในเทคนิค HPLC เนื่องจากสามารถนำมาใช้ในความดันและอุณหภูมิสูงได้ , รวดเร็วและสามารถทำซ้ำได้ ,สามารถใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณมากๆ ได้แล้วยังมีความผิดพลาดน้อยกว่า 0.1% และ สามารถฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์แบบอัตโนมัติได้อย่างง่ายดาย

3) Automatic injector

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยวิธีนี้นั้นจะใช้งานสะดวกมาก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก หรือเมื่อต้องการฉีดสารตัวอย่างที่เหมือนกันซ้ำๆ

Automatic injector มีประโยชน์หลายอย่าง ซึ่งอาจทำงานได้ด้วยตัวของมันเองหรือควบคุมโดย LC computer การนำตัวอย่างเข้าสู่ระบบอาจทำได้โดยการผลักดันโดยใช้แรงลม (pneumatically) ตัวอย่างประมาณ 100 ml อาจถูกบรรจุลงใน ที่ใส่สารที่ถูกปิดอย่างมิดชิด ซึ่งในบางระบบนั้นจะความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซับซ้อนมาก และมันยังอาจควบคุมการฉีดที่มีปริมาณของตัวอย่างไม่คงที่ได้ในช่วงระยะเวลาที่แน่นอนและเป็นลำดับ

ค.2.4 คอลัมน์ (Column)

เป็นส่วนประกอบที่มีราคาน้อยที่สุด แต่ถือว่าเป็นหัวใจของระบบ คอลัมน์ HPLC โดยทั่วไปมีความยาว 25-30 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4-5 มิลลิเมตรและบรรจุด้วยสารบรรจุขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร ในปัจจุบันมีแนวโน้มว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีความยาวและขนาดของอนุภาคน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถผลิตสารบรรจุที่มีขนาดเล็กลงมา 3-5 ไมโครเมตรและใช้เทคนิคการบรรจุสารที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นมานั้นเอง ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่อหน่วยความยาวคอลัมน์ดีขึ้น

ค.2.4.1 ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์

- อย่าใช้คอลัมน์ที่ความดันมากเกินไป
- ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า pH มากหรือน้อยจนเกินไป ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH อยู่ในช่วง 3.5-6.5
- ห้ามเก็บคอลัมน์ไว้ในบัฟเฟอร์หรือในสารละลายที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบเพราะอาจทำให้เกิดตะกอนได้และไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีตะกอนหรือขุ่น ควรกรองเฟสเคลื่อนที่เสมอ
- ระวังไม่ให้คอลัมน์ถูกกระแทก
- ไม่เก็บคอลัมน์ไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูง
- ถ้าคอลัมน์ใกล้เสื่อมสภาพให้ล้างด้วย 1% กรดอะซิติก

ค.2.5 ตัวตรวจวัด (Detector)

ตัวตรวจวัด (Detector) ที่ได้นำมาใช้มากที่สุดใน HPLC ได้แก่ Ultraviolet Absorbance (UV) และ Refractive Index (RI) ตัวตรวจวัดชนิด UV มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ตัวตรวจวัดชนิดนี้มีทั้งความยาวคลื่นเดียว (มักจะใช้ที่ 254 นาโนเมตร Mercury arc lamp) และแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (variable wavelength) ในช่วง 190-600 นาโนเมตร ซึ่งตัวตรวจวัดใน HPLC รุ่น ปั๊มรุ่น P1000 Isocratic pumps , ตัวตรวจวัดยูวี รุ่น UV 1000 ของบริษัท Shimazu (รุ่นที่ใช้ในการทดลอง) เป็นแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (Deuterium arc lamp) การดูดกลืนแสงนี้เป็นคุณสมบัติของโมเลกุล ดังนั้นแต่ละสารประกอบจึงมีการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของตัวเอง เครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจวัดชนิด UV จัดเป็นชนิดที่มีความไวสูง สามารถตรวจวัด สามารถแยกประเภทในปริมาณต่ำถึงระดับนาโนกรัม

ตารางที่ ค1 แสดงคุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ

ชนิด	ความไว (ก./มล.)	ผลของอุณหภูมิ	ผลของอัตราการไหล	หมายเหตุ
UV absorption	5×10^{-5}	น้อย	ไม่มีผล	นิยมใช้วัดในช่วง 254-280 nm
IR absorption	10^{-6}	น้อย	ไม่มีผล	-
Fluorometry	10^{-10}	น้อย	ไม่มีผล	-
Refractive index	5×10^{-7}	-	ไม่มีผล	วัดความแตกต่างดรรชนีหักเหของสารตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่
Conductivity	10^{-8}	$\pm1^{\circ}C$	มีผล	-
Flame ionization	10^{-8}	ไม่มีผล	มีผล	สารตัวอย่างถูกเผาให้เป็นไอออนและถูกจับโดยแอโนดเพลท
Mass Spectrometry	10^{-10}	ไม่มีผล	ไม่มีผล	วิเคราะห์สารได้ถึง 0.2-1.0 ng

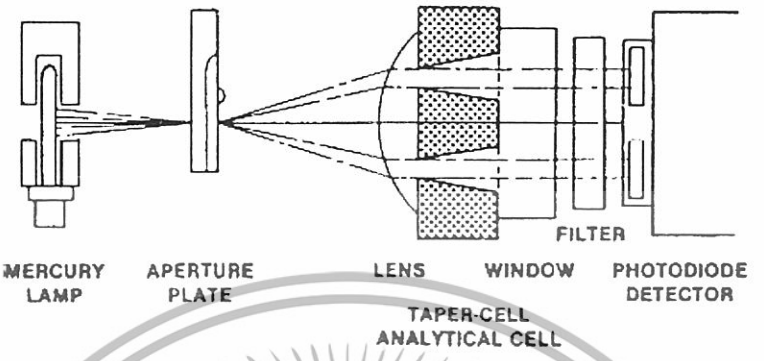
ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันเป็น การวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต เนื่องจากสารส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยหมู่ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น ดังกล่าวได้ดี เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้ตัวตรวจวัด UV-detector เป็นหลัก ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดเพิ่มเติมดังนี้

หลักการทำงานของเครื่องตรวจวัดชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง ในปัจจุบัน ยูวี-วิสิเบิล ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. Fixed-wavelength UV detector ตัวตรวจวัดชนิดนี้ ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้เป็นหลอดที่ทำด้วยปรอทความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยแสงผ่าน aperture plate ตรงไปยังเลนส์ที่ทำด้วยควอทซ์ซึ่งจะทำให้แสงผ่านเข้าไปในเซลล์อ้างอิงและเซลล์ของสารตัวอย่าง ต่อจากนั้นแสงจะผ่านกระจกควอทซ์และแผ่นกรองซึ่งจะแยกความยาวคลื่นที่เราสนใจก่อนที่แสงนั้นจะถึงโฟโตไดโอด โฟโตไดโอดจะทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแสงทั้งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

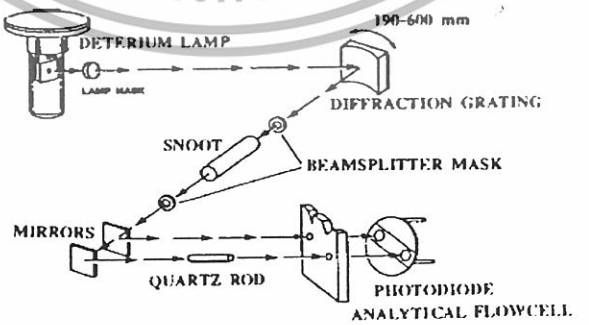
อ้างอิงและเซลล์ของสารตัวอย่างเป็นสัญญาณไฟฟ้าซึ่งจะถูกผ่านเข้าไปในส่วนของการขยายสัญญาณ



รูปที่ ค.6 Fixed-wavelength UV detector

ข้อจำกัดของตัวตรวจวัดประเภทนี้จะได้แก่ ไม่สามารถจะตรวจวัดสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 254 นาโนเมตร เพราะมีสารประกอบสำคัญหลายชนิดใช้ความยาวคลื่นในช่วง 195-225 นาโนเมตร นอกจาก mercury lamp แล้วอาจใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่น อาทิเช่น Zn lamp (206 nm) Cd lamp (214 นาโนเมตร) เป็นต้น สำหรับ D_2 lamp จะปล่งแสงออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วงยูวี (200-400 นาโนเมตร) และบางช่วงของวิสิเบิล เมื่อต้องการความยาวคลื่นใด ๆ ก็จะใช้โมโนโครโมเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้องการ

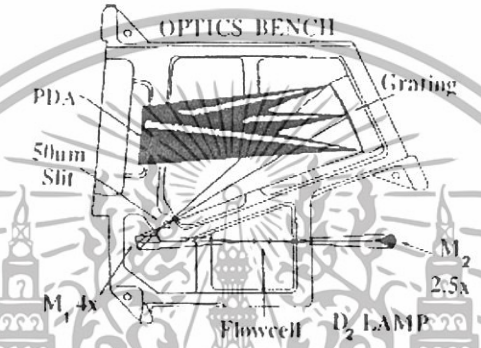
2. Variable UV detector ตัวตรวจวัดชนิดนี้จะแตกต่างจากตัวตรวจวัดประเภทแรกคือใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D_2 lamp และใช้โมโนโครโมเตอร์แยกแสงและเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้ จึงสามารถตรวจวัดสารตัวอย่างได้ทั่วไปเพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด



รูปที่ ค.7 Variable UV detector

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Photodiode array detector (PDA) ตัวตรวจวัดชนิดนี้จัดว่าเป็น solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลายๆความยาวคลื่นในขณะเดียวกัน มีลักษณะดังรูประบบทางเดินของแสงจะแตกต่างจาก ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ ทั่ว ๆ ไปคือระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบ reverse optics จากรูปแสงจากแหล่งกำเนิดหรือหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow-through cell ก่อนที่จะไปยังโมโนโครโมเตอร์หรือเกรตติง เมื่อแสงตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกไปเป็นความยาวคลื่นต่างๆแล้วไปตกกระทบกับแผงของโฟโตไดโอดดังรูป



รูปที่ ค.8 Photodiode array detector

PDA (996) เป็นตัวตรวจวัดที่จะช่วยให้ข้อมูลทางโครมาโทรกราฟีมีความเด่นชัดและผลลัพธ์เป็นที่น่าเชื่อถือมากขึ้น เนื่องจาก มีการใช้เทคโนโลยี Taper Beam และระบบการเก็บข้อมูลในคอมพิวเตอร์ซึ่งมี Milennium 2010 เป็น software ควบคุมการทำงานและการเก็บข้อมูลรวมทั้งการประมวลผลในรูปแบบ 3D graphics spectral contrast peak purity เป็นต้น จากการใช้เทคโนโลยีของ taper beam ช่วยขจัด refractive index effect ซึ่งจะเป็นการเพิ่ม sensitivity ในส่วนของ spectral contrast เราสามารถเก็บข้อมูลมาเปรียบเทียบโดยใช้สเปกตรัมมาเปรียบเทียบกันซึ่งทำให้ทำ compound confirmation ได้

ค.2.6 ส่วนประมวลผล (Data System)

ส่วนประมวลผลของมูล (Data System) ส่วนที่แปลงสัญญาณ analog เป็น digital

ค.2.7 ส่วนทิ้งของเสีย (Waste)

ส่วนที่ทิ้งของเสีย (Waste)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.3 ข้อปฏิบัติในการใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์

ค.3.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่น้ำที่นำมาใช้ในการเตรียมควรเลือกใช้ในที่มีความบริสุทธิ์สูงเช่น น้ำกลั่น 2 ครั้ง หรือ 3 ครั้ง และปราศจากไอออนชนิดต่างๆ สำหรับสารเคมีที่ใช้เช่นเมทานอลควรใช้เกรด HPLC grade เมื่อผสมเฟสเคลื่อนที่เสร็จแล้วต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน สำหรับ membrane filter ก็ต้องเลือกให้ถูกว่าชนิดใดใช้กรองเฟสเคลื่อนที่ที่มีน้ำเป็นส่วนผสมได้ ชนิดใดใช้กรองตัวทำละลายอินทรีย์หลังจากกรองแล้วนำเฟสเคลื่อนที่ไปทำการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น ก๊าซออกซิเจน จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก็คือต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสอยู่กับที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่ทำให้เกิดฟองอากาศ (bubble) ในเครื่องตรวจวัดขณะทำการทดลองอยู่ การไล่แก๊สที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvents) กำจัดแก๊สที่ละลายอยู่ในตัวทำละลาย (degas) อาจใช้การ sonicate ในเครื่อง ultrasonic ประมาณ 15 นาที หรือผ่านก๊าซฮีเลียม 15 นาที

ค.3.2. เมื่อเตรียมสารตัวอย่างเสร็จแล้วก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ทุกครั้ง เพื่อป้องกันการอุดตันที่หัวคอลัมน์ ซึ่งทำให้ความดันระบบสูงกว่าปกติ

ค.3.3.ก่อนฉีดสารตัวอย่าง ต้องรอคอลัมน์ถึงสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่ก่อน โดยดูจาก baseline บนเครื่องบันทึกผลที่ต่อกับตัวตรวจวัด

ค.3.4. ก่อนฉีดสารตัวอย่างควรตรวจสอบรอยรั่วตามข้อต่างๆ รวมทั้งที่ eng fittings ของคอลัมน์ด้วย ซึ่งโดยมากมักรั่วเพียงเล็กน้อย และตรวจสอบได้ก็ต่อเมื่อใช้มือแตะจะรู้สึกเย็นเนื่องจากตัวทำละลายระเหยไป ถ้ามีรอยรั่วเกิดขึ้นมักจะทำให้ระดับ baseline ยกขึ้น มีอากาศเข้าไปในระบบ และอาจมีผลกระทบต่อค่าความสูง และพื้นที่ของพีก ทำให้ผลการหาปริมาณแต่ละครั้งไม่เท่ากัน

ค.3.5. ไม่ควรขันข้อต่อของคอลัมน์แน่นเกินไป เพราะจะทำให้เกลียวของ fittings เป็นรอยจนรั่วได้ ซึ่งแม้จะขันต่อไปอีกก็ไม่สามารถหยุดรอยรั่วได้ เมื่อมีรอยรั่วเกิดขึ้นควรขันเพิ่มอีกเพียงเล็กน้อย และถ้ายังรั่วอยู่ควรถอดออกมาทั้งหมดแล้วจึงใส่กลับเข้าไปใหม่

ค.3.6. การเลือกคอลัมน์และตัวตรวจวัด เลือกชนิดของคอลัมน์ให้เหมาะสมกับงาน ในกรณีที่เริ่มใช้คอลัมน์โดยไม่รู้ประวัติคอลัมน์นั้นเลย ให้ล้างคอลัมน์ (ไม่ต้องต่อเข้าตัวตรวจวัด) ก่อนตามวิธีที่เหมาะสม ส่วนตัวตรวจวัดควรเลือกให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์

ค.3.7. การใช้คอลัมน์ในงาน HPLC ควรหลีกเลี่ยง หรือป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่โดยกะทันหัน เนื่องจากจะทำให้เกิดการจัดตัวของอนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารที่บรรจุ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดช่องว่างในคอลัมน์ ควรเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเป็นขั้นๆ ขั้นละ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดันอย่างกะทันหัน (pressure shock) ควรให้เวลาหลายๆนาทีในการให้คอลัมน์อยู่ที่ความดันปกติของการทำงาน และปล่อยให้ความดันค่อยๆ ลดลงมา เมื่อต้องการให้ปั๊มเลิกทำงาน การใช้ guard column สามารถช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ เนื่องจากจะมีแผ่นกรองที่มีขนาดรูอนุภาคประมาณ 0.5 ไมครอน ทำหน้าที่กรองอนุภาคที่อาจหลุดลอดมาจากขั้นตอนการกรองตัวอย่าง และขณะเดียวกันก็เป็นการกรองเฟสเคลื่อนที่ซ้ำอีกครั้ง

ค.3.8. เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH สูงหรือต่ำมาก ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ pH อยู่ในช่วง 3.5-6.5

ค.3.9. ตรวจดูว่าอัตราการไหลคงที่หรือไม่ โดยสังเกตจากความดัน ถ้าคงที่จึงเริ่มวิเคราะห์ได้ ถ้ายังไม่คงที่อาจมีปัญหาที่การ degas ไม่ดีพอ ต้องทำการ degas ใหม่

ค.3.10.เมื่อฉีดตัวอย่างที่มีการเติมสารปนเปื้อนลงไป ควรล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมประมาณ 200-300 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราการไหลต่ำๆ

ค.3.11.ไม่ควรเก็บคอลัมน์ไว้ในที่ชื้นหรืออุณหภูมิที่ทำให้คอลัมน์ และอนุภาคเกิดการขยาย และหดตัวกลับไปกลับมา เพราะจะทำให้เกิดช่องว่างขึ้นในคอลัมน์ ดังนั้นควรเก็บอุณหภูมิระหว่าง 15-30 องศาเซลเซียส และเก็บในสภาพเปียก เช่น เก็บคอลัมน์ประเภท Liquid Solid Chromatography ด้วยตัวทำละลายที่แห้ง หรือเก็บคอลัมน์ประเภท reversed phase ในตัวทำละลายอินทรีย์ 100% เป็นต้น [2]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.
สเปกตรัมที่ได้จากการทดลอง

สเปกตรัมจากการศึกษาหาความยาวคลื่นของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 50 ppm สแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

รูปที่ ง.1 สเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 50 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลอง

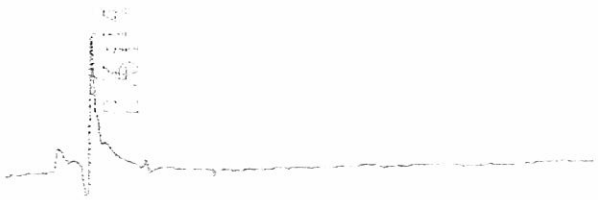
โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน จากการทดสอบหาอัตราส่วนของสารละลาย กรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ แสดงดังรูปที่ ก2

รูปที่ ง.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตร้าซัยคลินเข้มข้น 50 ppm โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

รูปที่ ง.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตร้าซัยคลินเข้มข้น 50 ppm โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 60:25:15 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเตตราซัยคลินในนมโดยใช้เทคนิค SPE ทดสอบโดยใช้นมที่มีเตตราซัยคลินอยู่ 400 ppb ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ ก3 - ก๓5



รูปที่ ง.3 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างนมที่มีเตตราซัยคลินเข้มข้น 400 ppm 2 มิลลิลิตรที่ผ่าน SPE C_{18} Cartridge โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

รูปที่ ง.4 โครมาโทแกรมของน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตรที่ผ่าน SPE C_{18} Cartridge ในการล้าง (Rinse) สารตัวอย่าง โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

รูปที่ ง.5 โครมาโทแกรมของเมทานอลที่ใช้ในการชะ (Elution) เตตราซัยคลิน ครั้งที่ 2 ที่ผ่าน SPE C_{18} Cartridge โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

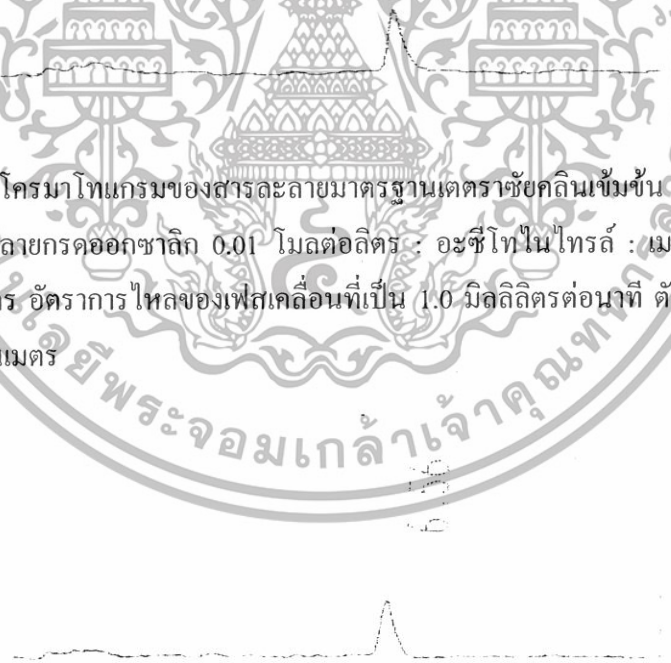
โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 75 – 400 ppb โดยใช้เทคนิค SPE แสดงดังรูปที่ ก6 – ก10

รูปที่ ง.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 75 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

รูปที่ ง.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 125 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง.8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 250 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร



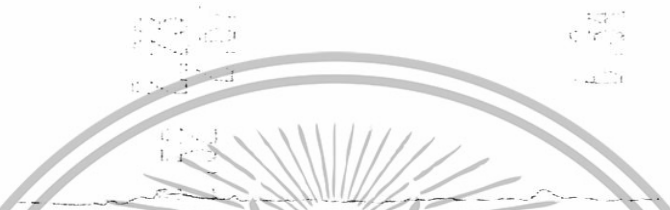
รูปที่ ง.9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 375 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

รูปที่ ง.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 400 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

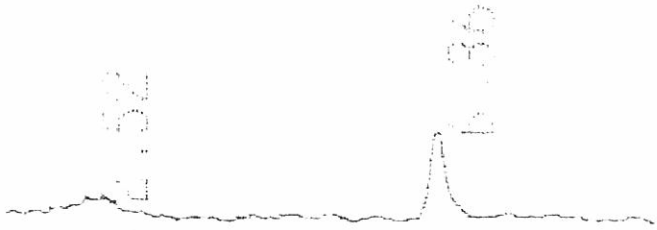
โครมาโทแกรมของสารละลายนมที่เตรียมไว้ 3 ความเข้มข้น โดยใช้เทคนิค SPE แสดงดังรูปที่ ก11 – ก13



รูปที่ ง.11 โครมาโทแกรมของสารละลายนมที่มีเตตราซัยคลินเข้มข้น 75 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

รูปที่ ง.12 โครมาโทแกรมของสารละลายนมที่มีเตตราซัยคลินเข้มข้น 250 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



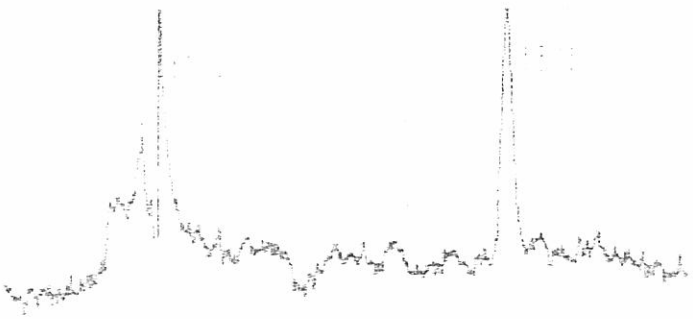
รูปที่ ง.13 โครมาโทแกรมของสารละลายนมที่มีเตตราซัยคลินเข้มข้น 400 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน จากการศึกษาความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection) แสดงดังรูปที่ ข14

รูปที่ ง.14 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 50 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน จากการศึกษาความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวัดได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ (limit of quantitation) แสดงดังรูปที่ ก15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 75 ppb โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

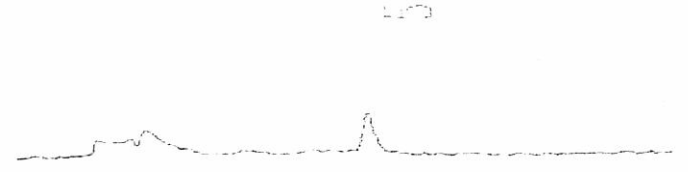
โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างนม โดยใช้เทคนิค SPE เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างนมแสดงดังรูปที่ ก16 – ก22

รูปที่ ง.16 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างนมแหล่งที่ 1 โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง.17 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างนมแหล่งที่ 2 โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

รูปที่ ง.18 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างนมแหล่งที่ 3 โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร



รูปที่ ง.19 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างนมเมจิ โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

รูปที่ ง.20 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างนมโฟโมสต์ โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

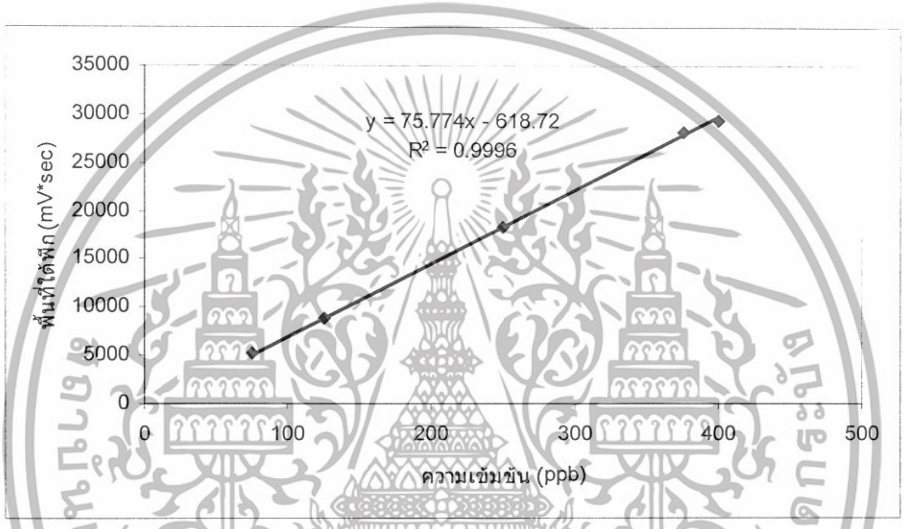
รูปที่ ง.21 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างนมไทยเดนมาร์ก โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

กราฟมาตรฐานของเตตร้าซัยคลินที่ได้จากการทดลอง

กราฟมาตรฐานของเตตราซัยคลิน ทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 75 - 400 ppb ในสารละลายเฟสเคลื่อนที่สารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้เทคนิค HPLC ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ ข1-ข4



	ชื่อ	ความเข้มข้น (ppb)	พื้นที่พีก	ค่าจากการคำนวณ (ppb)	% RSD
1	เตตราซัยคลิน	75	5161	76.2758	0.0861
2	เตตราซัยคลิน	125	8472.5	119.9781	0.1708
3	เตตราซัยคลิน	250	18220	248.6172	0.1008
4	เตตราซัยคลิน	375	27895.17	376.3017	0.1603
5	เตตราซัยคลิน	400	29457	396.9135	0.0153

รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของเตตราซัยคลิน ช่วงความเข้มข้น 75 – 400 ppb ในเฟสเคลื่อนที่สารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตรอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ.

ผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ

1. การประเมินผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ

ด้วยเทคนิค HPLC ในเฟสเคลื่อนที่สารละลายกรดออกซาลิก 0.01 โมลต่อลิตร : อะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 75:18:7 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร แสดงผลการวิเคราะห์ ดังตารางที่ ฉ1- ฉ4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ.1 สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินความเข้มข้น 75 – 400 ppb ในศึกษาความเที่ยง (Precision) จากร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) และการศึกษาการตอบสนองความเป็นเส้นตรง (Linearity)

สารละลายตัวอย่างนมมีความเข้มข้นเตตราซัยคลิน (ppb)	ความเข้มข้นเตตราซัยคลินที่ได้จากการคำนวณ (ppb) ครั้งที่						ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น (ppb)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	% RSD
	1	2	3	4	5	6			
75	76.3628	76.1966	76.2889	76.2098	76.3549	76.3417	76.2758	0.6572	0.8616
125	119.9187	119.9715	119.7207	119.7207	120.1695	119.8263	119.9781	0.2049	0.1708
250	248.6040	248.3005	248.9471	248.8811	248.4984	248.472	248.6172	0.2507	0.1008
375	376.6954	376.6163	376.6133	376.7350	375.4417	376.7086	376.3017	0.6034	0.1603
400	396.9662	396.9003	396.8343	396.9926	396.8607	396.9267	396.9135	0.0607	0.0153

ลิขสิทธิ์ของวิทยานิพนธ์ที่เผยแพร่ในคลังปัญญาจุฬาฯ นี้เป็นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่ต้องขออนุญาตก่อนนำไปใช้ แต่ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ และห้ามนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น
บัตรนักศึกษาและบัตรประจำตัวข้าราชการที่ยังไม่หมดอายุ ใช้ยืมหนังสือได้ครั้งละไม่เกิน 5 เล่ม ยืมได้ครั้งละ 7 วัน

ตารางที่ ฉ.2 สารละลายตัวอย่างนมที่มีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 75 – 400 ppb ในการหาความแม่น (Accuracy) จากร้อยละการได้คืนกลับ (% recovery)

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน (ppb)	ความเข้มข้นเตตราซัยคลินที่ได้จากการคำนวณ (ppb)			ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น (ppb)	%Recovery
	ครั้งที่				
	1	2	3		
75	62.3528	63.3690	63.5669	63.0962	84.1283
250	195.4591	196.0530	201.9125	197.8082	79.1233
400	333.9235	332.8149	334.6098	333.7827	83.4457

ตารางที่ ฉ.3 ปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างนม

ตัวอย่างนม	ความเข้มข้นเตตราซัยคลิน (ppb)			ความเข้มข้นเตตราซัยคลินเฉลี่ย (ppb)
	ครั้งที่			
	1	2	3	
แหล่งที่ 1	ND	ND	ND	ND
แหล่งที่ 2	210.8197	210.9351	211.0341	210.9297
แหล่งที่ 3	ND	ND	ND	ND
เมจิ	ND	ND	ND	ND
โฟโมสต์	ND	ND	ND	ND
ไทยเดนมาร์ก	96.9448	96.7964	96.8459	96.8679

หมายเหตุ ND = Non Detect

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช.

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นกระบวนการที่ศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อแสดงลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งหมายความว่าวิธีเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการปฏิบัติการจริงได้อย่างถูกต้อง โดยแสดงไว้ในรูปของลักษณะเฉพาะของการวิเคราะห์

1. ความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ หมายถึง ความใกล้เคียงระหว่างผลการวิเคราะห์กับค่าที่แท้จริง

การตรวจวัดความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์กระทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณของสารที่ทราบความบริสุทธิ์ (เช่น สารมาตรฐานอ้างอิง) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่ต้องการตรวจสอบความถูกต้อง หรือโดยเปรียบเทียบผลของวิธีนี้กับอีกวิธีหนึ่งที่เคยถูกใช้อยู่แล้ว การวิเคราะห์ถ้าไม่สามารถเตรียมขึ้นได้ก็ยอมโดยการเติม (spiked) สารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปในผลิตภัณฑ์

วิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นหรือผลิตภัณฑ์ที่เติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปในปริมาณที่ทราบแน่นอน คำนวณและแสดงค่าความถูกต้องของการตรวจสอบโดยเทียบปริมาณสารที่เติมลงไป (%recovery)

การคำนวณค่าร้อยละการได้คืนกลับของปริมาณสารที่เติมลงไป (%recovery)

$$\%\text{recovery} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของ spiked sample} - \text{ความเข้มข้นของ sample}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นของ Standard ที่เติมลงไป}}$$

2. ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ คือ ขนาดของความสอดคล้องกันในระหว่างผลการทดสอบแต่ละค่าของตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกัน ความเที่ยงตรงแสดงในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) หรือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD หรือ coefficient of variation, C.V.)

ความเที่ยงอาจวัดได้ทั้งในรูปของขนาดของความเที่ยงของกรรมวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มาจากวัสดุที่เป็นเนื้อเดียวกัน (reproducibility) หรือ การทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการหนึ่ง ในช่วงเวลาสั้นๆ โดยผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน โดยอยู่ในสภาวะเดียวกัน (repeatability)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reproducibility หมายถึง ความเที่ยงของกรรมวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มาจากวัสดุที่เป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์ในสภาวการณ์ต่างกัน ส่วนมากทำในห้องปฏิบัติการต่างกัน หรืออย่างปานกลางก็คือทำในห้องปฏิบัติการเดียวกัน แต่ต่างกันในเรื่องของวันที่วิเคราะห์ หรือผู้วิเคราะห์หรืออุปกรณ์ที่ใช้ต่างกัน แล้วเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

Repeatability หมายถึง การทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการหนึ่ง ในช่วงเวลาสั้นๆ โดยผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน โดยอยู่ในสภาวะเดียวกัน (เช่น สารเคมี, อุปกรณ์, ห้องปฏิบัติการเดียวกัน) โดยวัตถุประสงค์ส่วนมากมักจะใช้ repeatability เป็นเกณฑ์บรรทัดฐานสำหรับกรรมวิธีการวิเคราะห์ ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ วัดได้โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณของตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกัน โดยมีจำนวนของ aliquots มากเกินพอที่จะนำข้อมูลมาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานหรือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD หรือ coefficient of variation, C.V.) ได้อย่างถูกต้อง ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ควรแยกเตรียมแต่ละตัวอย่าง ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงขั้นสุดท้ายแล้วจึงนำไปทดสอบ

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

เมื่อ

SD = ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยตัวอย่าง

3. ขีดจำกัดของการตรวจพบ

ขีดจำกัดของการตรวจพบ หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่สามารถตรวจพบได้เมื่ออยู่ในตัวอย่าง (การตรวจพบมิได้หมายถึงการตรวจและทราบปริมาณที่แน่นอน) ขีดจำกัดนี้แสดงในรูปของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (เช่น %, ppb, เป็นต้น) ในสารตัวอย่าง

การตรวจวัดขีดจำกัดของการตรวจพบสารด้วยวิธีวิเคราะห์ มีวิธีวิเคราะห์ มีวิธีการแตกต่างกันไป โดยขึ้นอยู่กับว่าเป็นกรรมวิธีที่ใช้เครื่องมือ หรือไม่ใช้เครื่องมือ

กรณีของ กรรมวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือ ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์และวัดหาปริมาณที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบ

กรณีของ กรรมวิธีที่ใช้เครื่องมือ ควรใช้วิธีเดียวกับวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือ และในกรณีของการวิเคราะห์ที่ใช้เครื่องมือซึ่งแสดง background noise โดยทั่วไปกระทำโดยการวัดสัญญาณจากตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งมีสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในระดับความเข้มข้นที่ทราบค่า เปรียบเทียบกับ blank ของตัวอย่างนั้น แล้วกำหนดเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะสามารถตรวจพบสารที่ต้องการวิเคราะห์ ได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยใช้อัตราส่วนของ signal-to-noise ratio เป็น 2:1 หรือ 3:1

4. ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ หมายถึง ความเข้มข้นของสารในระดับต่ำที่สุดที่วิธีวิเคราะห์ ได้อย่างถูกต้อง (accurate) และเที่ยง (precise) ในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับ ในสภาวะการทดลองตามที่กำหนดในวิธีวิเคราะห์ โดยระบุเป็นร้อยละ (หรือ ppb) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่าง

การวัดขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ กระทำโดยวิธีแตกต่างกัน

กรณีของ กรรมวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือ การวัดขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณกระทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ แล้ววัดหาปริมาณต่ำที่สุด ที่สามารถตรวจวัดได้อย่างถูกต้อง (accurate) และเที่ยง (precise) ในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับ

กรณีของ กรรมวิธีที่ใช้เครื่องมือ ทำเช่นเดียวกับวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือ และแสดงให้เห็นว่าวิธีมีความน่าเชื่อถือ พอที่จะวิเคราะห์หาปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในระดับนี้ได้

ในกรณีของวิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือที่แสดง background noise แนะนำให้วัดสัญญาณที่ได้จากตัวอย่างของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำ (ที่ทราบค่าความเข้มข้น) เปรียบเทียบกับ blank ของตัวอย่างนั้น ความเข้มข้นที่ให้ค่า signal-to-noise ratio เท่ากับ 10:1 ยอมรับให้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่วิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ

5. ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และ ช่วงระดับความความเข้มข้นที่ใช้วิธีวิเคราะห์นี้ได้ผลถูกต้อง (Range)

ความเป็นเส้นตรง หมายถึง ความสามารถในการนำเอาผลการทดสอบมาเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในขอบเขตที่กำหนดให้ความเป็นเส้นตรงแสดงในรูปของ variance ของความชันของ regression line ซึ่งคำนวณเพื่อสร้างเป็นความสัมพันธ์ทางคณิตศาสตร์ระหว่างผลการวิเคราะห์ตัวอย่างของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ

ช่วงระดับความความเข้มข้นสูงสุดและต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ใช้วิธีวิเคราะห์นี้ได้ผลถูกต้อง เที่ยงตรง และมีความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง ระหว่างความเข้มข้นในระดับที่เหมาะสมกับค่าตอบสนองโดยปกติช่วงระดับความความเข้มข้นที่ใช้วิธีวิเคราะห์นี้ได้ผลถูกต้องนี้มีหน่วยเดียวกับผลการวิเคราะห์ เช่น %, ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์หาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนองกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในช่วงที่กำหนด โดยคำนวณ regression line (ใช้วิธี least squares) ของค่าตอบสนอง ซึ่งสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงหรือไม่

The line of Regression of Y on X

การคำนวณเพื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง, y (analytical response, signal) กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์, x

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$y = bx + a$$

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}}$$

เมื่อ

y = ค่าตอบสนองจากแกน y

$\bar{y}$ = ค่าเฉลี่ยค่าตอบสนองจากแกน y

x = ค่าตอบสนองจากแกน x

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยค่าตอบสนองจากแกน x

b = ความชันของกราฟ

a = ค่าจุดตัดแกน y

r = correlation coefficient

ถ้าค่า r ใกล้เคียง 1 แสดงว่าความสัมพันธ์ในช่วงนี้เป็นเส้นตรง ให้ใช้สมการ $y = bx+a$ ในการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนองกับความเข้มข้น

อีกวิธีหนึ่งคือ การพล็อตระหว่างค่าตอบสนองและความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์บนกระดาษกราฟก็จะได้เป็น regression line [4]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้