สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์อีดีทีเอในเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

T107854

นางสาววรรณวิภา อ่องแสงคุณ
นางสาวอัมพร สิริกีรติกุล

ว 251 ก
2550
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 107854
วัน,เดือน,ปี - 8 มิ.ย. 2553
b. 12214401
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC

Wanwipa Ongsangkun

Amporn Sirikeratikul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of The Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Industrial Chemistry-Analytical Instrumentation

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์อีดีทีเอในเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง
นักศึกษา	นางสาววรรณวิภา อ่องแสงคุณ 47050480
	นางสาวอัมพร สิริกีติกุล 47050497
ภาควิชา	เคมี
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อ. พรทิพย์ ศัพทอนันต์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	.....
กรรมการ	อ.สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล	.....
กรรมการ	รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล	.....
กรรมการ	อ.พรทิพย์ ศัพทอนันต์	.....

.....

(ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์อีดีทีเอในเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง
นักศึกษา	นางสาววรรณวิภา อ่องแสงคุณ 47050480
	นางสาวอัมพร สิริกีติกุล 47050497
ภาควิชา	เคมี
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อ. พรทิพย์ ศัพทอนันต์

บทคัดย่อ

วิธีการวิเคราะห์ EDTA ในเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ที่ขายกันทั่วไปได้ถูกพัฒนาขึ้นมาและได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี การแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูงแบบเฟสย้อนกลับ ใช้คอลัมน์ ODS-C18 และ 0.01 M ammonium phosphate monobasic: acetonitrile: tetrabutylammonium hydroxide 40% (90:10:0.2) ที่ pH 3.074±0.5% เป็นเฟสเคลื่อนที่ วัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีนี้ในการวิเคราะห์ EDTA โดยมีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.24 ppm ขีดจำกัดของการวัดปริมาณสาร 1.67 ppm ค่าความเที่ยง(%RSD) เท่ากับ 4.3% 3.3% 5.1% ของความเข้มข้นอีดีที่ทำการ spikedที่ 1 10 20 ppm ค่าความแม่น(เปอร์เซ็นต์การกลับคืน) 104.6% 93.8% 98.9% ของความเข้มข้นอีดีที่ทำการ spikedที่ 1 10 20 ppm และได้กราฟเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-20 ppm มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.9982 จากวิธีการดังกล่าวใช้วิเคราะห์ EDTA ในตัวอย่างจำนวน 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ เครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ที่ผสมคาร์บอเนตและที่ไม่ผสมคาร์บอเนต ซึ่งข้อกำหนดทางมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข(พ.ศ. 2547) เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร ได้กำหนดปริมาณสูงสุดของอีดีทีเอไม่เกิน 35 mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title	Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC.
Name	Miss Wanwipa Ongsangkun 47050480
	Miss Amporn Sirikeratikul 47050497
Department	Chemistry Faculty of Science
Program	Industrial Chemistry- Analytical Instruments
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Arunee Kongsakphaisal
Special Project Co-advisor	Ajarn. Porntip Subtaarnan

ABSTRACT

A method for quantification of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in commercially available non-alcoholic drinks was developed and validated. The chromatographic separation was performed on an RP C18 column, and the mobile phase consisted in a mixture of 0.01M ammonium phosphate monobasic: acetonitrile: 40% tetrabutylammonium hydroxide (90:10:0.2) pH 3.075±0.5%, a UV detector operated at 257 nm. The validation of the method to determine EDTA in non-alcoholic drinks, with a detection limit of 0.24 ppm, quantification limit of 1.67 ppm, precision (relative standard deviation (%RSD)) 4.3, 3.3, 5.1 of spiked EDTA concentration at 1,10, 20 ppm, accuracy (as percentage of recovery) 104.6%, 93.8%, 98.9% of spiked EDTA concentration at 1,10, 20 ppm, and a linearity range response between 1 and 20 ppm. As an application of the proposed method, the level of EDTA in 9 samples were determined.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดีได้นั้นด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล และ อ.พรทิพย์ ศัพยอนันต์ที่ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือและช่วยแก้ปัญหารวมทั้งคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย กลุ่มผู้วิจัยซาบซึ้งในความกรุณาและความอนุเคราะห์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ และ อ.สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล กรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และข้อชี้แนะ ตลอดจนในการช่วยตรวจรายละเอียดต่างๆในโครงงานฉบับนี้ให้เป็นไปอย่างถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี ตึกวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆและสถานที่ตลอดมา รวมถึงน้ำใจและกำลังใจที่มอบให้

สุดท้ายขอกราบขอบคุณบิดามารดาที่ให้ความสนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดมา รวมทั้งกำลังใจในการต่อสู้อุปสรรคต่างๆ ให้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

วรรณวิภา อ่องแสงคุณ

อัมพร สิริกีรติกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
กิตติกรรมประกาศ.....III
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....VII
สารบัญรูป.....IX
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
1.4 ขั้นตอนการทำวิจัยและการดำเนินงาน.....2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 เครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์.....3
2.2 วัตถุเจือปนอาหาร Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA).....5
2.2.1 คุณสมบัติ.....5
2.2.2 ผลกระทบต่อสุขภาพร่างกาย.....6
2.2.3 ข้อกำหนดทางมาตรฐาน.....7
2.3 โลหะ (Metal).....7
2.4 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน.....9
2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี.....12
2.6 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง.....13
2.7 งานวิจัยที่กี่ยวข้อง.....17
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย.....19
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....19
3.1.1 สารเคมี.....19
3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 วิธีการทดลอง....20
3.2.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่....20
3.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อีดีทีเอในเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ด้วยเทคนิค HPLC....20
3.2.3 การทำกราฟมาตรฐานสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ....21
3.2.4 การเตรียมตัวอย่างเครื่องดื่ม....21
3.2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี....22

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง....24
4.1 ศึกษาการวิเคราะห์อีดีทีเอโดยเทคนิค HPLC....24
4.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อีดีทีเอ....24
4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ....25
4.3 ผลการวิเคราะห์อีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์....26
4.4 ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี....29
4.4.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน....29
4.4.2 การหาค่าความเที่ยง (Precision) และค่าความแม่น (Accuracy)....31
4.4.3 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของปริมาณสาร (LOQ)...32
4.4.4 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)....32
4.4.5 การทดสอบความทน (Robustness)....33

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ....34
5.1 สรุปผลการวิจัย....34
5.2 ข้อเสนอแนะ....35

เอกสารอ้างอิง....36
ภาคผนวก ก. ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลอง....37
ภาคผนวก ข. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ....46
ภาคผนวก ค. ผลการวิเคราะห์อีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์....48
ภาคผนวก ง. ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี
การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน....50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก จ. ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การหาค่าความเที่ยง (Precision) 52

ภาคผนวก ฉ. ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การหาค่าความแม่น (Accuracy) 55

ภาคผนวก ช. ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของปริมาณสาร (LOQ) 58

ภาคผนวก ซ. ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การทดสอบความทน (Robustness) 62

ภาคผนวก ฌ. เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงตารางธาตุโลหะแทรนซิชัน....10
4.1 แสดงค่าเวลารีเทนชัน (retention time) ของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ที่ได้จากการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ค่า pH ต่างๆกัน....24
4.2 แสดงค่าเวลารีเทนชัน (retention time) ของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ที่ได้จากการใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน....25
4.3 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของอีดีทีเอกับพื้นที่ใต้พีก....26
4.4 สรุปผลข้อมูลที่ได้จากโครมาโทแกรมรูปที่ 4.2ก-4.2ซ....29
4.5 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของอีดีทีเอกับพื้นที่ใต้พีก....30
4.6 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่าความเที่ยง....31
4.7 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่าความแม่น....31
4.8 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่า LOD และ LOQ....32
4.9ก แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ที่ได้จากการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ค่า pH ต่างๆกัน....33
4.9ข แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ที่ได้จากการใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน....33
ข.1 ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ....47
ค.1 ผลการวิเคราะห์อีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์....49
ง.1 ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ....51
จ.1 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่าความเที่ยง...54
จ.2 เกณฑ์การยอมรับความเที่ยง....54
ฉ.1 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่าความแม่น...57
ฉ.2 เกณฑ์การยอมรับความแม่น....57
ช.1 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่า LOD....60
ช.2 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่า LOQ....61
ซ.1 แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ได้จากการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ค่า pH ต่างๆกัน....63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ซ.2 แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ได้จากการใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้าง EDTA หรือ เอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต.....5

2.2 โครงสร้างเกลือแคลเซียมไดโซเดียมเอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต (Na_2CaEDT) และไดโซเดียมเอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต (Na_2H_2EDTA).....6

2.3 แสดงการจับ Calcium ions ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).....12

4.1 โครมาโทแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 ปริมาตรโดยปริมาตร ค่า pH คือ 3.074 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....25

4.2ก แสดงการซ้อนทับของพีกของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ความเข้มข้น 1 5 10 20 40 ppm.....25

4.2ข แสดงกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอโดยทำการพล๊อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm) และพื้นที่พีก (a.u.).....26

4.3ก แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Coke.....26

4.3ข แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Pepsi twist.....27

4.3ค แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Mirinda.....27

4.3ง แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Tipco cool fit (Grape Mix).....27

4.3จ แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Unif.....27

4.3ฉ แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Splash.....28

4.3ช แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Kool Aids.....28

4.3ซ แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Minutmade..... 28

4.3ฌ แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Green spot.....28

4.4ก แสดงการซ้อนทับของพีกของสารมาตรฐานอีดีทีเอที่ความเข้มข้น 1 5 10 15 20 ppm.....30

4.4ข แสดงกราฟมาตรฐานอีดีทีเอโดยทำการพล๊อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm) และพื้นที่พีก (a.u.).....30

4.5 (ก) แสดงโครมาโทแกรมในการวิเคราะห์ตัวอย่าง matrix blank

(ข) แสดงโครมาโทแกรมในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้มีการ spiked สารละลายมาตรฐานอีดีทีเอที่ความเข้มข้น 1 ppm ลงใน sample blank.....32

ก1 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับค่า pH ที่ใช้ศึกษาคือ 6.0.....38

ก2 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับค่า pH ที่ใช้ศึกษาคือ 5.0.....38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ก3 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm
สำหรับค่า pH ที่ใช้ศึกษาคือ 4.0.....38
ก4 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm
สำหรับค่า pH ที่ใช้ศึกษาคือ 3.059 – 3.089.....39
ก5 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm
สำหรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที.....39
ก6 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm
สำหรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที.....39
ก7 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm
สำหรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....40
ก8 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm
สำหรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที.....40
ก9 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm
สำหรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที.....40
ก10 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 1 ppm.....41
ก11 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 5 ppm.....41
ก12 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm.....41
ก13 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 20 ppm.....42
ก14 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 40 ppm.....42
ก15 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 1 ppm.....42
ก16 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 5 ppm.....43
ก17 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm.....43
ก18 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 15 ppm.....43
ก19 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 20 ppm.....43
ก20 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 1 ppm.....44
ก21 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 2 ppm.....44
ก22 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 3 ppm.....44
ก23 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 4 ppm.....45
ก24 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 5 ppm.....45
ก25 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 6 ppm.....45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ช.1 แสดงกราฟมาตรฐานอีดีทีเอโดยทำการพล็อตกราฟระหว่าง
standard deviation, SD (ppm) และความเข้มข้นเฉลี่ย(ppm).....60
ช.2 แสดงกราฟมาตรฐานอีดีทีเอโดยทำการพล็อตกราฟระหว่าง
standard deviation, SD (ppm) และความเข้มข้นเฉลี่ย (ppm).....61
ฌ.1 แสดงระบบของ Degassing.....67
ฌ.2 แสดงองค์ประกอบของเครื่องHPLC.....67
ฌ.3 แสดงภาคตัดขวางของเครื่องปั๊ม.....68
ฌ.4 Fixed- wavelength UV detector.....71
ฌ.5 Variable UV detector.....72
ฌ.6 Photodiode array detector.....72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันมีการนำอีดีทีเอมาใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมจำนวนมากทั้งในอุตสาหกรรมยา เครื่องดื่ม อาหาร หรือ แม้กระทั้งเครื่องสำอาง ซึ่งจะต้องมีการทำคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ของผลิตภัณฑ์นั้นๆให้ประกอบด้วยปริมาณอีดีทีเอที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ตรงตามค่าที่กำหนดไว้ การตรวจวัดอีดีทีเอนั้นมีหลากวิธี เช่น เทคนิคการวิเคราะห์ทางสเปกโทรโฟโตเมทรี(Spectrophotometry) แค็ปพิลลารีอิเล็คโทรด (capillary electrode) แต่ที่นิยมกันส่วนมากนั้น คือ วิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (High Performance-Liquid Chromatography, HPLC)

โครงงานพิเศษนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณอีดีทีเอของเครื่องดื่มที่ไร้แอลกอฮอล์แต่ละประเภทด้วยเทคนิค HPLC โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบอีดีทีเอกับโลหะ ที่ทำให้เกิดสารเชิงซ้อนที่มีค่าการดูดกลืนแสงค่าหนึ่งที่สามารถตรวจวัดได้ โดยใช้ตัวตรวจวัด UV ระบบการทำงานของเครื่องมือเป็นแบบ isocratic และใช้คอลัมน์ reverse phase C18 เนื่องด้วยตัวอย่างที่ทำการทดสอบต้องเตรียมเป็นของเหลวซึ่งมาจากผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่ไร้แอลกอฮอล์ที่มีหลากหลายประเภท การเตรียมตัวอย่างนั้นค่อนข้างง่าย ไม่ยุ่งยาก แต่ต้องมีความรอบคอบต่อขั้นตอนในการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำจึงต้องทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องก่อนเพื่อความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์ เช่น การตรวจประสิทธิภาพของคอลัมน์ การตรวจสอบประสิทธิภาพของปั๊ม เป็นต้น โดยอันดับจะทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานก่อนแล้วนำสภาวะการทดลองที่เหมาะสมไปใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างเพื่อหาปริมาณอีดีทีเอต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณอีดีทีเอ โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับธาตุเหล็ก

2. เพื่อสามารถเปรียบเทียบปริมาณอีดีทีเอที่ตรวจพบจากตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ในแต่ละประเภทได้

3. เพื่อศึกษาสภาวะการเกิดสารเชิงซ้อนในช่วงที่ดีที่สุด

4. สามารถใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มที่ไร้แอลกอฮอล์ได้โดยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง

2. นำวิธีลิควิดโครมาโทรกราฟีแบบสมรรถนะสูงที่พัฒนาได้ไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณอีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มทีไร้แอลกอฮอล์

1.4 ขั้นตอนการทำวิจัยและการดำเนินงาน

1. สืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องต่อการวิเคราะห์

2. วางแผนการทดลองโดยจัดหาอุปกรณ์ สารเคมี สารตัวอย่างและเครื่องมือที่ใช้

3. ดำเนินการทดลองโดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอีดีทีเอด้วยเครื่อง HPLC

3.1 ทดสอบหาค่า pH ที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่โดยการปรับค่า pH ในช่วง 3.0-6.0 ของเฟสเคลื่อนที่

3.2 ทดสอบอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ หลังจากปรับค่า pH อย่างเหมาะสมแล้วของเฟสเคลื่อนที่ โดยทดสอบอัตราการไหลในช่วง 0.8 -1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

4. ใช้เทคนิค HPLC ที่พัฒนาได้ วิเคราะห์หาปริมาณอีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบสภาวะและขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอีดีทีเอ โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟีแบบสมรรถนะสูงได้

2. สามารถใช้วิธีนี้ในการเตรียมตัวอย่างการวิเคราะห์อีดีทีเอที่มีลักษณะเหมือนกันในผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มประเภทต่างๆ ผลิตภัณฑ์ยา และเครื่องสำอาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ (Non-Alcohol Beverage, Soft drink)

เครื่องดื่มประเภทนี้ คือ เครื่องดื่มที่ไม่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์(Ethyl alcohol) ชนิดที่กินได้อยู่เลย เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์สามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ดังนี้

1. น้ำดื่มชนิดขวด (Bottled water)
2. น้ำแร่ (Mineral water)
3. ซอฟท์ดริ้ง (Soft drink)
4. น้ำเชื่อม (Syrup)

น้ำเปล่า (Water) หรือน้ำดื่มชนิดขวด (Bottled water)

คือน้ำที่บริสุทธิ์ไม่มีสิ่งอื่นๆเจือปนเหมาะสำหรับการดื่มในทุกๆมื้ออาหารดื่มได้ทั้งเย็นๆ และตามอุณหภูมิห้อง หรือเป็นน้ำดื่มที่ขายในปัจจุบันส่วนมากเป็นน้ำดื่มที่ได้จากการกรองและบรรจุขวดขาย แต่บางบริษัทอาจจะเพิ่มขั้นตอนในการผลิต เพื่อจะได้เครื่องดื่มที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น โดยนำน้ำผ่านแสงยูวี เพื่อฆ่าเชื้อโรค ยกตัวอย่างน้ำดื่มชนิดขวด เช่น น้ำดื่มตราสิงห์ น้ำดื่มชนิดขวดได้นำมาใช้ในการทำเครื่องดื่มผสมเนื่องจากต้องการทำให้เครื่องดื่มเจือจางลงและไม่บาดคอ เช่น วิสกี้น้ำ บรั่นดีน้ำ

น้ำแร่ธรรมชาติ (Natural mineral water)

เป็นน้ำแร่ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติใต้พื้นดินเป็นเครื่องดื่มที่ได้จากธรรมชาติมีสารพวกเกลือแร่ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายซึ่งทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ยอมรับว่าจะช่วยในการย่อยอาหารและลดกรดในกระเพาะอาหารได้ เหมาะกับการดื่มในทุกๆมื้อของอาหารดื่มได้ทั้งเย็นและตามอุณหภูมิห้อง น้ำแร่จะถูกดูดขึ้นมาและตามกฎหมายจะต้องบรรจุขวด ณ สถานที่ที่ทำการดูดน้ำแร่ขึ้นมา ทั้งนี้เพื่อความสะอาดและถูกหลักอนามัย น้ำแร่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย น้ำแร่ในตลาดปัจจุบันสามารถแบ่งย่อยลงได้อีก 2 ชนิด คือ น้ำแร่ไม่มีฟอง(still mineral water) น้ำแร่ที่มีฟอง (sparkling mineral water) ตัวอย่างน้ำแร่ไม่มีฟอง เช่น ออร่า (aura)ส่วนน้ำแร่ที่มีฟองเช่น เปอริเอ้ (perrier) เราใช้น้ำแร่ในการผสมเครื่องดื่มเพื่อจะให้เครื่องดื่มเจือจางลงและไม่บาดคอ เช่น วิสกี้น้ำ บรั่นดีน้ำ

ซอฟท์ดริ้ง (Soft Drink)

ซอฟท์ดริ้ง เป็นเครื่องยอดนิยมสำหรับคนทุกวัย ซอฟท์ดริ้งสามารถแบ่งย่อยเป็น 2 ชนิด คือ ซอฟท์ดิ้งที่ไม่มีฟอง และ ซอฟท์ดริ้งที่มีฟอง ยกตัวอย่าง ซอฟท์ดริ้ง ที่ไม่มีฟอง เช่น น้ำผลไม้ต่าง ๆ ส่วนซอฟท์ดริ้งที่มีฟอง เช่น โซดา น้ำโคล่า น้ำโทนิค ซอฟท์ดริ้งถูกนำมาใช้ในการทำเครื่องดื่มผสม เพราะต้องการลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเครื่องดื่มลง ต้องการเพิ่มรสชาติและกลิ่น ยกตัวอย่างเครื่องดื่มผสมที่ใช้ซอฟท์ดริ้งเป็นส่วนประกอบเช่น จิน โทนิค(GinTonic) รัม โค้ก(Rumcok)

- **น้ำผลไม้สด (Fresh Fruit Juice)** เป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากได้มาจากการผลไม้ที่ต้องการทำมาคั้นเอาแต่น้ำซึ่งก็เป็นประโยชน์ต่อร่างกายด้วยเช่นกัน ดื่มได้ทั้งเย็นและตามอุณหภูมิห้องและสามารถดื่มได้ทุกมื้ออาหารมีทั้งเป็นกระป๋อง (Canned Fruit Juice)
- **น้ำผลไม้เข้มข้น (Fruit Squash)** หมายถึงเครื่องดื่มชนิดที่ทำจากน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ และมีการเติมน้ำตาลหรือน้ำเชื่อมเพื่อให้มีความเข้มข้นมากขึ้น นอกจากนี้อาจจะมีการปรุงแต่งสี กลิ่น และรส ลงไปด้วย
- **น้ำสมุนไพร (Herbal Juice)** นอกจากน้ำผลไม้สดแล้วเรายังสามารถนำสมุนไพรมาทำเป็นเครื่องดื่มได้อีกด้วยในปัจจุบันเป็นที่นิยมมากและยังเป็นที่ยอมรับว่ามีประโยชน์แก่ร่างกายเป็นอย่างมากดื่มได้ทั้งแบบร้อนๆ เย็น ๆ และบางชนิดสามารถดื่มได้ทุกมื้ออาหารมีทั้งเป็นกระป๋องด้วย
- **น้ำโซดา (Soda water)** เป็นเครื่องดื่มที่ผสมระหว่างเกลือโซเดียมไบคาร์บอเนต กับ น้ำมีรสซ่า
- **อาร์ทิฟิเชียล วอเตอร์ (Artificial Water)** หมายถึงเครื่องดื่มที่ได้จากการนำเอาน้ำมาปรุงแต่ง สี กลิ่นและรสชาติลงไปตามต้องการเช่น Coca Cola Seven up เป็นต้น
- **น้ำนม (Milk)** สามารถแบ่งออกได้เป็นน้ำนมที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อตามวิธีการต่าง ๆ และ น้ำนมสด
- **เครื่องดื่มผงสำเร็จรูป** เพียงแค่เติมน้ำร้อนหรือน้ำเย็นที่ขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มรับประทานได้
- **น้ำ เชื่อม (syrup)และน้ำเชื่อมผลไม้ (Cordial))**

น้ำหวาน จะมีส่วนประกอบ คือ น้ำตาลเคี่ยวรวมกันหรือมาละลายกับน้ำเปล่าซึ่งสามารถนำมาปรุงเครื่องดื่มและอาหารได้ มีกลิ่นธรรมชาติ หรือกลิ่นสังเคราะห์ น้ำหวานที่เป็นที่นิยมในการใช้ในเครื่องดื่มผสมคือ น้ำเชื่อมผลไม้ซึ่งหมายถึงการเติม สี กลิ่น รสของผลไม้ที่ได้จากการสังเคราะห์ลงไปในน้ำเชื่อม เช่น น้ำเชื่อมที่มีรสมะนาว (Lime Cordial) น้ำหวานกลิ่นทับทิม (Grenadine Syrup) เป็นต้น ส่วนน้ำหวานกลิ่นอื่น ๆ ก็ยังมีเป็นจำนวนมากในตลาดบ้านเรา เช่น น้ำหวานกลิ่นกุหลาบ กลิ่นครีมโซดา กลิ่นสตรอเบอรี่ จุดประสงค์ในการใช้น้ำหวานเป็นส่วนผสม คือ เพื่อเพิ่มความหวานในเครื่องดื่ม ทำให้เครื่องดื่มมีรสชาติดีขึ้นทำให้เครื่องดื่มมีสีสันสวยงามน่าดื่มและเพิ่มกลิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

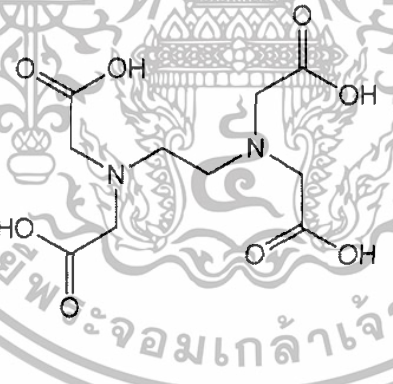
2.2 วัตถุเจือปนอาหาร Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)

2.2.1 คุณสมบัติ

ลักษณะทางกายภาพของอีดีทีเอเป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำได้ดี มีความหนาแน่น 0.86 g/cm^3 จุดหลอมเหลว 237-245 ^{0}C อีดีทีเอเป็นสารที่สามารถจับอนุมูลโลหะ (sequestering agent) ที่มีอยู่ในอาหาร เช่น ทองแดง เหล็ก นิกเกิล และแมงกานีส ซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารและเครื่องดื่มมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลง

การใช้สารอีดีทีเอในอุตสาหกรรมอาหารประเภทเครื่องดื่มเป็นสารซีเควสเตรนท์ คือวัตถุเจือปนอาหารประเภทหนึ่งที่สำคัญต่อกระบวนการผลิต วัตถุประสงค์ใหญ่เพื่อจะเพิ่มความเป็นกรดและปรับปรุงกลิ่นรสของเครื่องดื่มให้ดีขึ้น พร้อมยังช่วยให้ สี กลิ่น และลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารคงตัวและได้มาตรฐาน โดยซีเควสเตรนท์จะไปทำปฏิกิริยากับโลหะที่มีอยู่ในอาหารหรือที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบ ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้คุณสมบัติและปฏิกิริยาของโลหะในอาหารนั้นเปลี่ยนแปลงไป จะเกิดการรวมตัวกันของโครงสร้างอีดีทีเอ 6 พันธะต่อเข้ากับโลหะ ซึ่งพันธะเดี่ยว 2 พันธะมาจากอะตอมไนโตรเจนของหมู่อะมิโน และ พันธะเดี่ยว 4 พันธะมาจาก อะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอกซิล ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน โดยเฉพาะถ้าเกิดกับ แมกนีเซียม ทองแดง เหล็ก และโคบอล จะทำให้ได้สารเชิงซ้อนที่แข็งแกร่ง การเกิดลักษณะนั้นจำทำให้ได้คุณสมบัติและปฏิกิริยาโลหะในอาหารเปลี่ยนแปลงไปตามความต้องการของผู้ผลิต

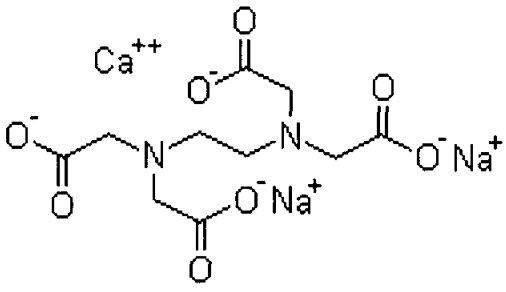
EDTA



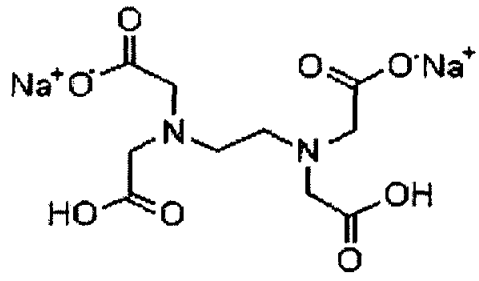
รูปที่ 2.1 **EDTA หรือ เอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต** (Ethylenediamine tetraacetic) มีสูตรโครงสร้าง $(HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$ หรือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$

อีดีทีเอมีมวลโมเลกุล 292.25 g/mol ในอุตสาหกรรมอาหารจัดว่าเป็นสารซีเควสเตรนท์ ที่เป็นวัตถุเจือปนอาหาร ซึ่งใช้ทั่วไปในรูปของเกลือแคลเซียมไดโซเดียมเอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต (Calcium disodium ethylenediamine tetraacetate, Na_2CaEDT) และ ไดโซเดียมเอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต (disodium ethylenediamine tetraacetate, Na_2H_2EDTA) สารในรูปเกลือของอีดีทีเอทั้งสองนี้ มีคุณสมบัติในการใช้ใส่ในกระบวนการทำอาหารและเครื่องดื่มเหมือนกัน ที่มักใช้ในรูปเกลือนี้เพราะเกิดการรวมตัวกับผลิตภัณฑ์ได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



$Na_2CaEDTA$



Na_2H_2EDTA

รูปที่ 2.2 เกลือแคลเซียมไดโซเดียมเอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต (Calcium disodium ethylenediamine tetraacetate, Na_2CaEDT) และ ไดโซเดียมเอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต (disodium ethylenediamine tetraacetate, Na_2H_2EDTA)

2.2.2 ผลกระทบต่อสุขภาพร่างกาย

จากการศึกษาและประเมินผลทางพิษวิทยาของโครงการมาตรฐานอาหาร FAD/WHO ในเรื่องสารอีดีทีเอ ที่ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร ดังนี้

1. $Na_2CaEDTA$ ในส่วนของลำไส้สามารถดูดซึมสารนี้ได้น้อยมากจึงมีสภาพเฉื่อยต่อระบบการเผาผลาญอาหาร และไม่มีการสะสมในร่างกาย จากการทดสอบความเป็นพิษเมื่อสารนี้จับกับโลหะพบว่าให้ความปลอดภัยเมื่อใช้ในระดับที่กำหนด แต่ตรงกันข้ามสำหรับการเผาผลาญเกลือแร่ ซึ่งอาจทำให้เกิดภาวะไตเป็นพิษภายหลังได้รับสารนี้สูง สำหรับคนกำหนดค่าที่ได้รับในช่วง 0 - 2.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

2. การใช้สารอีดีทีเอในผลิตภัณฑ์กระป๋องจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการกัดกร่อนในกระป๋องโลหะที่ใช้บรรจุเครื่องดื่มได้

3. การใช้อีดีทีเอ เป็นวัตถุเจือปนอาหารโดยปกตินิยมใช้ในรูปของ $Na_2CaEDTA$ มากกว่าในรูป Na_2H_2EDTA เนื่องจาก Na_2H_2EDTA จะจับตัวกับแคลเซียม ซึ่งเป็นธาตุที่มีความจำเป็นต่อร่างกายแล้วอยู่ในรูป $Na_2CaEDTA$ ทำให้ร่ายกายมีแคลเซียมอย่างไม่เต็มที่ ดังนั้นปริมาณ Na_2H_2EDTA ที่ใช้ในการผลิตอาหารและเครื่องดื่มจึงไม่ควรใช้ในปริมาณที่มากเกินไป

4. เมื่อผู้บริโภครับประทานเครื่องดื่มที่มีอีดีทีเอมากเกินไปจะมีผลทำให้การขับโลหะออกจากร่างกายผิดปกติ เช่น ถ้าเนื้อเยื่อสะสมธาตุเหล็กมากเกินไปจะทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับความผิดปกติของ metabolism และยังมีผลต่อเซลล์เมมเบรนซึ่งเซลล์เมมเบรนนี้ก็ประกอบไปด้วยสารจำพวกไขมันและโปรตีน มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆระหว่างภายในเซลล์กับสภาวะแวดล้อม โดยเยื่อหุ้มเซลล์เป็นตัวกำหนดความสามารถในการผ่านเข้าออกของสาร (permeability)จึงอาจเรียก เยื่อหุ้มเซลล์ว่าเป็น selectively permeable membrane จะให้สารที่มีขนาดเล็ก เช่น น้ำ กลูโคส ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 ข้อกำหนดทางมาตรฐาน

2.2.3.1 ข้อกำหนดของมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (CODEX)

- ค่า ADI (admissible daily intake) คือสิ่งหนึ่งที่ใช้เป็นเครื่องมือสำคัญในเรื่องการประเมินความปลอดภัยของการใช้สารเคมี เป็นการคำนวณหาค่าของระดับที่ยอมรับได้ต่อวัน$Na_2CaEDTA$ และ Na_2H_2EDTA มีค่าเท่ากับ 0 - 2.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

2.2.3.2 ข้อกำหนดในประเทศไทย

ประเทศไทยมีข้อกำหนดเกี่ยวกับการใช้ EDTA เป็นวัตถุเจือปนอาหารในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ซึ่งประกาศโดยกระทรวงอุตสาหกรรม และกฎหมายอาหารในประกาศสาธารณสุขดังนี้

- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (พ.ศ. 2547) เรื่องวัตถุเจือปนอาหารกำหนดปริมาณสูงสุดของอีดีทีเอไม่เกิน 35 mg/L

2.2.3.3 ข้อกำหนดของประเทศอื่นๆ

- สหรัฐอเมริกา กำหนดปริมาณสูงสุดของอีดีทีเอไม่เกิน 33 mg/L ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม

- อาเจนตินาร์ กำหนดปริมาณสูงสุดของอีดีทีเอไม่เกิน 35 mg/L ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม

2.3 โลหะ (Metal)

โลหะเป็นสารที่พบอยู่ทั่วไปทุกแห่งหน การปนเปื้อนของโลหะในอาหารของมนุษย์ มีสาเหตุที่มาสำคัญ 3 ประการ คือ

1. จากธรรมชาติ คือในดิน น้ำ อากาศ พืชและสัตว์ ตามวงจรธรรมชาติ

2. จากของเสียทางอุตสาหกรรม ไม่ว่าจะเป็นโรงงานผลิตสารเคมี ถลุงโลหะ หล่อหรือผสมโลหะ ฯลฯ โลหะที่ออกสู่สิ่งแวดล้อมจะมีทั้งเป็นก๊าซ ของเหลว และของแข็ง

3. จากกระบวนการผลิตอาหาร เช่น การสัมผัสระหว่างอาหารกับเครื่องจักรและอุปกรณ์ระหว่างผลิต และโลหะจากภาชนะบรรจุอาหาร

โลหะบางชนิดมีความเป็นพิษแม้จะได้รับปริมาณน้อย บางชนิดเป็นโลหะที่ร่างกายต้องการเพื่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม หากได้รับมากเกินควรก็ทำให้เกิดพิษได้ บางชนิดสะสมอยู่ในร่างกายได้นาน บางชนิดร่างกายจะขับถ่ายได้เร็วทำให้ยากที่จะแบ่งประเภทโลหะทุกชนิดได้อย่างชัดเจนว่าเป็นสารปนเปื้อนอาหารหรือไม่ โลหะที่สนใจกันทั่วไปและนักวิชาการหลายประเทศกำลังศึกษาด้านพิษวิทยา ได้แก่ ตะกั่ว ปรอท แคดเมียม ดีบุก สารหนู ทองแดง สังกะสี และเหล็ก ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดเฉพาะชนิด ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตะกั่ว
- ดีบุก
- สังกะสี ทองแดง และเหล็ก

ตะกั่ว

ตะกั่วที่ปนเปื้อนอาหารนั้นมาจากอากาศร้อยละ 90 ไอเสียรถยนต์เป็นตัวแพร่กระจายที่สำคัญ เนื่องจากการใส่สารประกอบตะกั่ว (leadtetraethylene) ในน้ำมันรถยนต์เพื่อกันเครื่องยนต์น็อค ดังนั้น พืชผักที่ปลูกใกล้ถนนจะมีโอกาสปนเปื้อนตะกั่วมาก แต่สามารถล้างขจัดออกได้นอกจากนั้นอาจพบตะกั่วในดินบางแห่งมาก เช่นบริเวณใกล้โรงงานถลุงแร่ หรือโรงงานอุตสาหกรรม

อนึ่ง ในการผลิตกระป๋องบรรจุอาหาร ใช้แผ่นเหล็กเคลือบดีบุกมาเชื่อมต่อกันด้วยโลหะผสมตะกั่ว จึงมีโอกาสที่ตะกั่วบริเวณตะเข็บกระป๋องด้านในจะละลายลงในอาหารได้ จากการตรวจพบตะกั่วในอาหารเกือบทุกประเภท 1 ใน 3 ของอาหารที่มีตะกั่วปนเปื้อนเป็นอาหารกระป๋อง เพื่อลดปัญหานี้จึงได้พัฒนาวิธีเชื่อมกระป๋องบรรจุอาหารโดยใช้กระบวนการอิเล็กทรอนิกส์แทนวิธีเดิม

ดีบุก

แหล่งแร่ดีบุกมีเฉพาะภูมิภาคบางแห่งของโลก ไทยเป็นแหล่งแร่ดีบุกใหญ่แห่งหนึ่งในโลก ดีบุกสะสมอยู่ในพืชได้น้อยกว่าตะกั่ว

กระป๋องบรรจุอาหารทำจากแผ่นเหล็กเคลือบดีบุก เพื่อป้องกันการกัดกร่อนของเหล็ก และเคลือบทับด้วยสารสังเคราะห์บางประเภทอีกชั้นหนึ่งเพื่อป้องกันดีบุกละลายผ่านออกมา แต่หากนำไปบรรจุอาหารที่มีสารบางชนิดปนอยู่หรือการเก็บอาหารกระป๋องในที่ร้อน ดีบุกจะละลายมาในอาหารได้ นอกจากนั้นเมื่อเปิดกระป๋องแล้วออกซิเจนจากอากาศจะเป็นตัวเร่งให้ดีบุกละลายมากขึ้น อาหารกระป๋องจึงเป็นแหล่งสำคัญที่ผู้บริโภคมีโอกาสได้รับธาตุดีบุกมากกว่าอาหารประเภทอื่น

ขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับพิษสะสมของดีบุก เคยมีรายงานการป่วยเนื่องจากพิษเฉียบพลันจากการดื่มน้ำผลไม้กระป๋องซึ่งมีดีบุกปนเปื้อนมากกว่า 250 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดินและมีไข้

หลายประเทศพยายามควบคุมปริมาณดีบุกในอาหารกระป๋องให้มีน้อยที่สุด แต่ในบางประเทศยังทำได้ยากเพราะอยู่ในเขตร้อน โอกาสที่ดีบุกจะละลายออกมาย่อมมากกว่าประเทศเขตหนาว

สังกะสี ทองแดง และเหล็ก

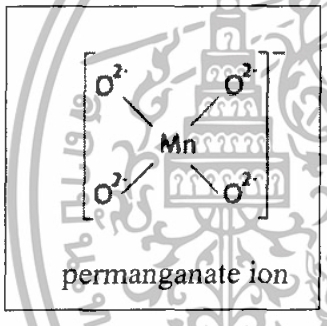
เป็นธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย คือต้องได้รับเป็นประจำ มิฉะนั้นการเจริญของร่างกายจะผิดปกติ แต่หากร่างกายได้รับมากเกินไปอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้แม้จะยังไม่ทราบอาการพิษสะสมของโลหะเหล่านี้ในคน แต่หลายๆ ประเทศมักนิยมกำหนดค่ามาตรฐานไว้เช่นเดียวกับโลหะอื่นๆ เพื่อเป็นการป้องกันไว้ก่อน เนื้อสัตว์ ปลา ธัญพืช และนม เป็นแหล่งสำคัญของสังกะสี ส่วนทองแดงและเหล็กพบในอาหารทั่วไป

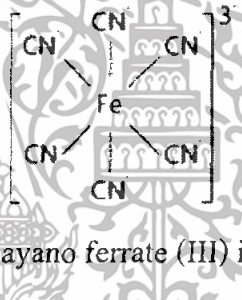
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

โลหะแทรนซิชันมีโครงสร้างทางอิเล็กตรอนที่แตกต่างไปจากโลหะหมู่ที่ IA และหมู่ IIA คือ สามารถรวมกับไอออน หรือหมู่ไอออน โมเลกุลหรือสารบางชนิดที่มีอิเล็กตรอนคู่ว่างอยู่ เกิดเป็นสารประกอบโคเวเลนต์ที่เรียกว่า สารประกอบโคออดิเนชัน หรือสารประกอบเชิงซ้อน (Coordination complex, Complex compound)

สารประกอบเชิงซ้อนหรือไอออนเชิงซ้อน โดยทั่ว ๆ ไป ประกอบด้วยอะตอมหรือไอออนที่อยู่ตรงกลางซึ่งส่วนใหญ่เป็นโลหะเรียกว่า นิวเคลียสอะตอม (Nucleus atom) มีกลุ่มของไอออนหรือโมเลกุลต่าง ๆ ห้อมล้อมอยู่ ไอออนหรือโมเลกุลที่ห้อมล้อมอยู่นี้เรียกว่า ลิแกนด์ (ligand) โดยปกติพันธะระหว่างอะตอมกลางกับลิแกนด์เป็นพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์ ดังนั้นจึงเรียกสารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้อีกชื่อหนึ่งว่า สารประกอบโคออดิเนชัน เช่น MnO_4^- มีแมงกานีสเป็นอะตอมกลาง มีออกซิเจนล้อมรอบ $Fe(CN)_6^{3-}$ มีเหล็กเป็นอะตอมกลางและมีไซยาไนด์ไอออนล้อมรอบ ดังนี้





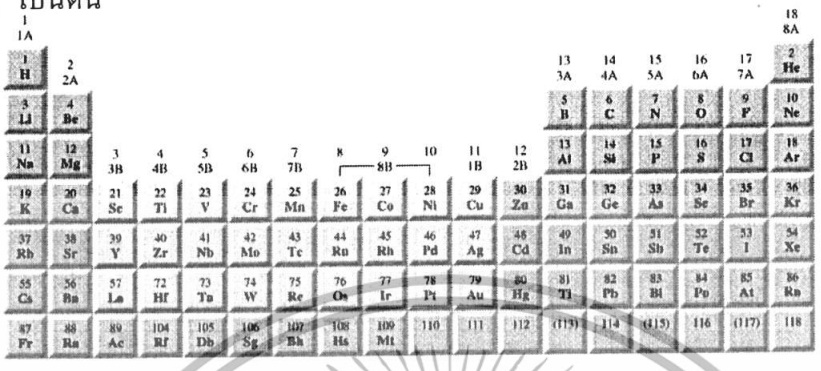
สารประกอบเชิงซ้อน	ไอออนบวก	ไอออนลบ	สีของสารประกอบ
$KMnO_4$	K^+	$[MnO_4]^-$	ม่วงแดง
K_2MnO_4	K^+	$[MnO_4]^{2-}$	เขียว
$PbCrO_4$	Pb^{2+}	$[CrO_4]^-$	เหลือง
$K_3[Fe(CN)_6]$	K^+	$[Fe(CN)_6]^{3-}$	ส้มแดง
$[Cu(NH_3)_4]SO_4$	$[Cu(NH_3)_4]^{2+}$	$[SO_4]^{2-}$	คราม
$[Cu(H_2O)_5]SO_4$	$[Cu(H_2O)_5]^{2+}$	$[SO_4]^{2-}$	น้ำเงิน

ตารางแสดงสารประกอบเชิงซ้อนบางชนิดและไอออนองค์ประกอบ

ธาตุแทรนซิชันส่วนใหญ่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนหรือไอออนเชิงซ้อนที่มีสีต่าง ๆ กัน ธาตุแทรนซิชันธาตุหนึ่งอาจเกิดสารประกอบที่มีธาตุองค์ประกอบเหมือนกันได้มากกว่าหนึ่งชนิด เช่น $K_2Cr_2O_7$ มีสีส้ม K_2CrO_4 มีสีเหลือง ซึ่งการเกิดสีของสารประกอบแทรนซิชันนี้นอกจากขึ้นอยู่กับเลขออกซิเดชันของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

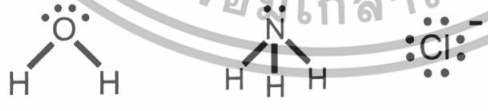
ธาตุแทรนซิชันแล้ว ยังขึ้นอยู่กับ ลิแกนด์ (Ligand) ที่มาล้อมรอบอะตอมของธาตุแทรนซิชันด้วย แม้ว่าสารเชิงซ้อนจะมีส่วนที่สำคัญในองค์ประกอบทางเคมีของโลหะแทรนซิชันก็ตาม ธาตุหมู่หลักบางชนิดอาจเกิดสารเชิงซ้อนได้เช่น อะลูมิเนียม (Al) ดีบุก (Sn) และตะกั่ว (Pb) สามารถสร้างไอออนเชิงซ้อนเป็น AlF_6^{3-}, $SnCl_4^{2-}$ และ PbI_4^{2-} เป็นต้น



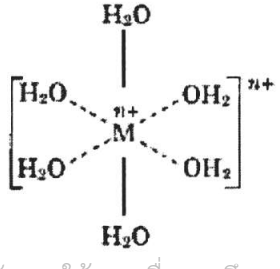
ตาราง 2.1 แสดงตารางธาตุโลหะแทรนซิชัน

จากที่กล่าวมานี้สารเชิงซ้อนเกิดขึ้นระหว่างไอออนของโลหะกับลิแกนด์(ligand) หรือ คอม เพล็กซิงเอเจนต์ (complexing agent) ซึ่ง ลิแกนด์เป็นโมเลกุลหรือสารที่ประกอบด้วยอะตอมอย่างน้อย 1 อะตอมที่มีอิเล็กตรอนคู่หนึ่งเป็นอิสระ (unshared pair of electron) สามารถให้อิเล็กตรอนกับโลหะได้ ligand อาจเป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุเช่น แอมโมเนีย หรือเป็นประจุบวก เช่น เฮไลด์ ไฮดรอกไซด์ ซัลเฟต และฟอตเฟต เป็นต้นต้น แบ่ง ligand ได้เป็น 2 ชนิดตามจำนวนหมู่ที่ให้อิเล็กตรอนอิสระคู่หนึ่งซึ่งมีอยู่ใน 1 โมเลกุลของ ligand ที่สามารถจับกับโลหะ ดังนี้

1. unidentate ligand หรือ monodentate ligand เป็น ligand ที่มีหมู่ซึ่งให้อิเล็คตรอนอิสระเพียงคู่เดียวใน 1 โมเลกุล ตัวอย่างเช่น เฮไลด์ อิออน (Cl-, I-), CN- และแอมโมเนีย (NH_3), H_2O

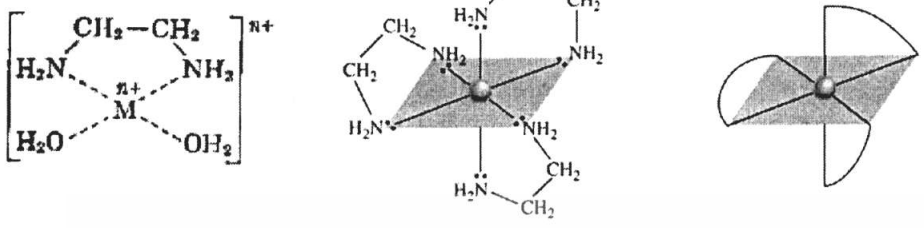


ลักษณะการจับกันระหว่าง unidentate ligand กับโลหะที่มี coordination number 6 มีโครงสร้างเป็น octahedral

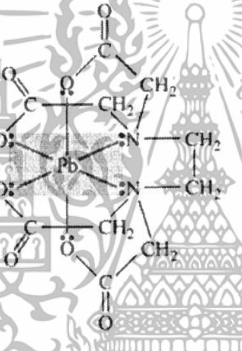


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

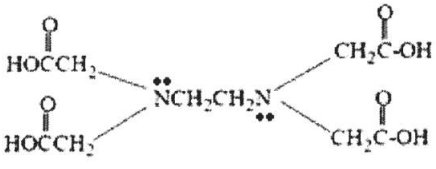
2. Bidentate ligand เป็น ligand ที่มีหมู่ซึ่งให้อิเล็คตรอนคู่หนึ่งซึ่งไปจับกับโลหะอยู่ 2 หมู่ใน 1 โมเลกุล ตัวอย่างเช่น ethylenediamine เป็น bidentate ligand



3. Multidentate ligand หรือ polydentate ligand เป็น ligand ที่ใน 1 โมเลกุลมีหมู่ที่ให้ อิเล็คตรอนอิสระคู่หนึ่งมากกว่า 2 หมู่ เช่น EDTA (Ethylenediamine tetraacetic)



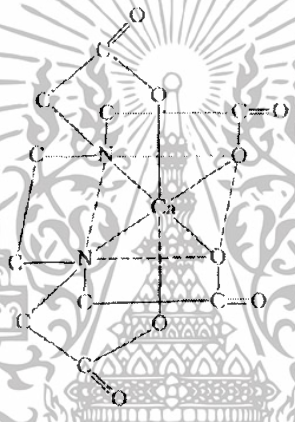
จะเห็นว่าลักษณะการจับกันระหว่าง multidentate ligand กับโลหะเป็น ring structure ที่มีโลหะอยู่ตรงกลางและให้สารที่เป็นวง ring structure หรือ Clawlike จะเรียกสารประกอบเชิงซ้อนนี้ว่า chelate complex ซึ่งอาจจะละลายหรือไม่ละลายในน้ำก็ได้ multidentate ligand ที่ทำให้เกิด chelate complex ที่ไม่ละลายน้ำเรียกว่า chelating agent เช่น oxine หรือ dimethylglyoxime ซึ่งใช้ประโยชน์ในการกำจัดโลหะที่ไม่ต้องการออกจากสารละลายโดยทำให้โลหะนั้นตกตะกอนลงมา สำหรับ multidentate ligand ที่ทำให้ chelate complex ที่ละลายน้ำได้เรียกว่า sequestering agent สารในกลุ่ม aminopolycarboxylic acid มี 2 ตัว คือ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และเกลือของ EDTA คือ disodium EDTA โดย EDTA เป็น hexadentate ligand ที่มีอะตอมที่สามารถให้คู่อิเล็กตรอนได้ คือ ออกซิเจน 4 อะตอม และไนโตรเจน 2 อะตอมตามสูตรโครงสร้างในรูป



EDTA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chelates ที่เกิดขึ้นอาจทำให้เกิดการตกตะกอนของโลหะหรืออาจได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่คงตัวและละลายน้ำได้ ในกรณีที่ chelate ที่เกิดขึ้นเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถละลายน้ำได้ จะเรียกปฏิกิริยานั้นว่า sequestration และเรียก ligand ที่ทำให้เกิด chelates ที่ละลายน้ำว่า sequestering agents สาร EDTA นั้นถือว่าเป็นคีเลตติงลิแกนด์ที่ดี เพราะมีอะตอมจ่ายหลายอะตอม เมื่อโอบจับโลหะไอออนจะได้ให้ไอออนเชิงซ้อน มีการใช้ sequestering agent ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆมากมาย เช่น ใช้ในการกำจัด calcium ion ในน้ำกระด้าง หรือ ใช้ในน้ำสลัดเพื่อขจัดไอออนของโลหะหนักที่มีอยู่ในสารละลายเพราะโลหะเหล่านี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของน้ำมันที่มีอยู่ในน้ำสลัดทำให้มีกลิ่นเหม็นหืนได้ นอกจากนี้เนื่องจาก EDTA สามารถจับกับ ไอออนของโลหะหนัก เช่น iron, copper ions จึงสามารถนำมาใช้ในการป้องกันการเสื่อมสลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้



รูปที่ 2.3 แสดงการจับ Calcium ions กับ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการพัฒนาวิธีปรับปรุง หรือดัดแปลงวิธีให้เหมาะสมแล้ว และมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น หรือเลือกมานั้นเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในงานวิเคราะห์เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์เฉพาะที่ตั้งไว้ เช่น เพื่อหาปริมาณส่วนประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งในผลิตภัณฑ์ เพื่อตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์มีคุณภาพตามเกณฑ์ที่กำหนดหรือไม่ เพื่อตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์มีคุณภาพเข้ามาตรฐานหรือไม่ เป็นต้น

เป้าหมายการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1. ความแม่น(Accuracy) เป็นค่าแสดงความใกล้เคียงระหว่างผลการทดลองและค่าอ้างอิงที่ยอมรับ
2. ความเที่ยง(Precision) ความใกล้เคียงระหว่างผลการทดลองอิสระที่ได้มาภายใต้เงื่อนไขที่กำหนดไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. พิสัย(Range) พิสัยของวิธีทดสอบที่ใช้คือช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ระหว่างค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่เป็นเส้นตรง และให้ผลการทดลองที่มีความเที่ยง ความแม่น ตามเกณฑ์ที่ยอมรับ ภายใต้สภาวะการทดลองที่ระบุไว้

4. ความเป็นเส้นตรง(Linearity) ความสามารถของวิธีที่ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์

5. ขีดจำกัดของการตรวจพบ(Limit of detection LOD) ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้แต่ไม่จำเป็นต้องทราบว่ามีปริมาณเท่าไหร่ ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด

6. ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ(Limit of quantitation LOQ) ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ โดยมีความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด

7. ความจำเพาะเจาะจง(Specificity) ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ต้องการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง และสามารถตรวจแยกเฉพาะเจาะจงสำหรับสารที่สนใจออกจากสารประกอบอื่นในตัวอย่าง ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด

8. ความคงทน(Robustness) ความคงทนของวิธีวิเคราะห์เป็นตัวชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ว่าคงใช้ได้เป็นที่น่าเชื่อถือ แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในวิธีวิเคราะห์

2.6 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

โครมาโทกราฟี (chromatography) เทคนิคที่ใช้แยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างในด้านสมบัติที่ต่างกันของสารที่ต้องการแยก เช่น สมบัติในการละลาย ขนาดโมเลกุล ประจุบนโมเลกุล หมู่สำคัญทางเคมี หรือความจำเพาะตัวทางชีวภาพของสาร ส่วนประกอบสำคัญในระบบการแยก ส่วนที่อยู่กับที่หรือไม่เคลื่อนที่ (stationary phase) อาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ยึดแน่นบน supporting media (ตัวค้ำจุน) ส่วนที่เคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นของเหลวผสม ซึ่งจะทำหน้าที่ชะแยกสารออกจากส่วนไม่เคลื่อนที่หรือจากจุดเริ่มต้นไปตามทิศทางการเคลื่อนที่ของ mobile phase นั้น

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) หรือที่นิยมเรียกว่า HPLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quatitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่นในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ฯลฯ สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณในระดับไมโครกรัม ในกรณีทั่วๆไป หรือละเอียดถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกหน่วยตรวจวัดที่เหมาะสม HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile Phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(column) สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณที่ตรวจวัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณแสดงผลออกมาเป็น โครมาโทแกรม (chromatogram) ประกอบด้วยพีก (peaks) ของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม

ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC

Mobile phase reservoir

- ใช้บรรจุเฟสเลื่อนที่ (mobile phase/ Solvent) หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่างเป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่คอลัมน์

Pump

- การแยกสารใน HPLC อาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก ทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทานปั๊มที่ใช้ควรทำให้เกิดความดันได้สูงประมาณ 6000 psi (lbs/in2) และมี flow rate อยู่ในระหว่าง 0.1-10 ml/min

Sample injection system

ระบบฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ ตามหลักแล้วควรฉีดสารด้วยปริมาณน้อยๆต้องคอยระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขณะฉีดสารเพื่อจะให้เกิดประสิทธิภาพการแยกเกิดขึ้นสมบูรณ์

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ด้วยเทคนิค HPLC มีด้วยกัน 3 วิธีคือ

1) **Septum injector**

วิธีการนำสารเข้าเครื่องนี้จะคล้ายกันใน GC มากและบางทีอาจเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดจากวิธีทั้งหมด สามารถฉีดในปริมาตรที่เราต้องการได้ วิธีการฉีดง่าย ราคาถูกเป็นการฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง จนทำให้สัมผัสกับเฟสอยู่กับที่โดยตรง

2) **Sampling valve**

ระบบฉีดสารประเภทนี้ถือว่าเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในเทคนิค HPLC เนื่องจากสามารถใช้ในความดันและอุณหภูมิสูงได้ รวดเร็วและสามารถทำซ้ำได้ สามารถใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณมากๆ ได้แล้วยังมีความผิดพลาดน้อยกว่า 0.1% และสามารถฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์แบบอัตโนมัติได้อย่างง่ายดาย

3) **Automatic valve**

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยวิธีนี้นั้นจะใช้งานสะดวกมาก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก หรือเมื่อต้องการฉีดสารตัวอย่างที่เหมือนกันซ้ำๆ Automatic valve มีประโยชน์หลายอย่าง ซึ่งอาจทำงานได้ด้วยตัวมันเองหรือควบคุมโดย LC computer การนำตัวอย่างเข้าสู่ระบบอาจทำได้โดยการผลักดันโดยใช้แรงลม ตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิลิตร อาจถูกบบรจุลงในที่ใส่สารที่ถูกปิดอย่างมิดชิด ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในบางระบบนั้นจะมีความซับซ้อนมาก และมันยังอาจควบคุมการฉีดที่มีปริมาณของตัวอย่างที่ไม่คงที่ได้ในช่วงระยะเวลาที่แน่นอนและเป็นลำดับ

Column

- stationary phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

1. Analytical column : ความยาว 10-30 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-10 มม. วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ เช่น stainless steel , polyethylene , แก้ว , อื่น ๆ Packing material ที่อยู่ภายใน ได้แก่ silica based , resins , gels , bonded phases

2. Guard column นิยมใช้ต่อก่อนเข้า Analytical column เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของ Analytical column จะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับตัวทำละลาย ส่วนประกอบของวัสดุบรรจุจะคล้ายคลึงกับ Analytical column แต่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าและราคาไม่แพงมากนัก

Detector

คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก

ยูวี-วิสิเบิล ดีเทกเตอร์ (UV-VIS Detectors)

หลักการทำงานของเครื่องตรวจชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่างเครื่องชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันมากใน HPLC เพราะเครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีลักษณะพิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ สารที่ดูดกลืนคลื่นแสงไวโอเลตส่วนมากจะเป็นพวกที่มี π- bonding electrons และ พวกที่มี unshaired electron เช่น โอเลฟิน (Olefin) สารประกอบอะโรมาติก สารประกอบที่มี C=O, C=S, -N=O-, -N=N- อยู่ใน โมเลกุล การดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่ง จะเป็นไปตามกฎของแลมเบิร์ดและเบียร์ (Lambert-Beer law) ในปัจจุบัน ยูวี-วิสิเบิล ดีเทกเตอร์ที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น
3 ชนิด คือ

- **Fixed – wavelength UV detector** ดีเทกเตอร์ชนิดนี้ประกอบด้วย flow-through cell และแหล่งกำเนิดแสง(Light source) ที่ใช้เป็นแบบหลอดที่ทำด้วยปรอทความดันต่ำ ซึ่งให้แสงที่เปล่งออกมาที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยทำให้เป็นลำแสงด้วยเลนส์ที่ทำด้วยควอทซ์ แล้วให้แสงนี้ผ่านเซลล์ของสารละลานมาตรฐาน และสารตัวอย่าง แสงที่ผ่านออกมาจะผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์ แล้วจึงผ่านไปยังโฟโตเซลล์ (Photo cell) หรือ โฟโตไดโอด 2 ตัว โดยทั่วไป Flow-through cell จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และยาว 10 มิลลิเมตร และมีปริมาตร 8 ไมโครลิตร นอกจาก Mercury lamp แล้วอาจใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่นที่ใช้ได้กับ Fixed – wavelength detector ได้แก่ Zn lamp(206 นาโนเมตร) และ Cd lamp (214 นาโนเมตร) สำหรับ D_2 lamp จะเปล่งแสงออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วงยูวี (200-400 นาโนเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และบางช่วงของวิสิเบิล ดีเทคเตอร์ที่ใช้ฟิลเตอร์กรองแสง หรือใช้โมโนโครมาเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้องการ จะใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D_2 lamp

- **Variable UV-VIS detector** สามรถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้มากกว่าหนึ่งความยาวคลื่นในขณะการวิเคราะห์ ประกอบด้วย D_2 lamp หลอดทั้งสองนี้สามารถใช้วัดแสงได้ในช่วง 190 – 800 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังมีโมโนโดมาเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้ ดังนั้นเครื่องดีเทคเตอร์นี้จึงมีประโยชน์มาก สามารถใช้ตรวจหาสารตัวอย่างได้ทั่วไป เพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด และเหมาะสมมากในการนำมาใช้กับ Gradient elution และตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จะไม่ดูดกลืนแสงยูวี เช่น Acetronitrile สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 190 นาโนเมตร ดังนั้นจึงไม่มีข้อจำกัดที่จะเลือกตัวทำละลายมาใช้กับเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ เครื่องยูวีดีเทคเตอร์นี้จึงมีประโยชน์มากในการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆได้ โดยที่ตัวทำละลายหรือสารประกอบที่ปนอยู่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี จึงไม่รบกวนการวิเคราะห์นี้

- **Photodiode array detector (PDA)** ดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดว่าเป็น Solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามรถวัดแสงได้หลายๆความยาวคลื่นในขณะเดียวกัน ระบบทางเดินของแสงจะแตกต่างจากยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยทั่วไป คือ ระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง "Reverse Optics" คือแสงจากแหล่งกำเนิดหรือจากหลอดยูวีจะผ่านไปยัง Flow-through cell ก่อนที่จะไปยังโมโนโครมาเตอร์หรือเกรตติง เมื่อแสงที่ตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกไปเป็นความยาวคลื่นต่างๆแล้วจะไปตกกระทบกับแผงของโฟโตไดโอด เนื่องจากดีเทคเตอร์นี้สามารถสแกน UV-VIS spectrum ได้รวดเร็วมาก ดังนั้น การนำเอาเครื่องดีเทคเตอร์นี้มาใช้กับ HPLC จะทำให้ทราบข้อมูลของพีกต่างๆ ในยูวีสเปกตรัมที่อยู่ในโครมาโทแกรมได้อย่างดี และข้อมูลต่างๆเหล่านี้ยังสามารถเก็บเข้าไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ ซึ่งสามารถนำออกมาใช้เมื่อไรก็ได้ ในการตรวจหาสารประกอบที่อยู่ในตัวอย่างว่าเป็นอะไรนั้น อาจนำไปเปรียบเทียบกับสารประกอบที่คิดว่าน่าจะเป็นไปได้ แล้วยังสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็น 3 มิติ ซึ่งเป็นสเปกตรัมที่แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ความยาวคลื่น และเวลา นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมยังใช้ตรวจหาสารเจือปนได้อีกด้วย

การใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis)

ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้ ทำโดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับสารมาตรฐาน โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน เช่น อุณหภูมิ ชนิดของคอลัมน์ ชนิดและอัตราการไหล (flow rate) ของเฟสเคลื่อนที่ถ้าสารตัวอย่างและสารมาตรฐานมีค่า RT เท่ากัน เป็นสารเดียวกัน วิเคราะห์เพิ่มเติม โดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ และ / หรือ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีก (peak) ต่าง ๆ สามารถวัดปริมาณของสารในแต่ละพีก ได้โดย

1. วัดความสูงของพีก (Peak height) เทียบกับความสูงของพีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ
2. วัดพื้นที่พีก (peak area) เทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป

2.7 งานวิจัยที่กี่ยวข้อง

คศ.1983 Yamaguchi และคณะ [1] ได้ทำการตรวจวัดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง iron(III) กับ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ Nitrilotriacetic acid (NTA) คือจะแยกสารตัวอย่างสังเคราะห์ผสมของทั้งสองโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) คอลัมน์ที่ใช้แพ็คด้วย ZORBAX-ODS ขนาด 250 × 4.6 มิลลิเมตรซึ่งผลของ pH มีความสำคัญอย่างมากของ eluent สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ประกอบด้วย tetrabutylammonium bromide และacetonitrile จากสภาวะโครมาโทรกราฟีนี้สารประกอบเชิงซ้อน iron(III)-enta จะถูกแยกออกมาโดยที่สารประกอบเชิงซ้อน iron(III)-nta จะยังคงอยู่ในคอลัมน์

คศ.2001 Yuan C. Lee [2] ได้ทำการศึกษา และพัฒนาวิธีตรวจวัด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) โดยอยู่บนพื้นฐานการดูดกลืนแสง fluorescent ของการเกิดเป็นสารเชิงซ้อนในรูป terbium–EDTA–salicylic acid สามารถที่จะตรวจวัด EDTA แต่เดิมจากหน่วยพิโคโมลไปเป็นหน่วยนาโนโมลได้ด้วย microtiter plate ภายในเวลา 10-20 นาที แต่มีข้อน่าสังเกตที่ว่า diethylenetriamine tetraacetic acid ไม่สามารถที่จะวิเคราะห์ได้ในสภาวะเดียวกันนี้

คศ.2002 Pistos และคณะ [3] ได้ทำการศึกษา และพัฒนาวิธีตรวจวัด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ด้วยการนำตัวอย่างมาสกัดกับ ethylacetate และระเหยชั้นที่เป็น organic ให้แห้งแล้วนำไปเจือจางด้วย 0.025%(w/v) copper nitrate ก็จะได้สารละลายเชิงซ้อนในรูปของ EDTA-copper จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) ในรูปแบบของ injection คอลัมน์ที่ใช้คือ C-8 Hypersil เฟสเคลื่อนที่ใช้ Acetonitrile และ0.015 M tetrabutylammonium hydroxide ในอัตราส่วน 10:90 (v/v) ปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.0 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร/นาที และตัวตรวจวัดยูวีที่ 300 นาโนเมตร สารตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ดีมากกว่า 0.9995 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 2.5% และขีดจำกัดในการตรวจวัดที่พบคือ 1.97 µg/ml

คศ.2002 Zhiwei และคณะ [4] ได้ทำการศึกษา และพัฒนาวิธีตรวจวัด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ในน้ำดื่มโดยเทคนิค capillary electrophoretic-large volume stacking มีปั๊มที่ใช้คือ electroosmotic flow (EOF) และตัวตรวจวัดยูวีที่ 258 นาโนเมตร ซึ่งจะให้ EDTA เกิดสารเชิงซ้อนกับ iron(III) พบว่าผลที่ได้ของพีกตอบสนองต่อความเข้มข้นใจช่วงความเป็นเส้นตรงระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

107854

ว่าง 5.0 to 600.0 g/L และ 0.7 to 30.0 mg/L ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์คือ 0.9988 และ 0.9990 ตามลำดับ และขีดจำกัดในการตรวจวัดคือ 0.2 g/L ด้วยการเติม preconcentration ที่ทำ 10 เท่าของความเข้มข้นโดยอยู่บนพื้นฐานของ signal-to-noise ratio เท่ากับ 3 ซึ่งวิธีนี้เป็นการวิเคราะห์โดยเทคนิค capillary electrophoretic ที่เป็นแบบดั้งเดิมแต่ถ้าเป็นการวิเคราะห์โดยเทคนิค LVSEP ขีดจำกัดในการตรวจวัดจะมีการเติม preconcentration ที่ทำ 1000 เท่าของความเข้มข้น ซึ่งจะมีความไวในการวิเคราะห์มากกว่ามากๆ

คศ.2003 M.C. Fidler. และคณะ [5] ได้ทำการตรวจวัดความเสถียรของระบบแสงของสารประกอบเชิงซ้อน NaFeEDTA ในซอสถั่วเหลืองและซอสปลาที่เก็บอยู่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ผลที่ได้ NaFeEDTA จะไม่หายไปแต่ NaFeEDTA จะหายไป 35% เมื่อเก็บอยู่ในขวดที่ใสและโดนแสงโดยตรงภายใน 2-6 สัปดาห์แต่สามารถจะป้องกันได้โดยเก็บอยู่ในขวดอำพันหรือขวดที่ใสในที่มืด และทำการวิเคราะห์ NaFeEDTA นี้ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) คอลัมน์ที่ใช้คือ ODS RP-18 เป็นเทอร์โมสแตท เฟสเคลื่อนประกอบด้วย 10% Acetonitrile ,0.01M ammoniumdihydrogen phosphate buffer และ 40% tetrabutylammonium hydroxide pH 2.42 ปรับได้โดย 85% ortho-phosphoric acidและใช้ Diode array detector ที่ความยาวคลื่น 257 nm.

คศ.2006 Carolina E. และคณะ [6] ได้ทำการตรวจวัดวิเคราะห์ EDTA ในเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ที่ขายกันทั่วไปในท้องตลาดได้ถูกพัฒนาขึ้นมาและได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ในการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ RP C18 โดย 0.01 M ammonium phosphate monobasic: acetonitrile: tetrabutylammonium hydroxide 40% (90:10:0.2) pH 2.42 เป็นเฟสเคลื่อนที่ และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 257 nm. ความใช้ได้ของวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ EDTA ได้อย่างมีประสิทธิภาพและแม่นยำ โดยมีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด 0.6 mg/L ขีดจำกัดของปริมาณสาร 2.0 mg/L ค่าความเที่ยง(RSD) เป็น 4.4 ค่าความแม่น(เปอร์เซ็นต์การกลับคืน) 92.5% และได้กราฟเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-20 mg/L จากวิธีการดังกล่าวสามารถใช้วิเคราะห์ EDTA ในตัวอย่าง 18 ชนิด ตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ เครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ที่ผสมคาร์บอเนตและที่ไม่ผสมคาร์บอเนต ทั้งนี้รวมถึงเครื่องดื่มที่อยู่ในรูปผง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

1. Disodium-calcium salt of EDTA ($Na_2CaEDTA$ 374.28g/mol) HPLC grade ($\geq$ 97%) จากบริษัท Fluka

2. Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) Analytical grade ($\geq$ 99%) จากบริษัท Fluka

3. Ammonium phosphate monobasic ($NH_4H_2PO_4$) HPLC grade ($\geq$ 99%) จากบริษัท Fluka

4. Acetonitrile (CH_3CN) 99% HPLC grade จากบริษัท Fisher Scientific

5. Tetrabutylammonium hydroxide 40% ($[CH_3(CH_2)_3]_4NOH$) HPLC grade จาก บริษัท Fluka

6. น้ำปราศจากไอออนจากเครื่อง Milli-Q

7. ตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์

   7.1 ตัวอย่างที่มี carbonate ได้แก่ Coke Pepsi twist Mirinda strawberry

   7.2 ตัวอย่างที่ non-carbonate ได้แก่ Tipco cool fit (Grape Mix) Splash Kool Aid Tropicana twister Green spot Unif purple carrot with mixed fruit juice

   7.3 Sample blank ที่ไม่มี EDTA

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น Waters 486

2. คอลัมน์ HIQ Sil C_{18} ขนาด 4.6 × 150 mm บริษัท KYA TECH Corporation

3. UV detector รุ่น Waters 486 บริษัท Waters

4. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer) รุ่นTYPM21/1 ความเร็วรอบ 0-1,200รอบ/นาที

5. เครื่องเซนต์ติฟิวด์

6. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Metromh รุ่น 713 pH meter

7. เครื่องอัลตราโซนิค

8. ไมโครปิเปต

9. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analysis balance) Precisa 205A

10. เครื่องกรองแบบสูญญากาศพร้อมขวดกรองแบบสูญญากาศขนาด 1000 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่

เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยส่วนผสมของ 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 โดยปริมาตร

การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนที่ใช้เท่ากับอัตราส่วน 900 : 100 : 2 โดยปริมาตร

1. ทำการเตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic ก่อนโดยชั่ง ammonium phosphate monobasic 11.5030 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลาย 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic โดยนำสารละลายที่เตรียมในข้อ 1 มา 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน จนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3. นำสารละลาย 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic ที่เตรียมได้ในข้อ 2 มา 900 มิลลิลิตร ผสมกับ acetonitrile 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย tetrabutylammonium hydroxide 40% 2 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปใช้ให้กรองด้วยกระดาษกรอง Nylon และทำการไล่อากาศด้วยเครื่องอัลตราโซนิค นาน 15 นาที

3.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อีดีทีเอในเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ด้วยเทคนิค HPLC

3.2.2.1 ทดสอบหาค่า pH ที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

เตรียมเฟสเคลื่อนที่ 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 โดยปริมาตร และทำการปรับ pH เป็น 6.0 5.0 4.0 และ 3.0 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ความเข้มข้น 10 ppm โดยใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ปริมาตรฉีดวิเคราะห์เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร

3.2.2.2 ทดสอบอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

เตรียมเฟสเคลื่อนที่ 0.01 M ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 โดยปริมาตรที่ได้ปรับ pH อย่างเหมาะสมแล้วจากข้อ 3.2.2.1 มาทดสอบอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ความเข้มข้น 10 ppm ทดสอบอัตรการไหลที่ 0.8-1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ปริมาตรฉีดวิเคราะห์เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การทำกราฟมาตรฐานสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ

1. ทำการเตรียมสารละลาย stock standard เข้มข้น 10000 ppm ก่อนโดยชั่ง $Na_2CaEDTA$ 10.0000 กรัมละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

2. เตรียมสารละลาย working standard เข้มข้น 1 5 10 20 และ 40 ppm

2.1 ปิเปต stock standard ในข้อ 1 มา 0.01 0.05 0.1 0.2 และ 0.4 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตแยกใส่ขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด

2.2 ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย acetonitrile : water ในอัตราส่วน 1: 1 จนมีความเข้มข้นสุดท้าย 1 5 10 20 และ 40 ppm

3. ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย working standard ที่เตรียมได้ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 50 ppm สารละลาย Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) นำมาใส่ในขวด vial

3.1 เตรียม 50 ppm สารละลาย Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) โดยชั่งมา 0.0050 กรัม

3.2 ละลายด้วยน้ำปาราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. นำไปกรองด้วย Nylon syringe ขนาด 0.45 µm และทำการไล่อากาศด้วยเครื่องอัลตราโซนิคประมาณ 15 นาที ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ฉีดซ้ำระดับละ 6 ครั้งและสร้างกราฟมาตรฐานโดยทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่พีก

3.2.4 การเตรียมตัวอย่างเครื่องดื่ม

ใช้เครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ที่มีขายกันตามท้องตลาดเพื่อมาวิเคราะห์ ตัวอย่างนี้จะมีเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ที่ผสมคาร์บอเนตและที่ไม่ผสมคาร์บอเนต

1. การเตรียมตัวอย่างเครื่องดื่มที่ไร้แอลกอฮอลล์

1.1 ตัวอย่างที่ไม่มีคาร์เนตสามารถนำมาใช้ได้เลย

1.2 ตัวอย่างที่มีคาร์บอเนต ให้นำไปไล่อากาศโดยการกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้าเป็นเวลลา 30 นาที

2.ทำการสกัดโดยใช้ acetonitrile 3 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างเครื่องดื่ม 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

3. นำไปเข้าเครื่องเซนต์ติฟิวด์ที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที นาน 15 นาที

4. นำ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย supernatant(สารละลายที่อยู่ส่วนบน)ไปผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 50 ppm สารละลาย Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$)

5. นำไปกรองผ่าน Nylon syringe ขนาด 0.45 µm และไล่อากาศด้วยเครื่องอัลตราโซนิค ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6. ทำการเตรียมซ้ำอีด 2 ครั้ง แต่ละครั้ง ฉีดซ้ำ 2 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

3.2.5.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอเข้มข้น 1 5 10 15 และ 20 ppm

1.1 ปีเปตสารละลาย stock standard เข้มข้น 10000 ppm มา 0.01 0.05 0.1 0.15 และ 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปีเปตแยกใส่ขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด

1.2 ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย acetonitrile : water ในอัตราส่วน 1: 1 จนมีความเข้มข้นสุดท้าย เข้มข้น 1 5 10 15 และ 20 ppm

2. นำ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย working standard ที่เตรียมได้ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 50 ppm สารละลาย Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) นำมาใส่ในขวด vial

3. นำไปกรองด้วย Nylon syringe 0.45 μm และนำไปไล่อากาศด้วยเครื่องอัลตราโซนิคประมาณ 15 นาที ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ฉีดซ้ำระดับละ 7 ครั้ง

4. จากการเตรียมสารละลายนี้นำไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยทำการพล๊อตกราฟระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่พีก

3.2.5.2 การหาค่าความเที่ยง (Precision) และค่าความแม่น (Accuracy)

1. นำตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ 2 มิลลิลิตร ผสมกับ acetonitrile 2 มิลลิลิตร และนำสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ในข้อ 3.2.5.1 มาทำการ spike ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 20 ppm จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง

2. นำ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายที่เตรียมได้ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 50 ppm สารละลาย Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) นำมาใส่ในขวด vial

3. นำไปกรองด้วย Nylon syringe 0.45 μm และนำไปไล่อากาศด้วยเครื่องอัลตราโซนิคประมาณ 15 นาที ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ฉีดซ้ำระดับละ 10 ครั้ง

4. จากการเตรียมสารละลายนี้นำไปหาความเที่ยง และความแม่น

3.2.5.3 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด และขีดจำกัดของปริมาณสาร

1. เติมสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอลงใน sample blank (ตัวอย่างที่ไม่มีอีดีทีเอ)ให้มีความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 ppm

2. นำ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายที่เตรียมได้ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 50 ppm สารละลาย Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) นำมาใส่ในขวด vial

3. วิเคราะห์ spiked sample blank ระดับละ 3 ซ้ำ

4. คำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละระดับความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. พล๊อตกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วิเคราะห์โดยให้ค่าเฉลี่ยอยู่บนแกน X และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่บนแกน Y หาสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (r) ระหว่างค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5. ถ้ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงลากเส้นกราฟตัดแกน Y จุดตัดคือ S_b (S_b คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์)

6. คำนวณค่าค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด จากสูตร

ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด = $3S_b$

7. การหาค่าขีดจำกัดของปริมาณสารนั้นใช้วิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด แต่ทำซ้ำระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณค่าขีดจำกัดของปริมาณสารได้จากสูตร

ขีดจำกัดของปริมาณสาร = $10S_b$

3.2.5.4 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

วิเคราะห์ matrix blank กับ spiked matrix blank ถ้าสัญญาณของ matrix blank น้อยมากเมื่อเทียบกับสัญญานของ spiked matrix blank แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง

แสดงผลการเปรียบเทียบให้เห็นชัดเจน เช่น chromatogram, spectra, data table เป็นต้น

3.2.5.5 การทดสอบความทน (Robustness)

การศึกษาเรื่องความทนเป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการพัฒนาวิธี โดยการศึกษาในเรื่องของ pH และ flow rate ว่าถ้าเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยจะให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันหรือไม่จากการพิจารณาความใช้ได้ของความเที่ยงและความแม่น เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาการวิเคราะห์อีดีทีเอโดยเทคนิค HPLC

4.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อีดีทีเอ

4.1.1.1 ศึกษาหาค่า pH ที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

การทดสอบใช้สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น waters 486 ขนาดคอลัมน์ 4.6 × 150 mm ขนาดอนุภาค 5.0 µm ตรวจวัดด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ โดยให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 ปริมาตรโดยปริมาตร สำหรับค่า pH ที่ใช้ศึกษาคือ 6.0 5.0 4.0 และ 3.0 ตามลำดับ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1

จากการทดสอบพบว่า เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีการปรับ pH มีค่าเท่ากับ 3.074 ± 0.5% คือค่า pH ที่อยู่ในช่วง 3.059-3.089 จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี แต่ถ้าใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า pH มากกว่า 3.074 ± 0.5% จะทำให้การแยกไม่สมบูรณ์ พีกออกมาไม่สมมาตร(ภาคผนวก ก.) แสดงดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเวลารีเทนชัน (retention time) ของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ที่ได้จากการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ค่า pH ต่างๆกัน

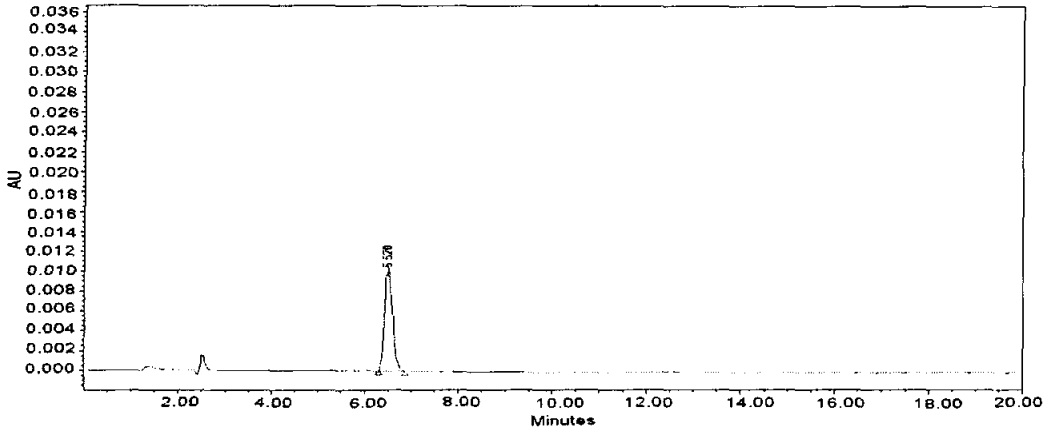
ค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่	เวลารีเทนชัน (นาที)
6.0	5.517
5.0	6.511
4.0	6.510
3.059 – 3.089	6..502

4.1.1.2 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ทดสอบหาอัตราการไหลที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการแยกสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอได้ดี โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ได้จากการศึกษาข้างต้นนั่นคือ 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 ปริมาตรโดยปริมาตร ค่า pH อยู่ในช่วง 3.059-3.089 ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร สำหรับอัตราการไหลที่ใช้ศึกษาคือ 0.8-1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2

จากการทดสอบพบว่าเมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้สารประกอบเชิงซ้อนรวมทั้งส่วนเคลื่อนที่ มีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานเพียงพอที่จะทำให้การแยกเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ และเวลาที่ใช้ในการแยกคือ 6.510 นาที แสดงดังรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



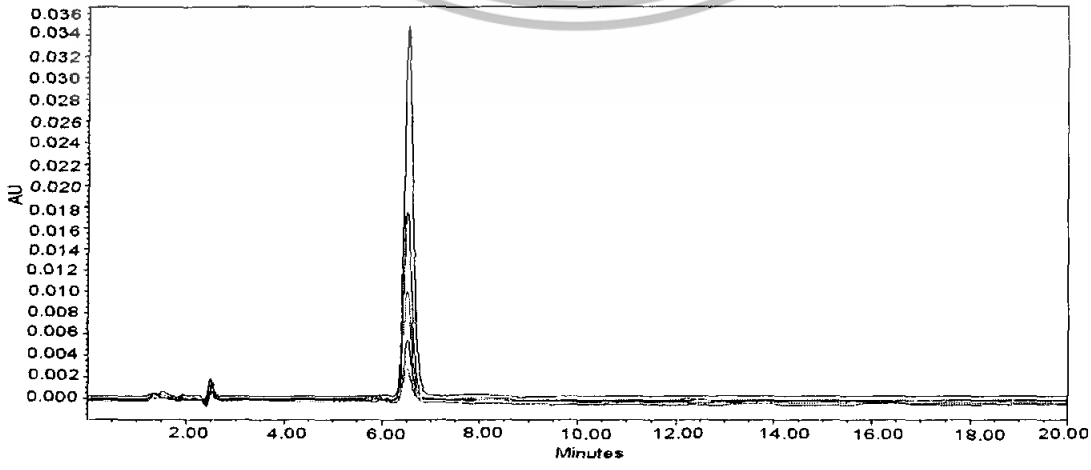
รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 ปริมาตรโดยปริมาตร ค่า pH คือ 3.074 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเวลารีเทนชัน (retention time) ของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ที่ได้จากการใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน(ภาคผนวก ก.)

สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ (ppm)	เวลารีเทนชัน (นาที)				
	อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที	อัตราการไหล 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที	อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	อัตราการไหล 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที	อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที
10	9.152	7.497	6.502	5.0298	4.203

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้นมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีก โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 1-40 ppm ผลจากการสร้างกราฟมาตรฐานทำให้ทราบถึงสมการเชิงเส้น และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ซึ่งในการทดลองนี้มีการแสดงโครมาโทแกรมตามรูปที่ 4.2ก และได้ทำการพล็อตกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอตามข้อมูลในตารางที่ 4.2 จะได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 4.2ข



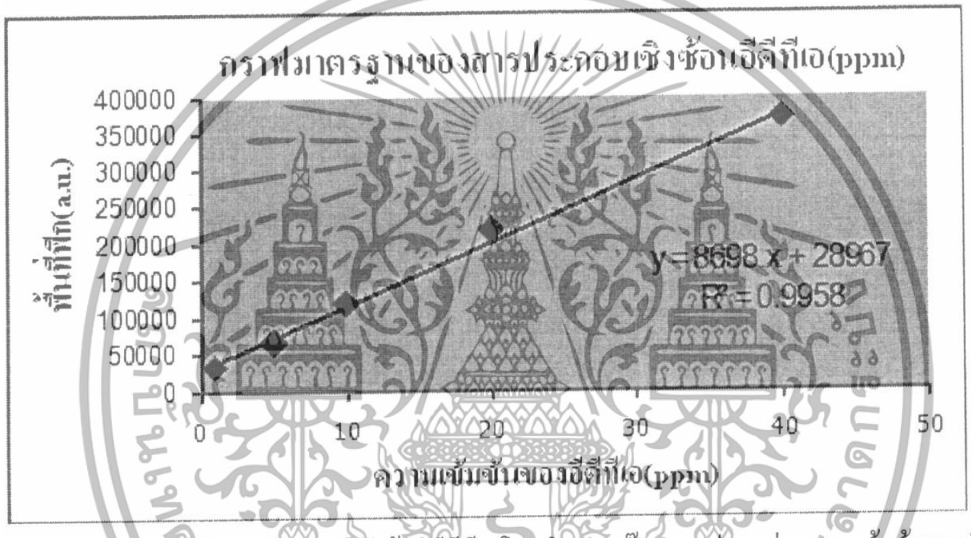
รูปที่ 4.2ก แสดงการซ้อนทับของพีกของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ความเข้มข้น 1 5 10 20 40 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของอีดีทีเอกับพื้นที่ใต้พีก

ความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm)	พื้นที่พีก (a.u.)*
1	32647.6462
5	67403.0000
10	119023.0000
20	216966.6667
40	369886.8333

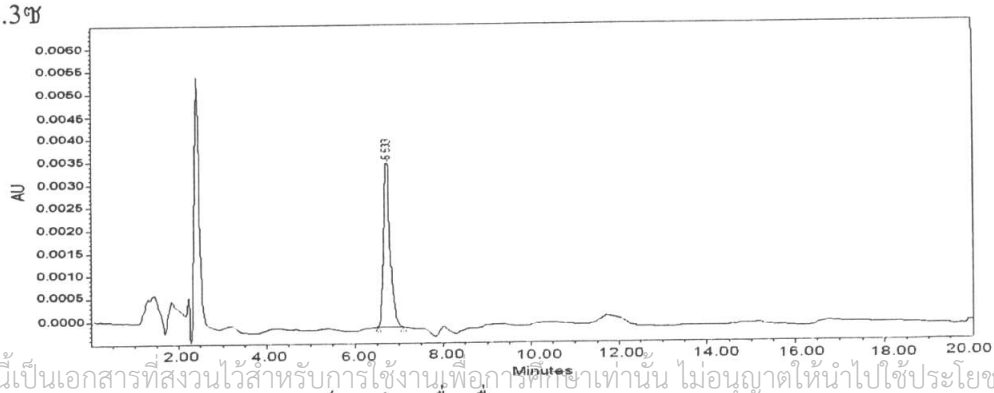
* ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 6 ครั้ง(ภาคผนวก ข.)



รูปที่ 4.2ข แสดงกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอโดยทำการพล๊อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm) และพื้นที่พีก (a.u.)

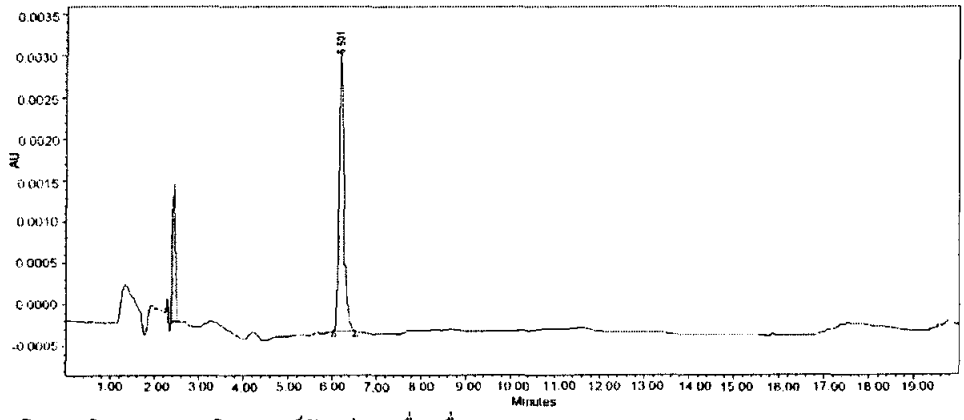
4.3 ผลการวิเคราะห์อีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้นมาทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมาแล้วจากข้อ 3.2.4 การเตรียมตัวอย่างเครื่องดื่มในหัวข้อ 3.2 วิธีการทดลอง ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ผลที่ได้แสดงดังรูป 4.3ก-4.3ซ

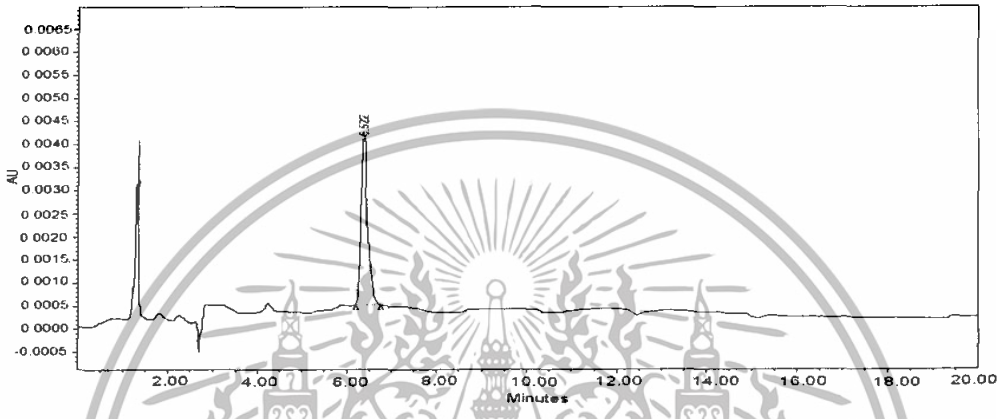


รูปที่ 4.3ก แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Coke

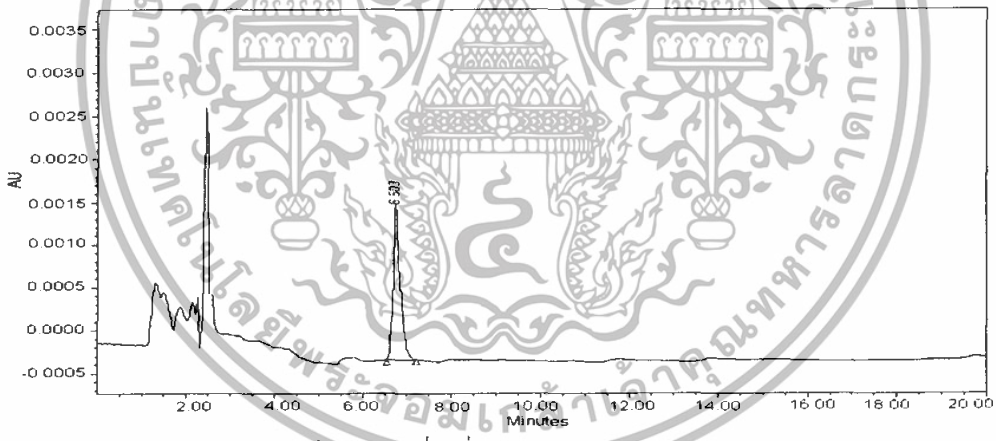
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



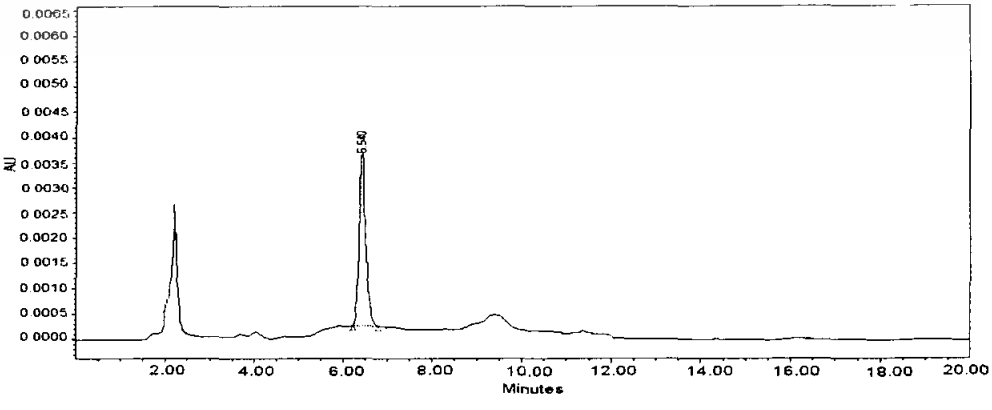
รูปที่ 4.3ข แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Pepsi twist



รูปที่ 4.3ค แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Mirinda strawberry

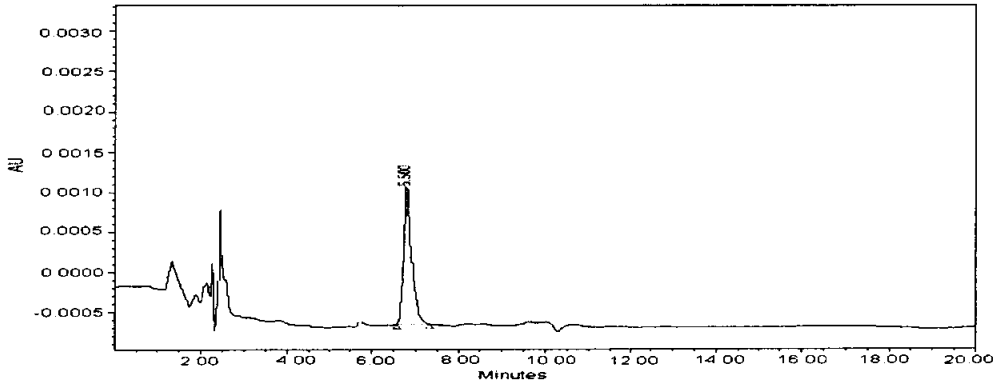


รูปที่ 4.3ง แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Tipco cool fit (Grape Mix)

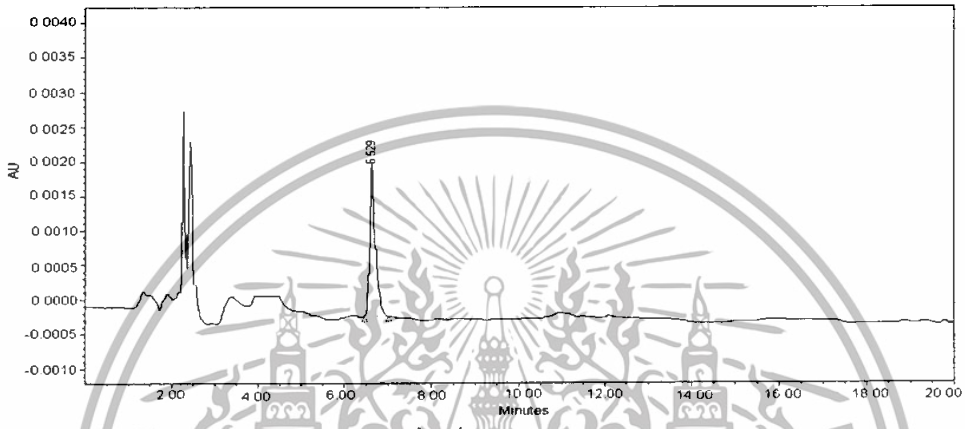


รูปที่ 4.3จ แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Unif purple carrot with mixed fruit juice

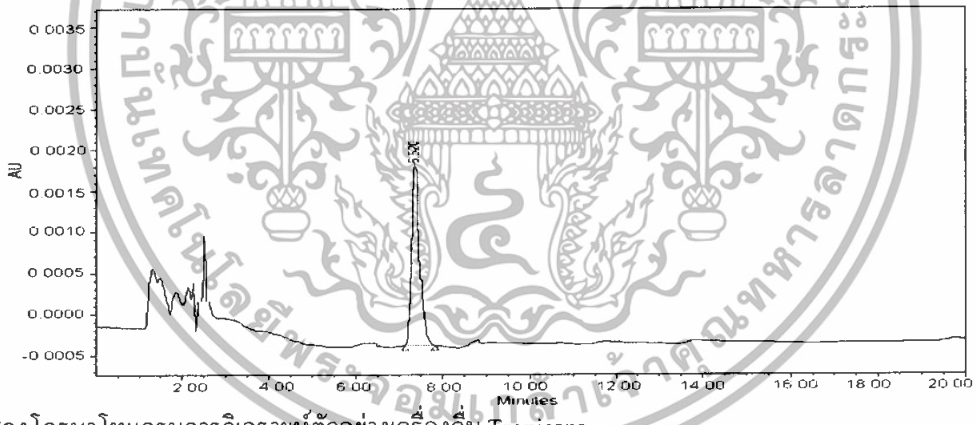
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



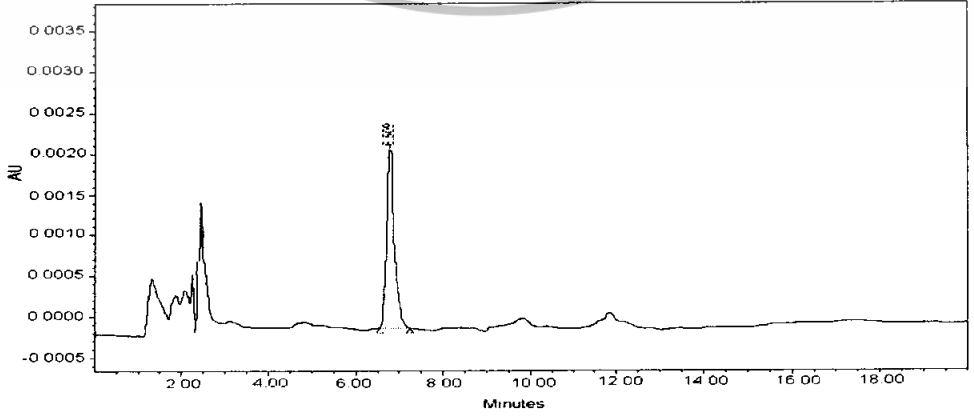
รูปที่ 4.3ฉ แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Splash



รูปที่ 4.3ช แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Kool Aid



รูปที่ 4.3ช แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Tropicana



รูปที่ 4.3ฌ แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม Green spot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูป 4.3ก-4.3ซ ที่แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์อีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มให้นำพื้นที่ใต้พีกของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณหาความเข้มข้นตามสมการที่ได้จากการพล๊อตกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอดังนี้

$$y = 8698.x + 28967$$

โดยที่ x แทนค่าความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm)

y แทนค่าพื้นที่ใต้พีก (a.u.)

ตารางที่ 4.4 สรุปผลข้อมูลที่ได้จากโครมาโทแกรมรูปที่ 4.2ก-4.2ซ

ตัวอย่างเครื่องดื่ม	พื้นที่ใต้พีก (a.u.)*	ความเข้มข้นของ $Na_2CaEDTA$ ที่คำนวณได้ (ppm)*	$\bar{X} \pm SD$
Coke	48144.7	2.21	2.21 ± 0.03
Pepsi twist	40262.0	1.30	1.30 ± 0.30
Mirinda strawberry	42196.8	1.52	1.52 ± 0.36
Tipco cool fit (Grape Mix)	39398.7	1.20	1.20 ± 0.33
Unif purple carrot with mixed fruit juice	41984.7	1.50	1.50 ± 0.34
Splash	37948.3	1.03	1.03 ± 0.39
Kool Aid	41498.5	1.44	1.44 ± 0.43
Tropicana twister	50321.8	2.46	2.46 ± 0.24
Green spot	47747.8	2.16	2.16 ± 0.11

* ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 6 ครั้ง

เมื่อนำความเข้มข้นที่คำนวณได้ของแต่ละตัวอย่างเครื่องดื่มไปเทียบกับข้อ 2.2.3 ข้อกำหนดทางมาตรฐานในหัวข้อ 2.2 วัตถุเจือปนอาหาร Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ในบทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จะพบว่าข้อกำหนดในประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (พ.ศ. 2547) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหารกำหนดปริมาณสูงสุดของอีดีทีเอไม่เกิน 35 ppm ซึ่งตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทั้ง 9 ตัวอย่างนั้นมีค่าของอีดีทีเอไม่เกินมาตรฐานที่กระทรวงกำหนดไว้ มีความปลอดภัย

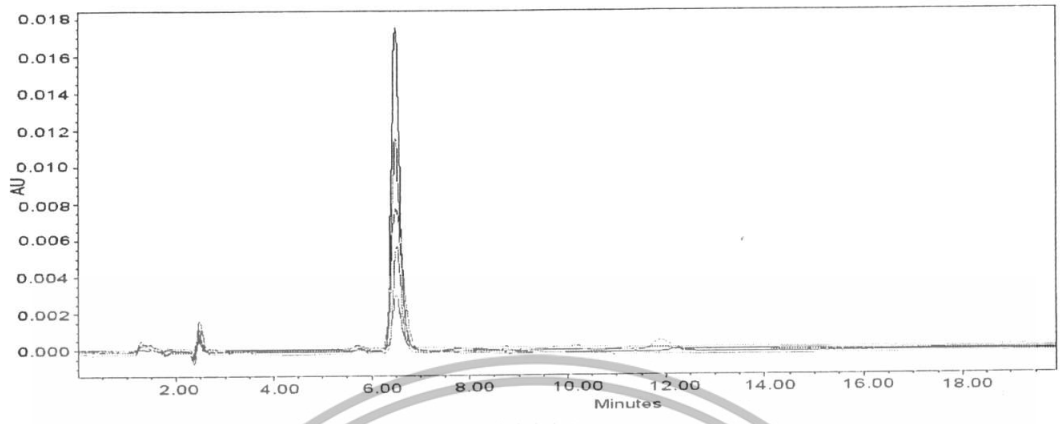
4.4 ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

4.4.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการพล๊อตกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีกที่กำลังศึกษา จะได้สมการคือ $y = 9962.X+19570$ และค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์คือ 0.9982 ซึ่งเหมาะสมกับเส้นตรงที่สุดออกมา จากค่า R^2 ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 จะบอกถึงอิทธิพลของความเข้มข้น ที่มีต่อ พื้นที่ใต้พีก ซึ่งในการทดลองนี้มีการแสดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมตามรูปที่ 4.4ก และเราทำการพล๊อตกราฟมาตรฐานอีดีทีเอตามข้อมูลในตารางที่ 4.5 ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 4.4ข

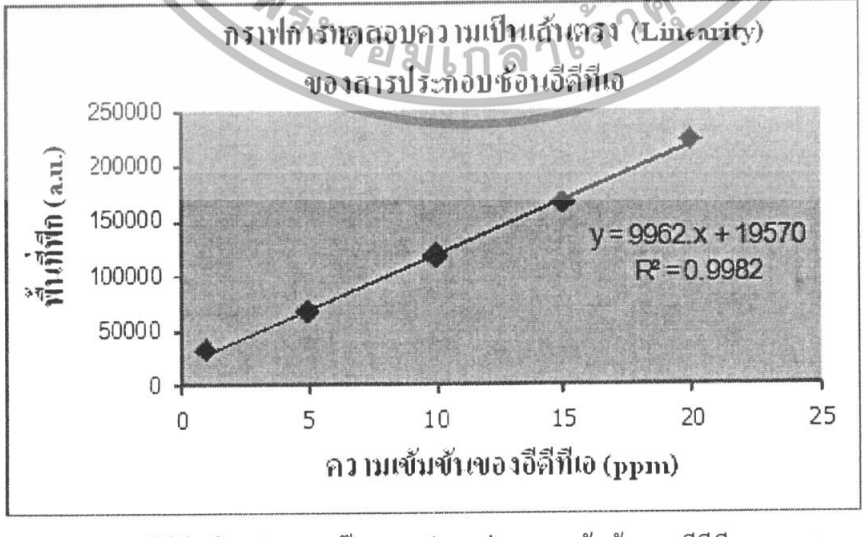


รูปที่ 4.4ก แสดงการซ้อนทับของพีกของสารมาตรฐานอีดีทีเอที่ความเข้มข้น 1 5 10 15 20 ppm

ตารางที่ 4.5 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของ $Na_2CaEDTA$ กับพื้นที่ใต้พีก

ความเข้มข้นของ $Na_2CaEDTA$ (ppm)	พื้นที่พีก (a.u.)*
1	32735.4286
5	67403.85714
10	117774.1429
15	165632.0000
20	222409.2857

* ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 7 ครั้ง(ภาคผนวก ง.)



รูปที่ 4.4ข แสดงกราฟมาตรฐานอีดีทีเอโดยทำการพล๊อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm) และพื้นที่พีก (a.u.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การหาค่าความเที่ยง (Precision) และค่าความแม่น (Accuracy)

<u>การหาค่าความเที่ยง (Precision)</u>

นำตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ผสมกับ acetonitrile และนำสารละลายมาตรฐานอีดีที มาทำการ spike ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 20 ppm ลงในตัวอย่างโดยนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์มาหาค่าเฉลี่ยกับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า RSD นิยมนำเสนอในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ %RSD หรือเรียกว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน(Coefficient of variation,CV) เป็นการแสดงถึงความเที่ยงของการทดลอง

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่าความเที่ยง (ภาคผนวก จ.)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นอีดีทีเอที่ spike (ppm)	ค่าเฉลี่ย*	SD	% RSD
splash	1	38065.2	1627.8075	4.3
	10	110523.4	3630.5600	3.3
	20	200930.9	10242.9500	5.1

* ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 10 ครั้ง

จากค่า % RSD ที่แสดงในตารางจะพบว่าการวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงที่ยอมรับได้ซึ่งเป็นไปตาม The AOAC Manual of Policies and Procedures ได้กำหนดค่าความเที่ยงไว้คือ 5.3 สำหรับความเข้มข้น 100 ppm

<u>การหาค่าความแม่น (Accuracy)</u>

นำตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ผสมกับ acetonitrile และนำสารละลายมาตรฐานอีดีทีมาทำการ spike ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 20 ppm ลงในตัวอย่างเช่นเดียวกับการหาค่าความเที่ยง โดยนำความเข้มข้นที่ได้จากการวิเคราะห์ก่อนและหลังจาก spike มาคิด %recovery เทียบกับปริมาณสารละลายstandard ที่เติมลงไป

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่าความแม่น (ภาคผนวก ฉ.)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นอีดีทีเอที่ spike (ppm)	ความเข้มข้นอีดีทีเอในตัวอย่าง (ppm)	ความเข้มข้นเฉลี่ย * (ppm)	%recovery
splash	1	0.0	1.046	104.6
	10	0.0	9.376	93.8
	20	0.0	19.771	98.9

* ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 10 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากค่า %recovery ที่แสดงในตารางจะพบว่าการวิเคราะห์นี้มีความแม่นที่ยอมรับได้ซึ่งเป็นไปตาม The AOAC Manual of Policies and Procedures ได้กำหนดค่าความเที่ยงไว้คือระหว่าง 90% และ 107% สำหรับความเข้มข้น 100 ppm

4.4.3 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของปริมาณสาร (LOQ)

เติมสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอลงใน sample blank ให้มีความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 ppm และพล็อตกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยให้ค่าเฉลี่ยอยู่บนแกน X และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่บนแกน Y

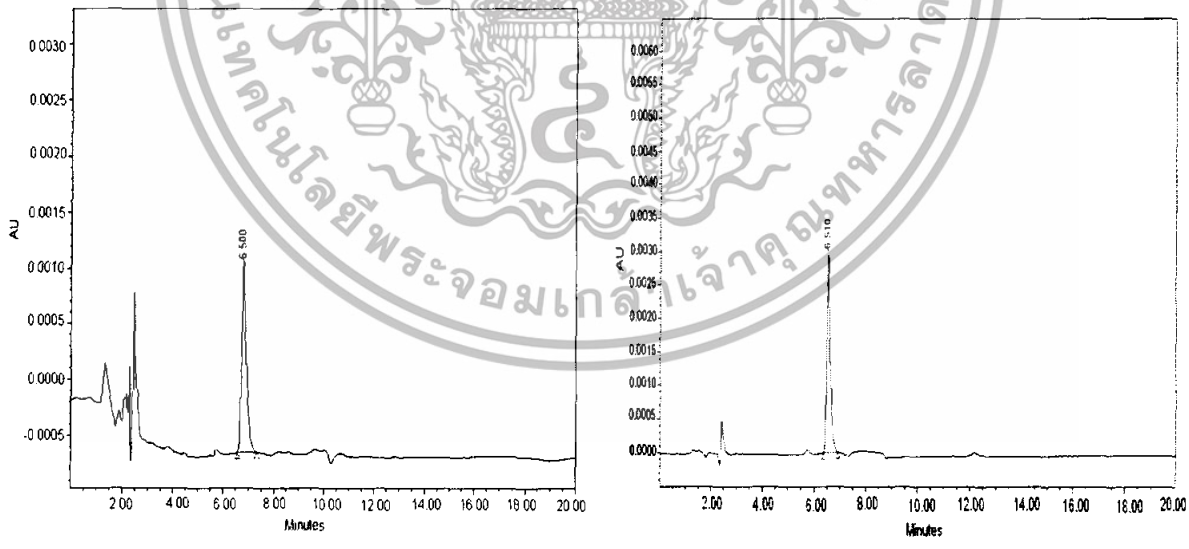
ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่า LOD และ LOQ (ภาคผนวก ช.)

กราฟมาตรฐาน	LOD (ppm)	เกณฑ์การยอมรับ	กราฟมาตรฐาน	LOQ (ppm)	เกณฑ์การยอมรับ
y = 0.100x – 0.080	0.24	1.75	y = 0.055x – 0.167	1.67	3.50

จากค่า LOD และ LOQ ที่แสดงในตารางจะพบว่าการวิเคราะห์นี้มีค่า LOD และ LOQ ที่ยอมรับได้ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่แสดงอยู่ในตาราง 4.8

4.4.4 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

โดยการวิเคราะห์ matrix blank กับ spiked matrix blank ผลที่ได้แสดงดังรูป



(ก) (ข)

รูปที่ 4.5 (ก) แสดงโครมาโทแกรมในการวิเคราะห์ตัวอย่าง matrix blank (ข) แสดงโครมาโทแกรมในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้มีการ spiked สารละลายมาตรฐานอีดีทีเอที่ความเข้มข้น 1 ppm ลงใน sample blank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปสัญญาณของ matrix blank นั้นน้อยมากโดยดูความสูงของพีกอยู่ประมาณ 0.0011 เมื่อเทียบกับสัญญานของ spiked matrix blankความสูงของพีกอยู่ประมาณ 0.0029 แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่างซึ่งวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจง

4.4.5 การทดสอบความทน (Robustness)

โดยการศึกษาในเรื่องของ pH และ flow rate ของเฟสเคลื่อนที่ว่าถ้าเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยจะให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันหรือไม่ซึ่งในการวิเคราะห์จะใช้สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ 10 ppm ในการทดสอบ แสดงดังในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9ก แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ที่ได้จากการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ค่า pH ต่างๆกัน (ภาคผนวก ซ.)

ค่า pH	เวลารีเทนชัน (นาที)	ความเที่ยง (%RSD)	ความแม่น (%recovery)
4.0	6.510	3.9	99.5
3.059 – 3.089	6.502	3.5	97.9

ตารางที่ 4.9ข แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ ที่ได้จากการใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน (ภาคผนวก ซ.)

อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เวลารีเทนชัน (นาที)	ความเที่ยง (%RSD)	ความแม่น (%recovery)
0.8	9.152	6.0	102.5
0.9	7.497	5.6	101.7
1.0	6.502	3.5	97.9
1.1	5.098	4.3	100.5
1.2	4.203	4.3	99.9

จากตารางการพิจารณาความใช้ได้ของความเที่ยงและความแม่นที่ได้จากการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ค่า pH ต่างๆกันและอัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน จะพบว่าการวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงที่ยอมรับได้ซึ่งเป็นไปตาม The AOAC Manual of Policies and Procedures ได้กำหนดค่าความเที่ยงไว้คือ 5.3 และมีความแม่นที่ยอมรับได้ซึ่งเป็นไปตาม The AOAC Manual of Policies and Procedures ได้กำหนดค่าความเที่ยงไว้คือระหว่าง 90% และ 107% สำหรับความเข้มข้น 100 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอและตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ เมื่อใช้ 0.01 M ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 ปริมาตรโดยปริมาตร ที่ค่า pH ต่างๆ ดังนี้ 6.0 5.0 4.0 และ 3.0 ตามลำดับ โดยใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีใช้ปริมาตรฉีดวิเคราะห์เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่ได้ปรับ pH อยู่ในช่วง 3.059 – 3.089 เป็นค่าที่มีความเหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ เนื่องจากมีสภาพกรดเพียงพอที่จะใช้แยกสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ

จากการเปรียบเทียบผลการแยกเมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าการใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอมีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานเพียงพอที่จะทำให้การแยกเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และให้ค่าเวลารีเทนชัน (t_R = 6. 502 นาที) เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนและตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอโดยเทคนิค HPLC คือใช้เฟสเคลื่อนที่0.01 M ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 ปริมาตรโดยปริมาตร ที่ได้ปรับค่า pH อยู่ในช่วง 3.059 – 3.089 และใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอในช่วงความเข้มข้น 1-40 ppm ให้กราฟมาตรฐานที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมีค่าใกล้กับ 1 มากที่สุดในการทำการวิเคราะห์ กราฟมาตรฐานมีสมการเชิงเส้น y = 8698.x + 28967 และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9958

การวิเคราะห์อีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์ คือ Coke, Green spot, Mirinda strawberry, Tipco cool fit (Grape Mix), Unif purple carrot with mixed fruit juice, Splash, Kool Aid, Tropicana twister, Pepsi twist ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำละ 6 ครั้ง (n=6) ตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ความเข้มข้นที่ตรวจวัดในตัวอย่างได้มีค่าเท่ากับ 2.21 1.30 1.52 1.20 1.50 1.03 1.44 2.46 2.16 ppmของ $Na_2CaEDTA$ ตามลำดับ และผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐานจะได้สมการคือ y = 9962.X+19570 และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจคือ 0.9982 ซึ่งเหมาะสมกับเส้นตรงที่สุดออกมา จากค่า R^2 ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 จะบอกถึงอิทธิพลของความเข้มข้น ที่มีต่อพื้นที่ใต้พีก ค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(%RSD) มีค่าอยู่ในช่วง 3.3- 5.1 และสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การกลับคืน(% recovery) มีค่าอยู่ในช่วง 93.8%- 98.9% การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

ลิขสิทธิ์นี้เป็นของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(LOD) และขีดจำกัดของปริมาณสาร (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.24 และ1.67 ppm ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้มีความเที่ยง ความแม่น LOQ และ LOD ที่ยอมรับได้ การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) จากผลการวิเคราะห์สัญญาณของ matrix blank นั้นน้อยมากเมื่อเทียบกับสัญญานของ spiked matrix blank แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่างซึ่งวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจง การทดสอบความทน (Robustness) จากการพิจารณาความใช้ได้ของความเที่ยงและความแม่น จากผลการวิเคราะห์มีความเที่ยงและความแม่นที่ยอมรับได้ซึ่งเป็นไปตาม The AOAC Manual of Policies and Procedures ที่ได้จากการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ค่า pH ต่างๆกันและอัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน จะพบว่าการวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงที่ยอมรับ (ภาคผนวก ซ.)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์ก่อนเพื่อช่วยประหยัดเวลา เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มอื่นๆ

5.2.2 ควรตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ก่อนการวิเคราะห์ให้อยู่ในค่าที่เหมาะสมเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ

5.2.3 ควรทำการศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติ ทางการเก็บรักษาของสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] Akihiro Yamaguchi, Allah Rakha RAJPUT,**Kunio OHZEKI,* and Tomihiro KAMBARA, **Bulletin of Chemical Society of Japan**, 56, 2621-2623,1983.

[2] Yuan C. Lee, **Analytical Biochemistry**, 293, 120–123, 2001.

[3] Pistos, C., and Parissi-Poulou, M., **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 28, 1073–1079, 2002.

[4] Zhiwei Zhu, Lifeng Zhang*, Arun Marimuthu, and Zhaoguang Yang, **Centre for Advanced Water Technology, Singapore Utilities International**, Volume 23, Issue 17 , Pages 2880 – 2887, 2002.

[5] http://e-collection.ethbib.ethz.ch/ecol-pool/diss/fulltext/eth15113.pdfS.

[6] Carolina E. Cagnasso, Laura B. LÓpez*, Viviana G. Rodríguez, and Mirta E. Valencia, **Journal of Food Composition and Analysis**, 20, 248–251, 2007.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

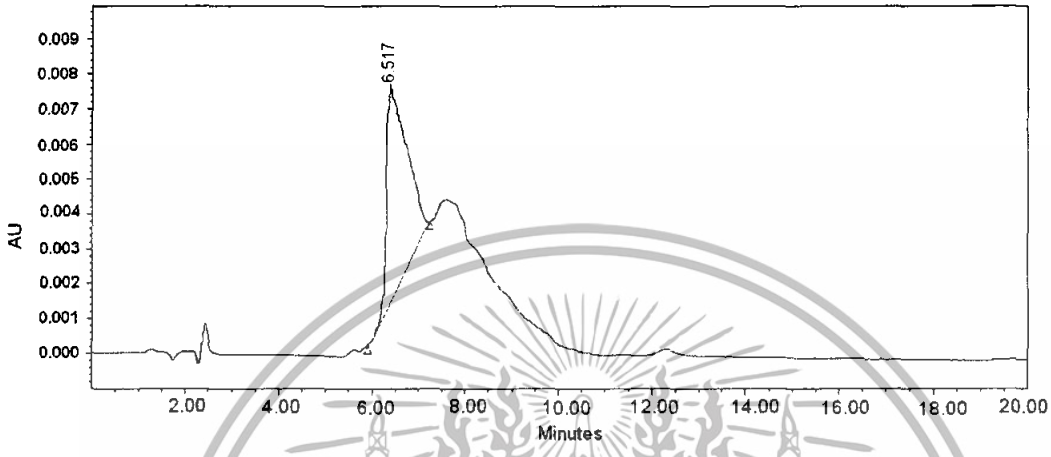
ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

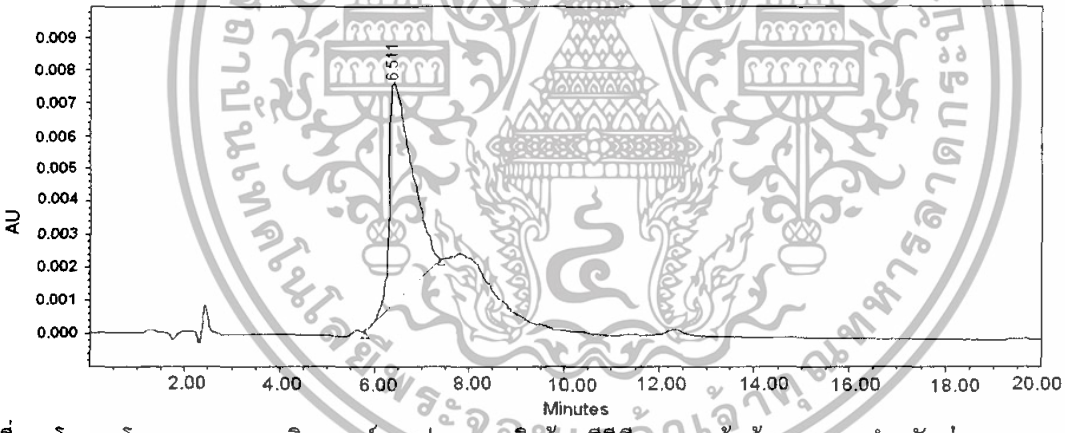
โครมาโทแกรมการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อีดีทีเอ

ศึกษาหาค่า pH ที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

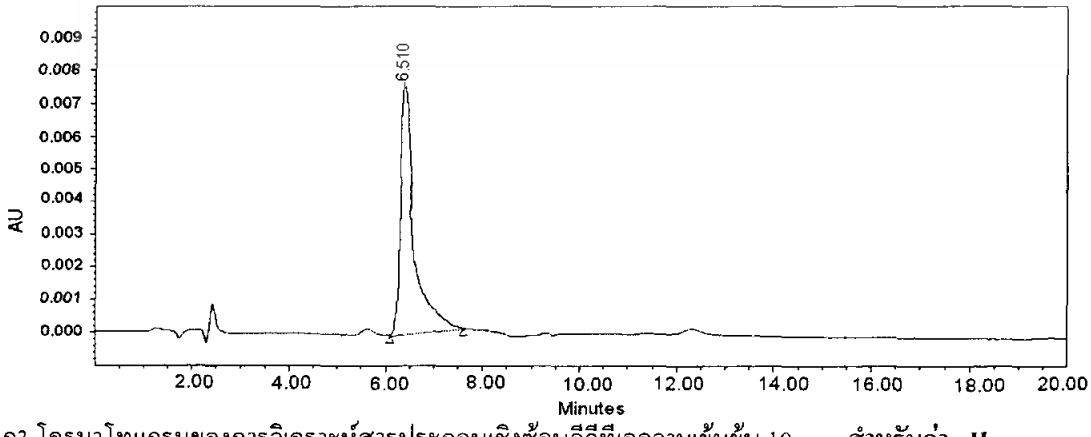
สภาวะที่ใช้คือ เฟสเคลื่อนที่ 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ค่า pH ที่ใช้ศึกษาอยู่ในช่วง 6.0-3.0 ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร



รูปที่ ก1 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับค่า **pH ที่ใช้ศึกษาคือ 6.0**

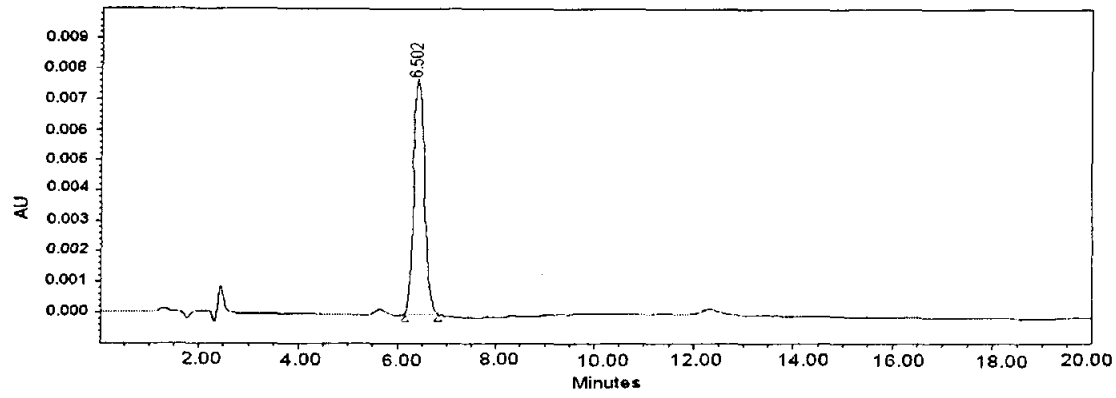


รูปที่ ก2 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับค่า **pH ที่ใช้ศึกษาคือ 5.0**



รูปที่ ก3 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับค่า **pH ที่ใช้ศึกษาคือ 4.0**

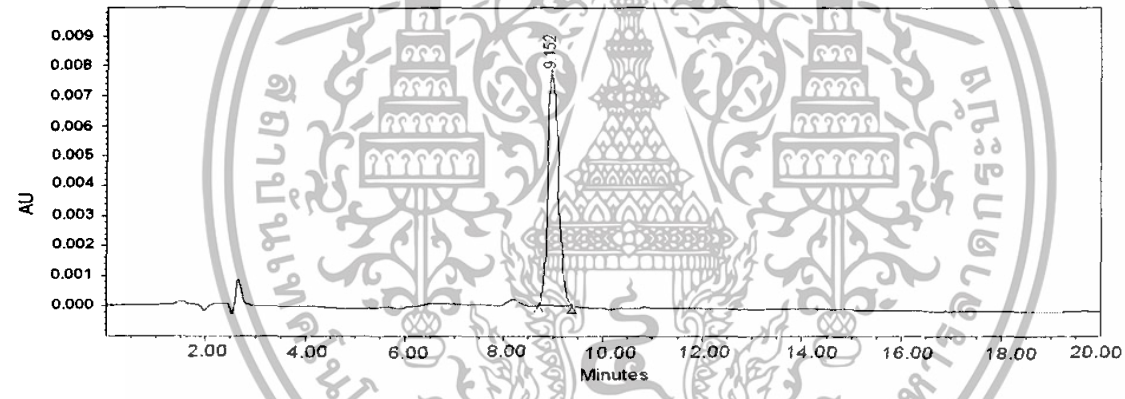
เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



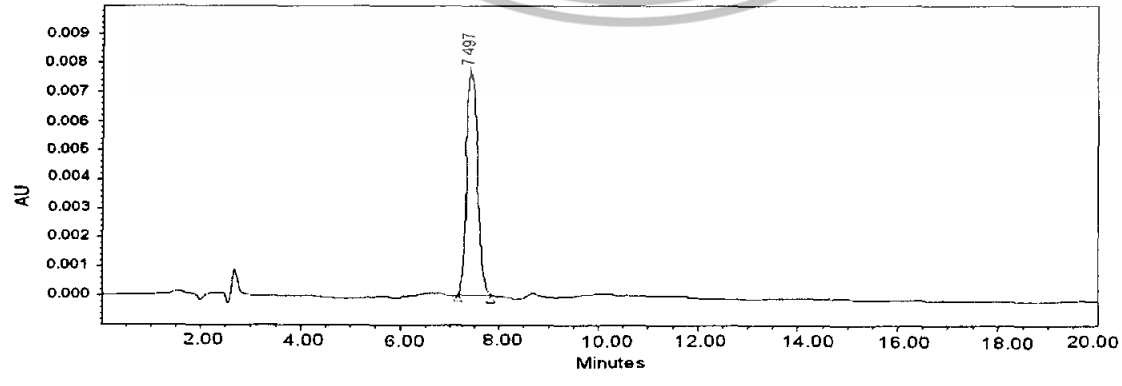
รูปที่ ก4 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับค่า **pH ที่ใช้ศึกษาคือ 3.059 – 3.089**

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

สภาวะที่ใช้คือ เฟสเคลื่อนที่ 0.01 โมลาร์ ammonium phosphate monobasic: acetonitrile : tetrabutylammonium hydroxide 40% ในอัตราส่วน 90:10:0.2 ปริมาตรโดยปริมาตร ค่า pH 3.074 สำหรับอัตราการไหลที่ใช้ศึกษาคือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร

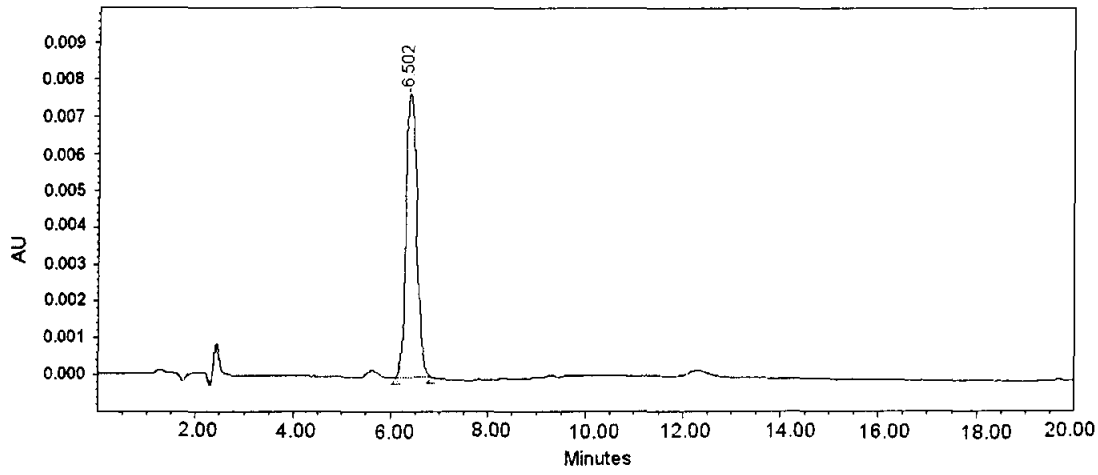


รูปที่ ก5 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

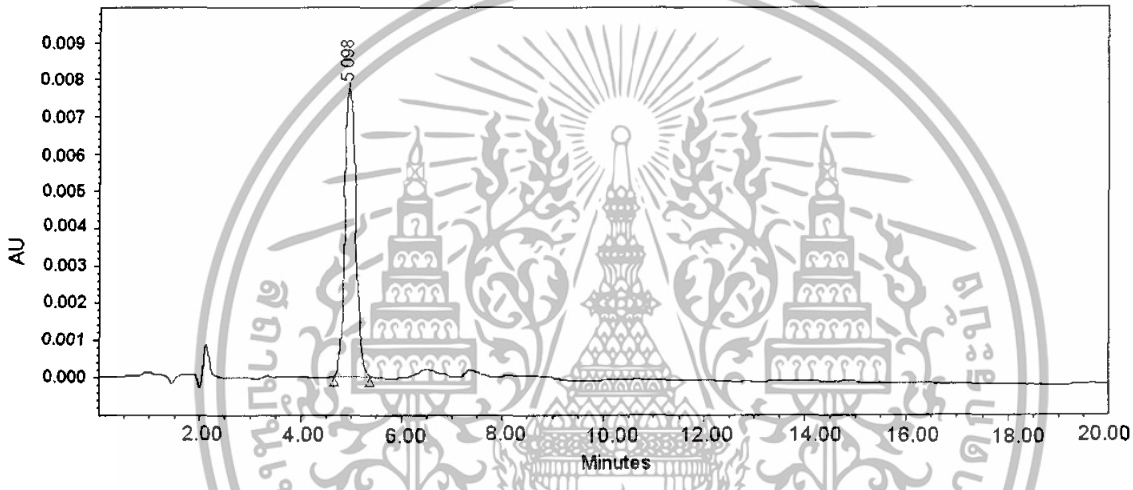


รูปที่ ก6 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm **สำหรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที**

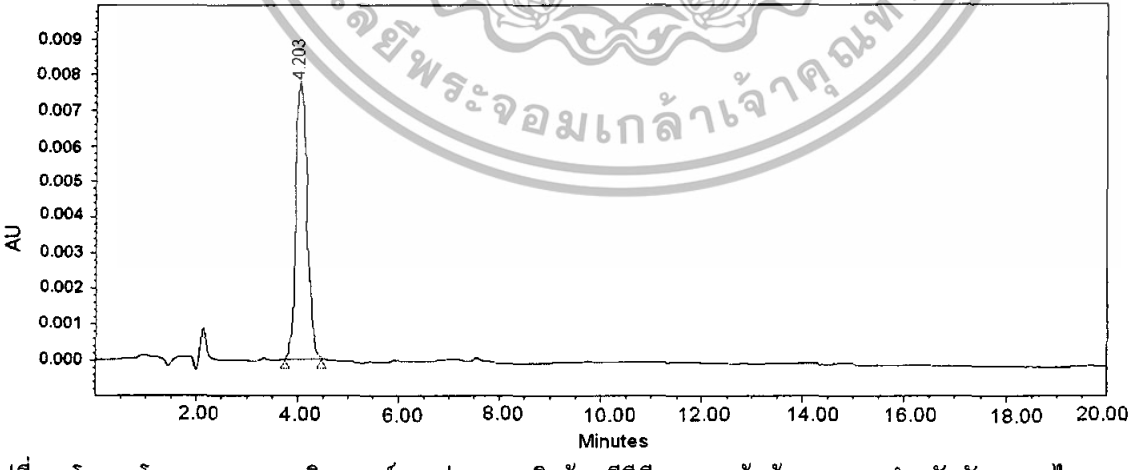
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก7 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับอัตรา
การไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที



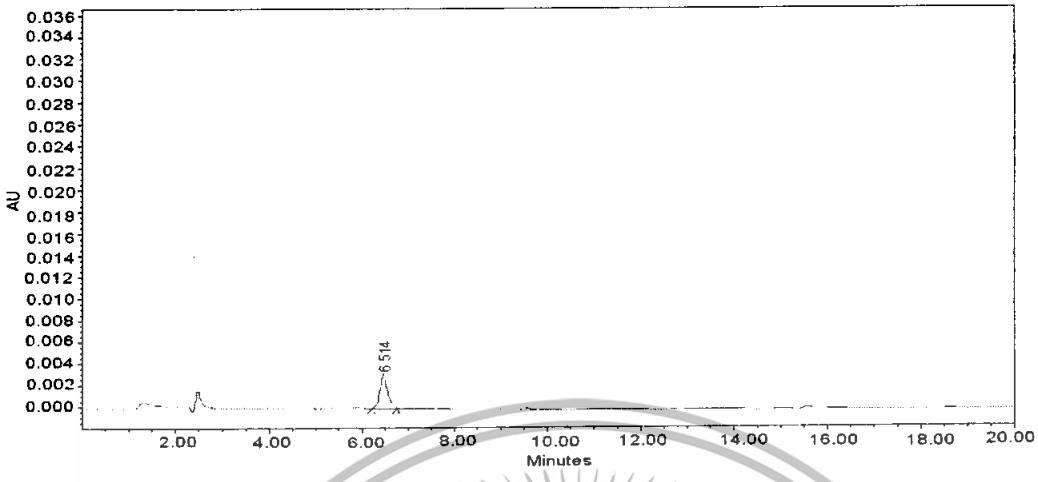
รูปที่ ก8 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับอัตราการไหลของเฟส
เคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที



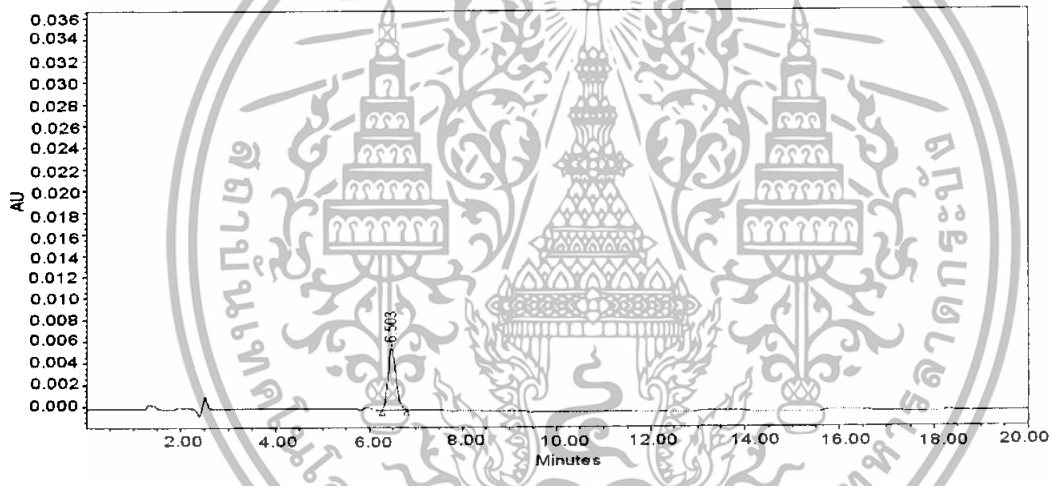
รูปที่ ก9 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm สำหรับอัตราการไหลของเฟส
เคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษาคือ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

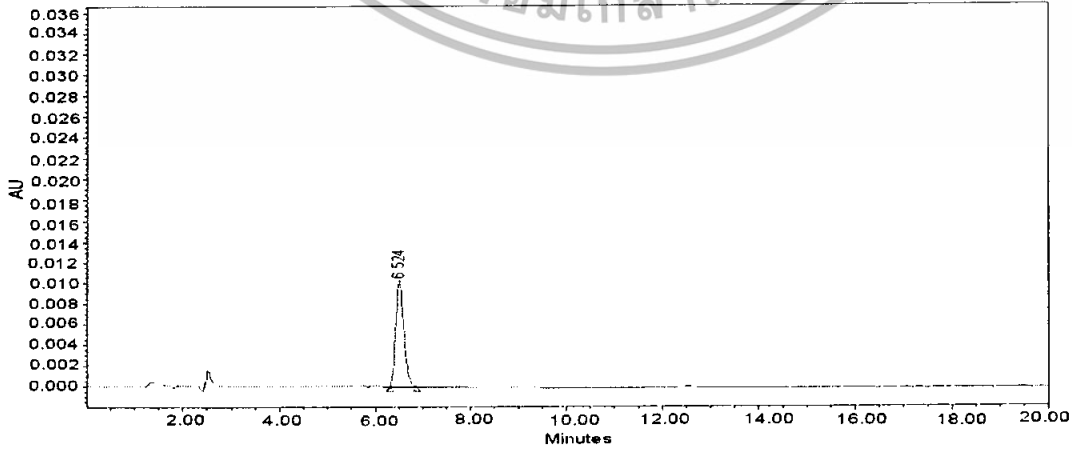
โครมาโทแกรมการสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ



รูปที่ ก10 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 1 ppm

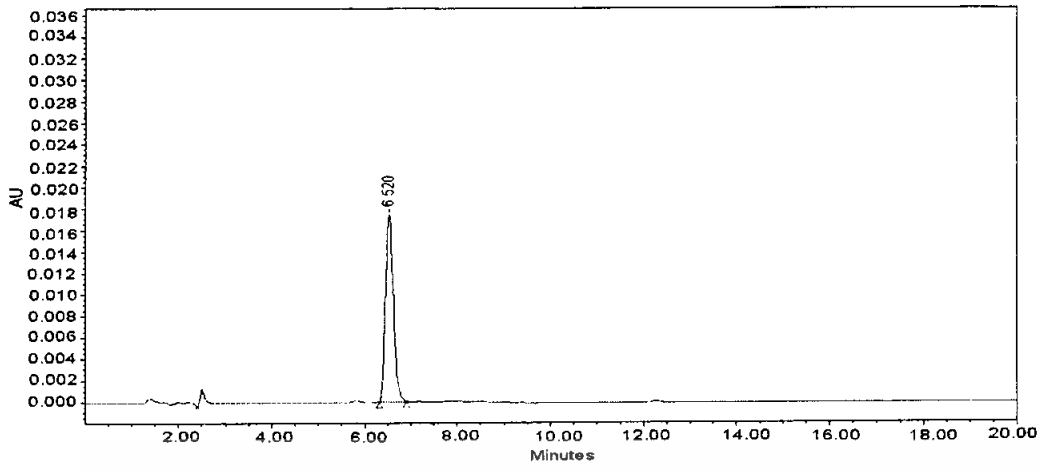


รูปที่ ก11 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 5 ppm

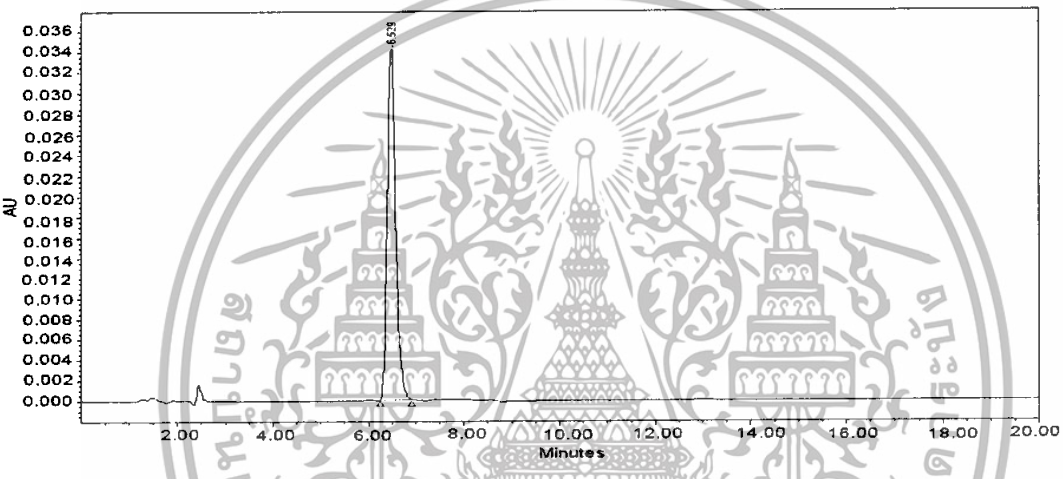


รูปที่ ก12 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



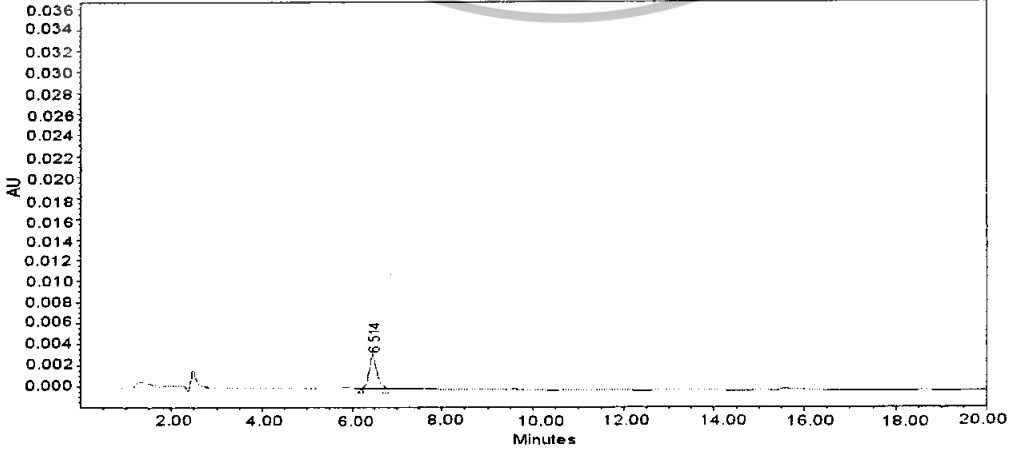
รูปที่ ก13 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 20 ppm



รูปที่ ก14 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 40 ppm

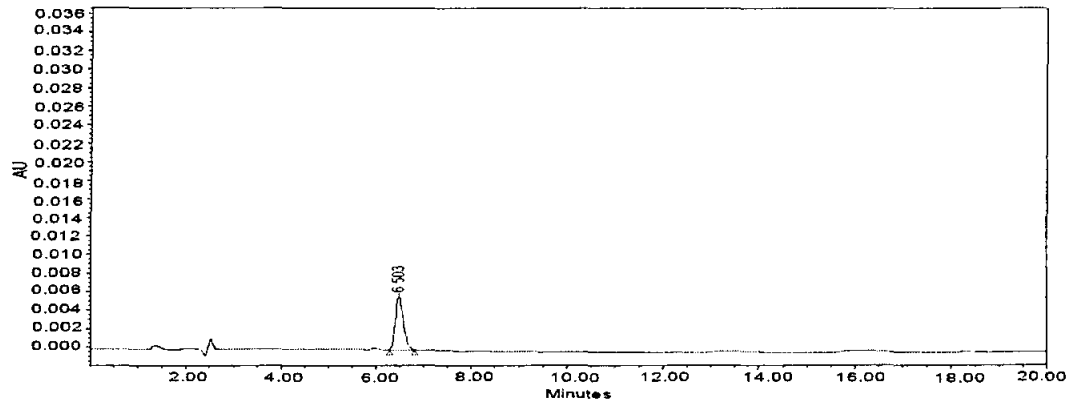
โครมาโทแกรมผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน

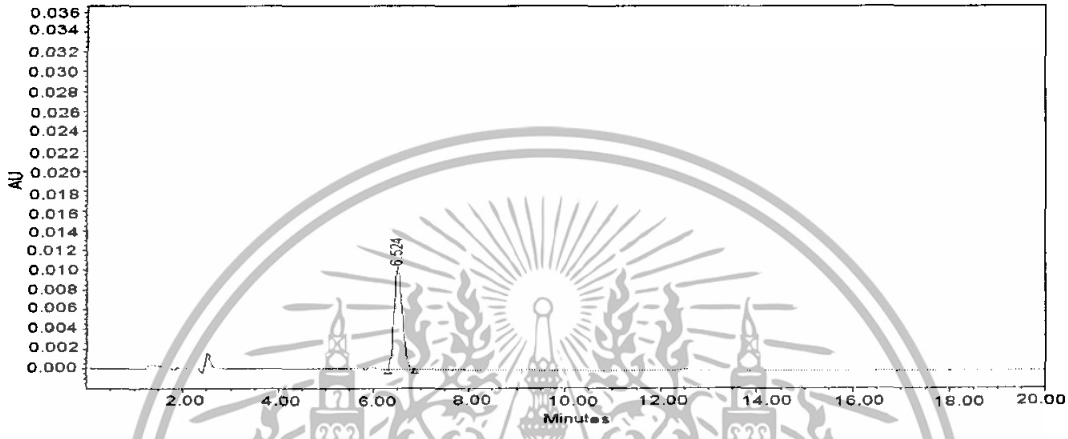


รูปที่ ก15 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 1 ppm

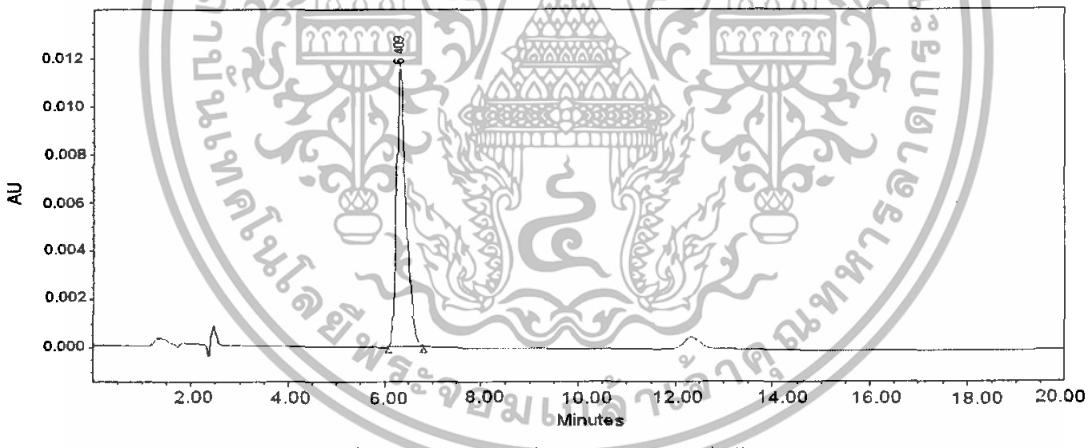
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



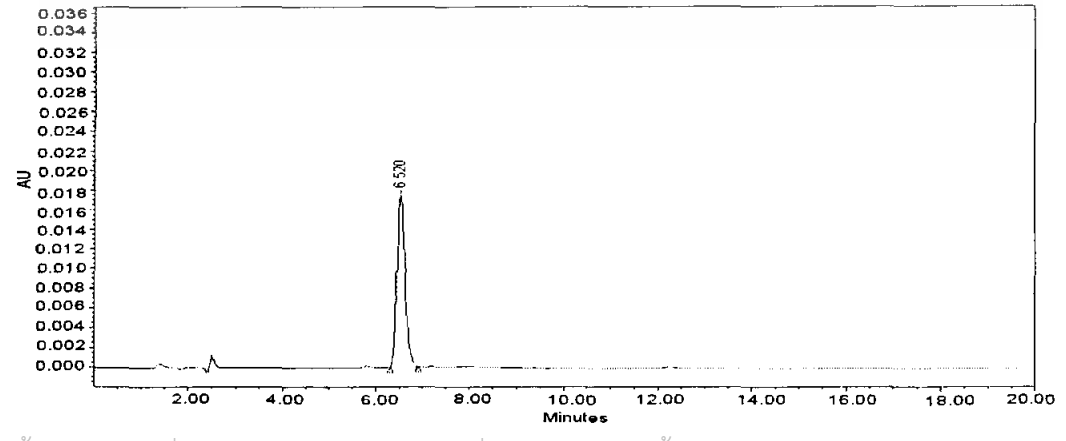
รูปที่ ก16 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 5 ppm



รูปที่ ก17 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 10 ppm



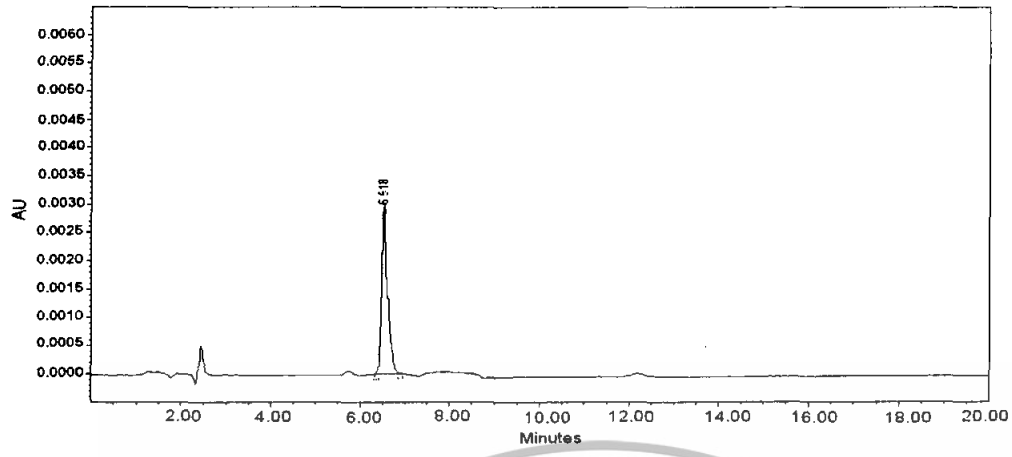
รูปที่ ก18 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 15 ppm



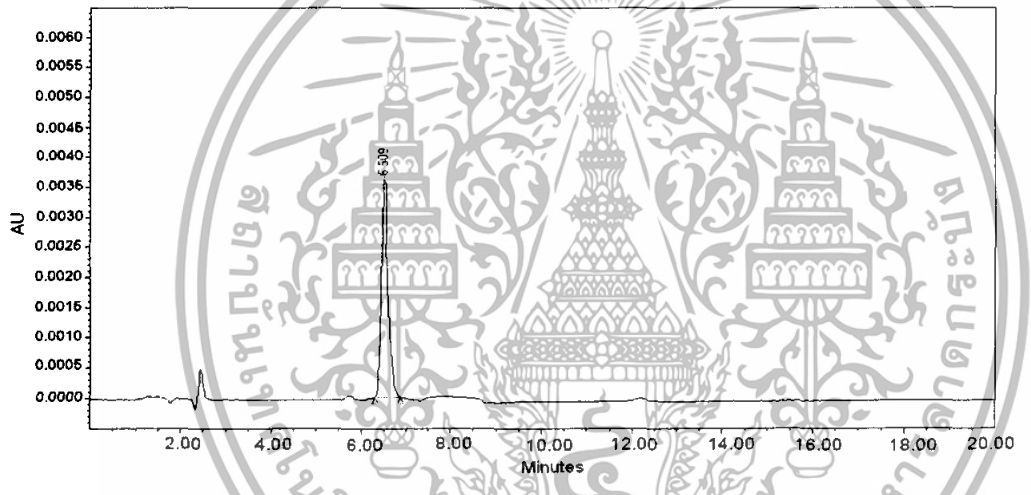
รูปที่ ก19 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอความเข้มข้น 20 ppm

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

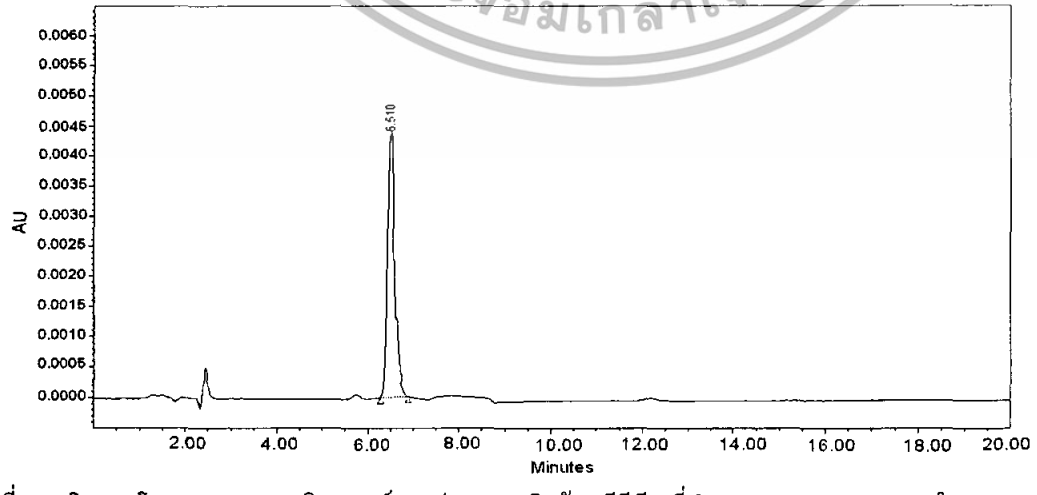
การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของปริมาณสาร (LOQ)



รูปที่ ก20 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ทำการ spiked EDTA ลงใน Sample blank ความเข้มข้น 1 ppm

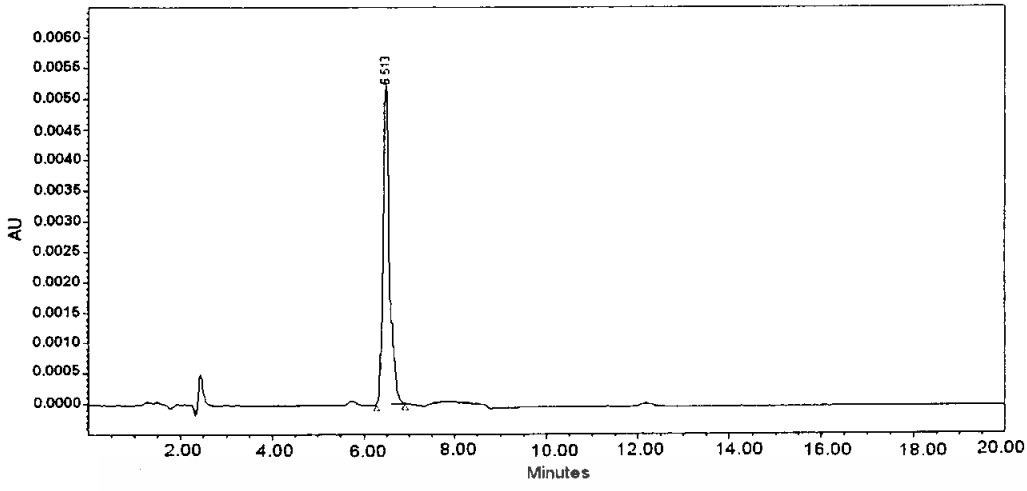


รูปที่ ก21 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ทำการ spiked EDTA ลงใน Sample blank ความเข้มข้น 2 ppm

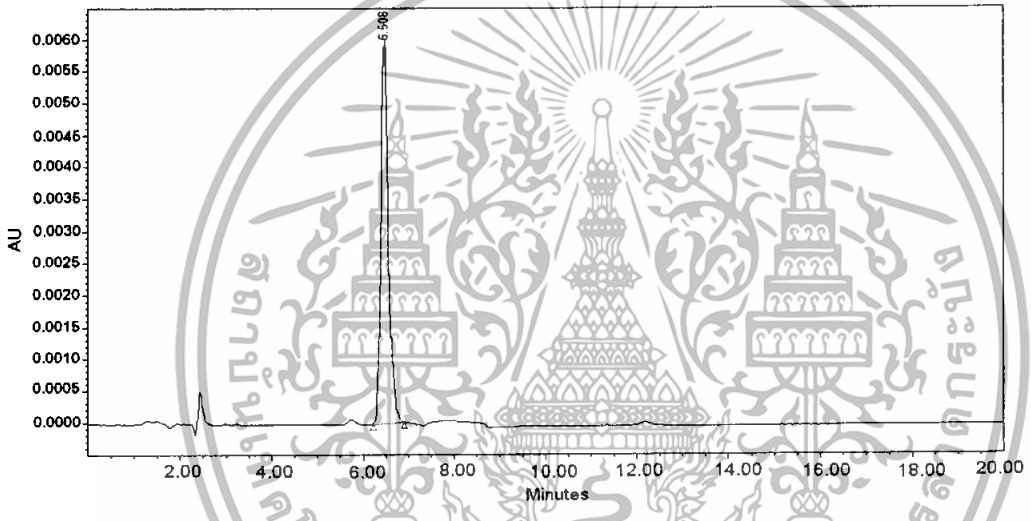


รูปที่ ก22 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ทำการ spiked EDTA ลงใน Sample blank ความเข้มข้น 3 ppm

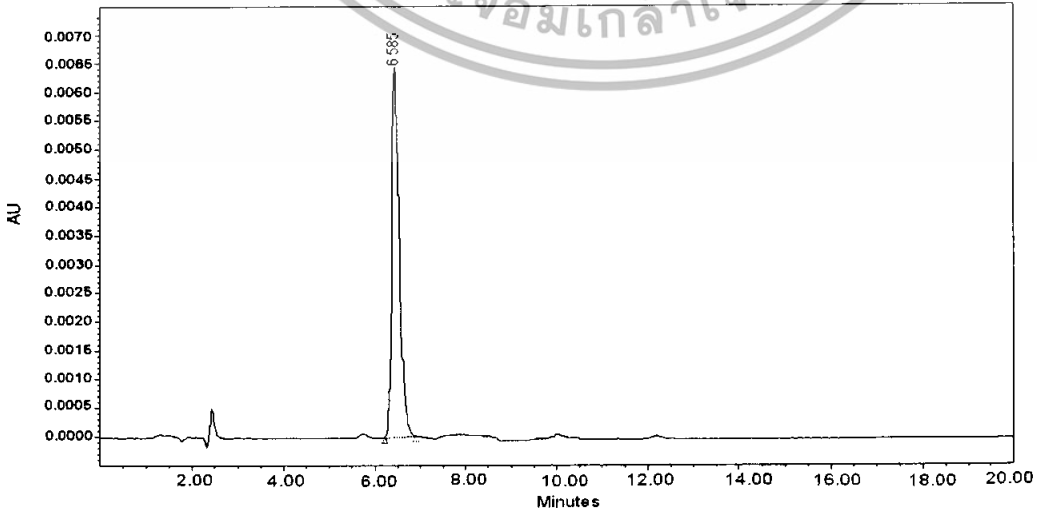
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก23 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ทำการ spiked EDTA ลงใน Sample blank ความเข้มข้น 4 ppm



รูปที่ ก24 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ทำการ spiked EDTA ลงใน Sample blank ความเข้มข้น 5 ppm



รูปที่ ก25 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ทำการ spiked EDTA ลงใน Sample blank ความเข้มข้น 6 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

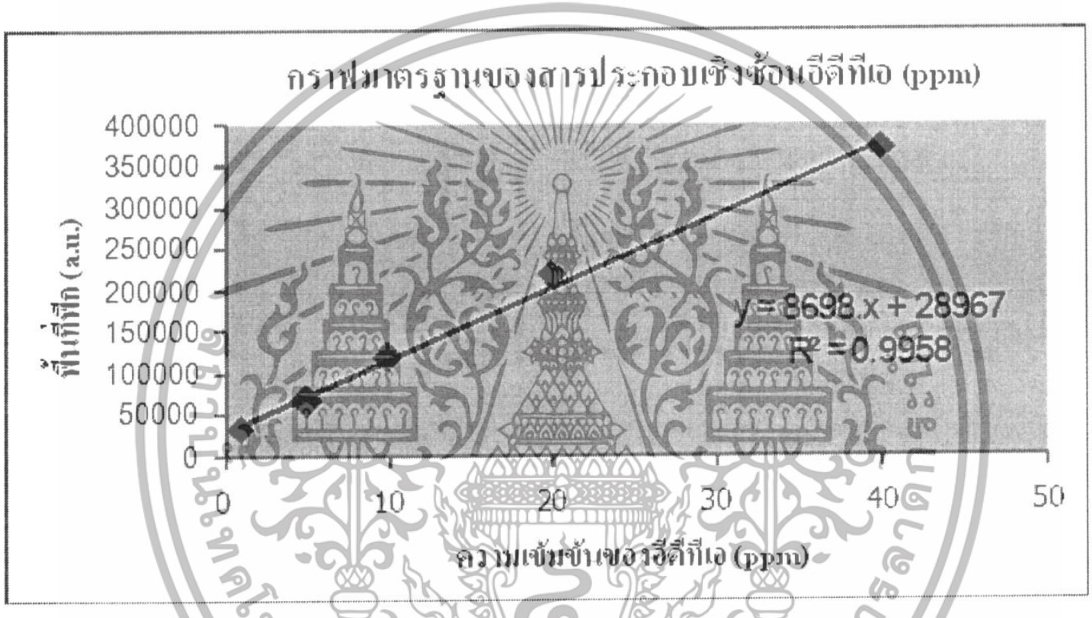
ภาคผนวก ข.

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ

ความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm)	พื้นที่พีก (a.u.)						
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ค่าเฉลี่ย
1	34261	32776	32805	30612	32626	32806	32647.67
5	67147	66367	67444	66502	68467	68491	67403.00
10	110281	113812	118364	121891	122232	127558	119023.00
20	230342	230165	227763	221797	216937	174796	216966.67
40	376244	364658	367783	361618	370877	378141	369886.83



แสดงกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอโดยทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm) และพื้นที่พีก (a.u.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

ผลการวิเคราะห์อีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 ผลการวิเคราะห์อีดีทีเอในตัวอย่างเครื่องดื่มไร้แอลกอฮอล์

ตัวอย่างเครื่องดื่ม	พื้นที่พีก (a.u.)							ความเข้มข้นอีดีทีเอที่คำนวณได้จากสมการ y = 8698.x + 28967 (ppm)	$\bar{X} \pm SD$ (ppm)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ค่าเฉลี่ย		
Coke	48110	48364	48001	47994	47901	48498	48144.7	2.21	2.21 ± 0.03
Pepsi twist	41986	42586	36584	37565	40258	42593	40262.0	1.30	1.30 ± 0.30
Mirinda strawberry	43592	44685	40369	36584	43256	44695	42196.8	1.52	1.52 ± 0.36
Tipco cool fit (Grape Mix)	40598	39857	34758	37547	42985	40647	39398.7	1.20	1.20 ± 0.33
Unif purple carrot with mixed fruit juice	43585	43985	40368	36598	43214	44158	41984.7	1.50	1.50 ± 0.34
Splash	39241	39776	32805	35612	37626	42630	37948.3	1.03	1.03 ± 0.39
Kool Aid	42658	43585	41542	34259	42258	44689	41498.5	1.44	1.44 ± 0.43
Tropicana twister	50696	50917	48110	48364	49990	53854	50321.8	2.46	2.46 ± 0.24
Green spot	48241	48254	46004	47998	47365	48625	47747.8	2.16	2.16 ± 0.11

ภาคผนวก ง.

ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.1 ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอ

ความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm)	พื้นที่พีก (a.u.)							
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ค่าเฉลี่ย
1	34261	32776	32805	30612	32626	32630	33438	32735.43
5	67147	66367	67444	66502	68467	67895	68005	67403.86
10	110281	113812	118364	121891	122232	121081	116758	117774.14
15	173455	162345	174096	167654	161624	160407	159843	165632.00
20	230342	230165	227763	221797	216937	216796	213065	222409.29

แสดงกราฟมาตรฐานอีดีทีเอโดยทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ppm) และพื้นที่พีก (a.u.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การหาค่าความเที่ยง (Precision)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การหาค่าความเที่ยง (Precision)</u>

โดยนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์มาหาค่าเฉลี่ยกับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานตามสูตรต่อข้างล่างนี้จะทำให้ได้ค่า เปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ %RSD หรือเรียกว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation,CV) เป็นการแสดงถึงความเที่ยงของการทดลอง

$$\%RSD,\ CV = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

เมื่อ S = standard deviation

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

และ $\bar{X}$= ค่าเฉลี่ยของการวัดจำนวน N ครั้ง (Mean of N measurements)

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_i}{N}$$

N จำนวนครั้งที่ทดลองทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.4 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่าความเที่ยง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นอีดีทีเอที่ spike (ppm)	พื้นที่พีก (a.u.)												
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	ครั้งที่ 9	ครั้งที่ 10	ค่าเฉลี่ย	SD	% RSD
splash	1	37491	37839	34795	37665	39318	38883	37578	37404	41144	38535	38065.2	1627.81	4.3
	10	110417	110034	101508	110728	111163	113164	115947	110554	110991	110728	110523.4	3630.56	3.3
	20	190100	202753	191791	208494	216757	209537	199187	182922	201280	206488	200930.9	10242.95	5.1

ตารางที่ จ.5 เกณฑ์การยอมรับความเที่ยง (จาก The AOAC Manual of Policies and Procedures)

Analyte %	Analyte ratio	Unit	RSD (%)
100	1	100%	1.3
10	10^{-1}	10%	2.8
1	10^{-2}	1%	2.7
0.1	10^{-3}	0.1 %	3.7
0.01	10^{-4}	100 ppm	5.3
0.001	10^{-5}	10 ppm	7.3
0.0001	10^{-6}	1 ppm	11
0.00001	10^{-7}	100 ppb	15
0.000001	10^{-8}	10 ppb	21
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	30

ภาคผนวก ฉ..

ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การหาค่าความแม่น (Accuracy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การหาค่าความแม่น (Accuracy)</u>

โดยนำความเข้มข้นที่ได้จากการวิเคราะห์ก่อนและหลังจาก spike มาคิด %Recovery เทียบกับปริมาณสารละลาย standard ที่เติมลงไปตามสูตรต่อไปนี้

การคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนของปริมาณสารที่เติมลงไป (%Recovery)

$$\%\text{Recovery} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของ spike sample} - \text{ความเข้มข้นของ sample}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นของ standard ที่เติมลงไป}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ.6 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่าความแม่น

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นอีดีทีเอที่ spike (ppm)	ความเข้มข้นอีดีทีเอ (ppm)											ความเข้มข้นอีดีทีเอในตัวอย่าง (ppm)	%recovery
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	ครั้งที่ 9	ครั้งที่ 10	ค่าเฉลี่ย		
splash	1	0.98	1.02	0.67	1.00	1.19	1.14	0.99	0.97	1.40	1.10	1.046	0.0	104.6
	10	9.36	9.32	8.34	9.40	9.45	9.68	10.00	9.38	9.43	9.40	9.376	0.0	93.8
	20	18.53	19.98	18.72	20.64	21.59	20.76	19.57	17.70	19.81	20.41	19.771	0.0	98.9

ตารางที่ ฉ.7 เกณฑ์การยอมรับความแม่น (จาก The AOAC Manual of Policies and Procedures)

Active Ingred. [%]	**Analyte ratio**	**Unit**	**Mean recovery [%]**
100	1	100%	98-102
>=10	10^{-1}	10%	98-102
>=1	10^{-2}	1%	97-103
>=0.1	10^{-3}	0.1 %	95-105
0.01	10^{-4}	100 ppm	90-107
0.001	10^{-5}	10 ppm	80-110
0.0001	10^{-6}	1 ppm	80-110
0.00001	10^{-7}	100 ppb	80-110
0.000001	10^{-8}	10 ppb	60-115
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	40-120

ภาคผนวก ช.

ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของปริมาณสาร (LOQ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของปริมาณสาร (LOQ)

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์พล็อตกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยให้ค่าเฉลี่ยอยู่บนแกน X และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่บนแกน Y หาสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (r) ระหว่างค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานถ้ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงลากเส้นกราฟตัดแกน Y จุดตัดคือ S_b (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์) แล้วคิดตามสูตรดังต่อไปนี้

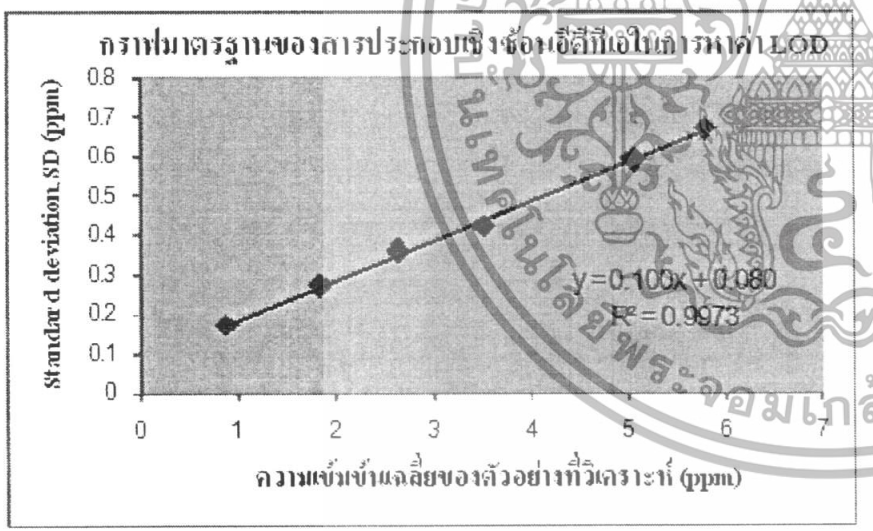
$$LOQ = 10S_b$$

และ $$LOD = 3S_b$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ช.1 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่า LOD

	ความเข้มข้นอีดีทีเอที่ spike (ppm)	ความเข้มข้นอีดีทีเอ (ppm)					เกณฑ์การยอมรับ (ppm)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	Standard deviation, SD	
LOD	1	0.7	1.01	0.98	0.90	0.17	< 1/20 ของ target value
	2	1.55	2.09	1.90	1.85	0.27	
	3	2.34	3.05	2.57	2.65	0.36	
	4	3.37	3.99	3.19	3.56	0.42	
	5	5.27	5.49	4.38	5.05	0.59	
	6	6.18	5.02	6.17	5.79	0.67	



เมื่อนำค่า standard deviation, S และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยที่จากการคำนวณดังตารางที่ ข.8มาพล็อตกราฟดังรูป ข.1 จะได้สมการเชิงเส้น $y = 0.100x - 0.080$ สามารถคำนวณค่า LOD ตามสูตรดังต่อไปนี้ $LOD = 3S_b$ (โดยที่ $S_b = 0.080$)

$\therefore$ LOD = 0.24 ppm

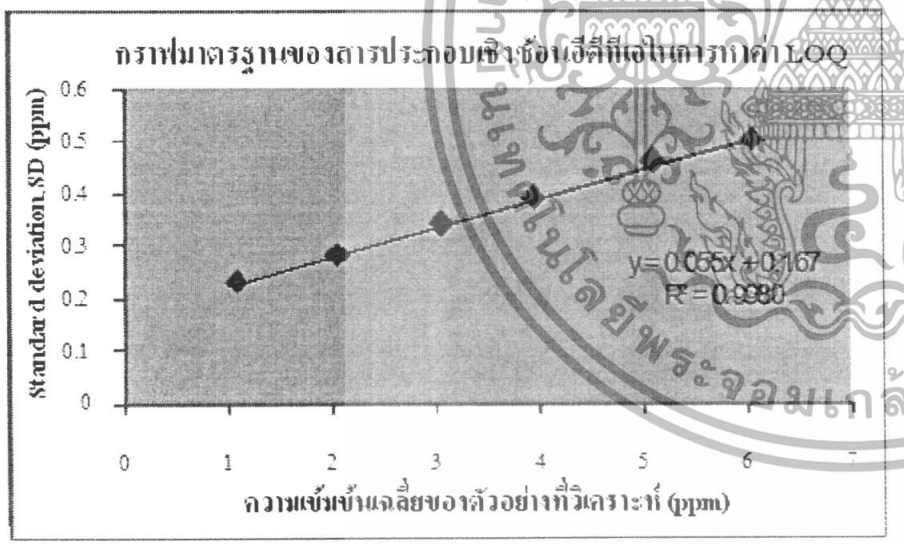
เกณฑ์การยอมรับค่า LOD จากตาราง target value คือ 35 ppm

$\therefore$ 1/20 ของ35 ppm เท่ากับ 1.75

รูปที่ ช.1 แสดงกราฟมาตรฐานอีดีทีเอโดยทำการพล็อตกราฟระหว่าง standard deviation, SD (ppm) และความเข้มข้นเฉลี่ย (ppm)

ตารางที่ ช.2 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นอีดีทีเอโดยวิธีการ spike อีดีทีเอลงในตัวอย่างในการหาค่า LOQ

	ความเข้มข้นอีดีทีเอที่ spike (ppm)	ความเข้มข้นอีดีทีเอ (ppm)												เกณฑ์การยอมรับ (ppm
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	ครั้งที่ 9	ครั้งที่ 10	ค่าเฉลี่ย	Standard deviation, SD	
LOQ	1	1.42	1.09	0.67	1.03	1.45	1.27	1.11	0.99	1.00	1.01	1.10	0.23	< 1/10 ของ target value
	2	2.55	2.40	1.98	1.77	2.01	1.89	1.80	2.38	2.10	1.80	2.07	0.28	
	3	3.59	3.37	3.16	2.96	3.44	2.57	2.59	3.05	3.10	2.89	3.07	0.34	
	4	3.09	4.00	3.68	3.89	4.62	4.00	4.01	4.10	3.88	4.26	3.95	0.39	
	5	4.80	4.65	4.67	5.74	5.65	5.81	4.70	5.00	4.99	5.03	5.13	0.46	
	6	6.00	5.50	5.76	6.43	5.50	6.00	6.63	6.86	6.39	5.46	6.05	0.5	



เมื่อนำค่า standard deviation, S และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยที่จากการคำนวณดังตารางที่ ข.9 มาพล็อตกราฟดังรูป ข.2 จะได้สมการเชิงเส้น $y = 0.055x - 0.167$ สามารถคำนวณค่า LOD ตามสูตรดังต่อไปนี้ $LOQ = 10S_b$ (โดยที่ $S_b = 0.167$)

$\therefore$ LOQ = 1.67 ppm

เกณฑ์การยอมรับค่า LOQ จากตาราง target value คือ 35 ppm

$\therefore$ 1/10 ของ35 ppm เท่ากับ 3.5

รูปที่ ช.2 แสดงกราฟมาตรฐานอีดีทีเอโดยทำการพล็อตกราฟระหว่าง standard deviation, SD (ppm) และความเข้มข้นเฉลี่ย (ppm)

ภาคผนวก ซ.

ผลการหาค่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การทดสอบความทน (Robustness)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความทน (Robustness)

โดยการศึกษาในเรื่องของ pH และ flow rate ของเฟสเคลื่อนที่พิจารณาความใช้ได้ของความเที่ยงและความแม่น

ตารางที่ ช.1 แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ความเข้มข้น10 ppm ที่ได้จากการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ค่า pH ต่างๆกัน

ค่า pH	พื้นที่พีก (a.u.)			ความเที่ยง	ความแม่น
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	% RSD	%recovery
4.0	120011	115455	111070	3.9	99.5
3.059 – 3.089	110281	113812	118364	3.5	97.9

ตารางที่ ช.2 แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นของสารประกอบเชิงซ้อนอีดีทีเอที่ความเข้มข้น10 ppm ที่ได้จากการใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน

อัตราการไหล	พื้นที่พีก (a.u.)			ความเที่ยง	ความแม่น
(มิลลิลิตรต่อนาที)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	% RSD	%recovery
0.8	123977	120115	110243	6.0	102.5
0.9	122435	119895	110071	5.6	101.7
1.0	110281	113812	118364	3.5	97.9
1.1	120993	117234	110999	4.3	100.5
1.2	120983	115632	110995	4.3	99.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฌ.

เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง

1. หลักการ

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

ที่เป็นของเหลวจะถูกปั๊มผ่านคอลัมน์แยกสารที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาพของแข็งซึ่งทำหน้าที่เป็น เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) เมื่อตัวอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของเหลว ถูกนำเข้าสู่ระบบปกติโดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (Injector) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล หน้าที่ของเฟสเคลื่อนที่ คือล้างตัวอย่างในขณะที่ไหลผ่านคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วยอันตรกิริยา ขององค์ประกอบกับเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มฉีดจนกระทั่งออกจากปลายคอลัมน์ซึ่งเป็นช่วงเวลาส่วนใหญ่ของการเคลื่อนที่ เป็นช่วงเวลาที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว (Characteristic time) ของแต่ละสาร แต่อย่างไรก็ดีต้องระมัดระวังว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมของการแยกนั้นสารบางชนิดมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน อาจใช้เวลาในการแยกใกล้เคียงกันจนเกิดการทับซ้อนกันได้ กฎโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการแยกคือ องค์ประกอบใดที่สามารถเกิดอันตรกิริยาหรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสอยู่กับที่ได้ดีกว่า ก็จะใช้อยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่าและในทางตรงกันข้าม สารใดที่มีอันตรกิริยาหรือสามารถกระจ่ายตัวอยู่ในชั้นของเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่า ก็จะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า หรือใช้เวลาในคอลัมน์น้อยนั่นเอง

เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)

ลักษณะของเฟสอยู่กับที่จะทำการบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ใน LC หรือ HPLC วัสดุเหล่านี้สามารถจัดประเภทได้เป็น rigid gels, semi-rigid gels และ soft gels เฟสอยู่กับที่ที่นิยมคือ C_{18} alkyl group ซึ่งจะเกิดพันธะที่พื้นผิว silica (silica surface) ส่วนใหญ่นิยมใช้ silica gel เป็นเฟสอยู่กับที่ ใน open-column chromatography ตั้งเดิม และ TLC ส่วนใหญ่มักจะใช้ reverse-phase chemically-bonded packing ในการวิเคราะห์ใน HPLC ส่วนใหญ่ใช้ใน biological sciences การวิเคราะห์โดยมากเป็น water-soluble หรือ solute-stationary phase mobile phase interactions สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ทั้งคู่

Silica gel มีพื้นที่ของการใช้ที่มันที่เข้ากันได้อย่างยอดเยี่ยม อย่างไรก็ดีส่วนมากมันได้รับการสนับสนุน adsorbent เพื่อใช้ในการเตรียมหรือการแยก ง่ายต่อการนำกลับมาใช้ โดยการกลั่นเป็นข้อได้เปรียบของ silica gel และ other normal-phase เป็น packing ที่นิยมมากกว่า เพื่อการแยกของสารประกอบเป็นกลุ่ม และเพื่อการแยกของ isomers reversed-phase packing บนที่มีส่วนเกี่ยวข้องอื่น ๆ น่าจะเป็นที่นิยมเพื่อการแยกของ homologues และเพื่อสารประกอบซึ่งคงสภาพเดิมอย่างแข็งแกร่ง หรือเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า silica gel

การเลือก Stationary phase ควรจะเน้นที่ข้อแตกต่างของการแยกที่อยู่ในสารประกอบ ความแตกต่างในคุณสมบัติ และเลขขั้นของหมู่ function,normal phase packing มีความแตกต่างกับ GC คือ GC ทำที่อุณหภูมิสูง เฟสอยู่กับที่อาจเพิ่ม back ground อย่างต่อเนื่องที่ delector ซึ่งไม่พบใน HPLC นอกจาก PH ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟสเคลื่อนที่ทำให้เฟสอยู่กับที่มีประสิทธิภาพเสื่อมลง กรณีทำให้เพิ่ม back ground และลด chromatographic performance

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase)

HPLC ต้องการเฟสเคลื่อนที่ซึ่ง analyte สามารถละลายได้ การแยกของ HPLC ส่วนใหญ่ใช้ชนิด Reversed phase chromatography คือ เฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วมากกว่าเฟสอยู่กับที่ในระบบนี้ analyte ที่มีขั้วมากกว่าจะ elute รวดเร็วกว่า analyte ที่มีขั้วน้อยกว่า

การเฟสเคลื่องที่ประกอบด้วยตัวทำละลายเดี่ยวและตัวทำละลายผสมซึ่งมีประสิทธิภาพในการแยกอาจไม่เพียงพอ แต่เฟสเคลื่อนที่สามารถใช้ในของเขตที่กว้าง แม้จะมีปัญหาอยู่เมื่อของผสมประกอบด้วย analyte ที่มีขั้วสูง ซึ่งจะใช้เวลานาน ส่วนใน non-polar analyte ให้ผลในทางตรงกันข้าม ในกรณีนี้การแยกจะประสบความสำเร็จโดยใช้เพียงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่ที่ทำให้เกิดการแยกโดยองค์ประกอบคงที่ เรียกว่า isocratic elution เมื่อองค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่ถูกเปลี่ยนเรียกว่า gradient

บัฟเฟอร์ก็สามารถใช้ได้แต่ส่วนใหญ่ใช้เป็นสารจำพวก inorganic และ involatile material เช่น potassium phosphate หรือ sodium phosphate

สารละลายบัฟเฟอร์

สำหรับ mobile phase ที่เป็น buffer solution ในการเตรียมต้องระวังหลาย ๆ เรื่อง เช่น

- การเลือกชนิดของเกลือให้เหมาะสมกับช่วงของ pH ที่จะใช้และต้องเลือกชนิดของเกลือที่จะไม่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการวิเคราะห์จนมีปัญหากับ Baseline, Noise หรือ linear range
- ในการเตรียมต้องระวังเรื่อง ionic strange และ buffer capacite ด้วย
- สารละลายเมื่อเตรียมเสร็จแล้วต้องทำการการกรอง(0.45 ไมครอน) ก่อนนำมาใช้ในการใช้ยังต้องหลีกเลี่ยงที่จะไม่ทิ้งบัฟเฟอร์ ไว้ในระบบของ HPLC เพื่อป้องกันการเกิด crystallization และอาจเป็นสาเหตุของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งจะมีผลกระทบโดยตรงกับปั๊ม คอลัมน์ และ flow-line

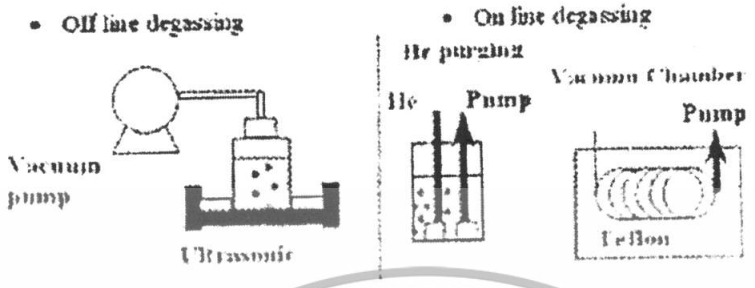
เมื่อทำการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

สำหรับการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่จะต้องคำนึงความสามารถในการละลายและจะต้องเป็นการเปลี่ยนแบบค่อยเป็นค่อยไป ในการเปลี่ยนความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่เพื่อสามารถเปลี่ยนเฟสได้อย่างสมบูรณ์และไม่ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างซึ่งจะเป็นปัญหาในการวิเคราะห์ และต้องระวังเรื่องการปนเปื้อนระหว่างเฟสเคลื่อนที่เดิมและเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Degassing

ปริมาณของอากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่เป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อ stability ของ detector baseline และ detector sensitivity การ degassing ในระบบHPLC สามารถเลือกได้ 2 แบบ คือ



รูป ฌ.1 แสดงระบบของ Degassing

ปัญหาเกิดจากการมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่

การมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ การเกิดฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่ และการมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

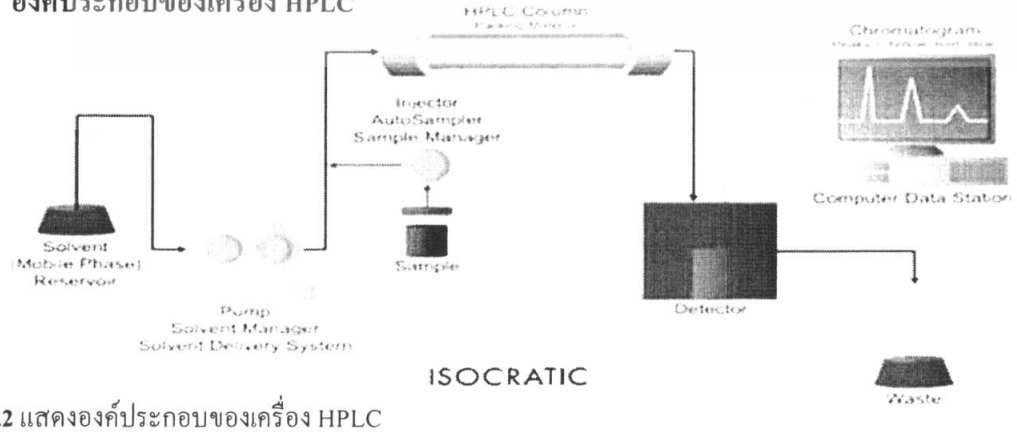
- การเกิดอากาศในเฟสเคลื่อนที่

ปัญหาที่เกิดตามมาคือฟองอากาศจะเป็นสาเหตุให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่คงที่ทำให้ retention time และพื้นที่พีกของสารไม่คงที่ และถ้ามีฟองอากาศในคอลัมน์จะทำให้ได้พีกที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ ละถ้ามีการสะสมของฟองอากาศที่ตัวตรวจวัดจะเป็นสาเหตุของการเกิด Noise และ Baseline

- การมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

ปัญหาที่เกิดอาจมาจากการที่ออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ทำการ oxidized ตัวอย่างหรือสารที่เป็นองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่ในปริมาณมากจะทำให้ sensitivity ของ fluorescence detector ลดลงและอาจเป็นสาเหตุของการเกิด noise

2. องค์ประกอบของเครื่อง HPLC



รูปที่ ฌ.2 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

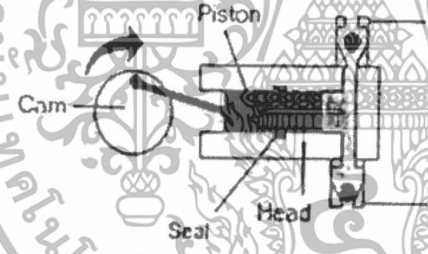
ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase reservoir)

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

จุดประสงค์ของการไล่อากาศในเฟสเคลื่อนที่คือต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจไปทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่ การไล่ก๊าซที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว และมีบางบริษัทที่ผลิตเครื่อง HPLC สามารถใช้ได้กับระบบที่ไม่ต้องไล่ก๊าซออกก่อน

ปั๊ม (Pump)

ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมากเมื่อใช้อนุภาคขนาดเล็ก ๆ และคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันสูงเพื่อดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไปหรือใช้เพื่ออัดของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ด้วยความดัน



รูปที่ ฌ.3 แสดงภาคตัดขวางของเครื่องปั๊ม

Sample Intorduction (Injector)

ถึงแม้ว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่ดีที่สุดก็ตาม แต่ถ้าการฉีดสารตัวอย่าง เข้าสู่เครื่อง HPLC นั้นไม่มีความระมัดระวังก็จะทำให้การแยกสารนั้นไม่ได้ผลดี ตามหลักการแล้วควรฉีดสารด้วยปริมาณน้อย ๆ ตรงบริเวณกึ่งกลางของหัวคอลัมน์และต้องคอยระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขณะฉีดสารเพื่อจะให้เกิดประสิทธิภาพการแยกเกิดขึ้นสมบูรณ์

ชนิดของ injector ที่แตกต่างกัน สามารถใช้ด้วยกันได้และเลือกให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ single Type ของ injector ถูกใช้ใน HPLC ซึ่งต่างจาก GC Loop injector (บางทีก็เรียก valve injector) เป็นการนำตัวอย่างที่เป็นของเหลวเข้าสู่ liquid stream และทำให้มีปริมาณที่เหมาะสมในการนำตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์โดยใช้ conventional syring เมื่อ loop เติมเฟสเคลื่อนที่แล้วนั้นจะถูกปั๊มเข้าไปด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมจากนั้นผ่านวาล์วเข้าไปสู่คอลัมน์ ที่เก็บคอลัมน์อยู่ในภาวะสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่และรักษาระบบการทำงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทกราฟีเมื่อจะ injection rotating switch จะถูกเคลื่อนและ flow ถูกพาเข้าไปใน loop ทำให้มีระดับความสูงเท่ากันในคอลัมน์

พารามิเตอร์ 2 ตัวที่สำคัญคือ ความถูกต้อง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) โดยความถูกต้องของการหาปริมาณวิเคราะห์ขึ้นกับขนาดของ loop (ของเหลวที่มากเกินพอจะเป็นของเสียไปที่ waste) ซึ่งฟองอากาศจะไม่ถูกนำเข้าไปในตัวอย่างและสิ่งสำคัญคือ ต้องแน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศเข้าไปแทนตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้ได้ความแม่นยำและถูกต้องที่สุด

การทำปริมาณวิเคราะห์ทำโดยใช้วิธี internal standard ควรถูกเลือกใช้และถ้าตัวอย่างไม่เพียงพอสามารถเติมที่ loop ได้ loop ที่ไม่ถูกเทียบมาตรฐาน (calibrate) จะมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งไม่มีผลต่อความแม่นยำของการวัด loop ที่เหมือนกัน ถูกใช้ในการทำกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณและสำหรับการหาตัวไมทราบค่า ความถูกต้องของการวัด ถ้า injector คำนึงถึงอื่นน้อยกว่าการมีอากาศเข้าสู่ injector อาจทาง liquid flow ซึ่งเป็นผลให้ได้สัญญาณที่ไม่เสถียรจาก mass spectrometer

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ด้วยเทคนิค HPLC มีด้วยกัน 3 วิธีคือ

1) **Septum injector**

วิธีการนำสารเข้าเครื่องนี้จะคล้ายกับใน GC มากแต่เข็มฉีดใน GC จะใช้กับความดันเพียง 100 บาร์ ในกรณีที่ความดันสูง ๆ จะนำมาใช้ฉีดสารไม่ได้ จึงได้มีการสร้างเข็มฉีดที่ใช้กับความดันสูง ๆ ถึง 600 บาร์ ขึ้นมาและบางทีอาจเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดจากวิธีทั้งหมด คือการออกแบบที่ไม่แน่นอนทำให้มันง่ายที่จะสร้างสำหรับใช้ในห้องทดลองโดยใช้วัสดุอย่างง่าย ๆ ในการสร้าง

ข้อดีของการฉีดสารแบบ Septum คือ

- ฉีดในปริมาตรที่เราต้องการได้
- ปริมาณน้อย ๆ ก็สามารถฉีดสารได้
- วิธีการฉีดสารง่าย และราคาถูก
- เป็นการฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง จนทำให้สัมผัสกับเฟสอยู่กับที่โดยตรง

ความแม่นยำในการนำสารตัวอย่างเข้าจะดีขึ้น ถ้าประกอบด้วย on-column injector แต่มีข้อเสียของการสึกวัตถุนั้นโดนที่มันจะไปรบกวนการส่งผ่านของสารตัวอย่างตรงบริเวณศูนย์กลาง ปัญหานี้แก้ไขได้โดยการใช้ capillary tube นำสารเข้าบริเวณส่วนหัวของคอลัมน์

2) **sampling valve**

ระบบฉีดสารประเภทนี้ถือว่าเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในเทคนิค HPLC เนื่องจากสามารถนำมาใช้ในความดัน

และอุณหภูมิสูงได้ รวดเร็วและสามารถทำซ้ำได้ สามารถใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณมาก ๆ ได้แล้วยังมีความผิดพลาดน้อยกว่า 0.1% และสามารถฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์แบบอัตโนมัติได้อย่างง่ายดาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) Automatic valve

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยวิธีนี้นั้นจะใช้งานสะดวกมาก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก หรือเมื่อต้องการฉีดสารตัวอย่างที่เหมือนกันซ้ำ ๆ Automatic injector มีประโยชน์หลายอย่าง ซึ่งอาจทำงานได้ด้วยตัวมันเองหรือควบคุมโดย LC computer การนำตัวอย่างเข้าสู่ระบบอาจทำได้โดยการผลักดันโดนใช้แรงลม ตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิลิตร อาจถูกบรรจุลงในที่ใส่สารที่ถูกปิดอย่างมิดชิด ซึ่งในบางระบบนั้นจะมีความซับซ้อนมาก และมันยังอาจควบคุมการฉีดที่มีปริมาณของตัวอย่างที่ไม่คงที่ได้ในช่วงระยะเวลาที่แน่นอนและเป็นลำดับ

คอลัมน์ (Column)

เป็นส่วนประกอบที่มีราคาน้อยที่สุด แต่ถือว่าเป็นหัวใจของระบบ คอลัมน์ HPLC โดยทั่วไปมีความยาว 25-30 เซนติเมตร ในปัจจุบันมีแนวโน้มว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีความยาวและขนาดของอนุภาคน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถผลิตสารบรรจุที่มีขนาดเล็กลงมา 3-5 ไมโครเมตรและใช้เทคนิคการบรรจุสารที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นมานั้นเอง ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่อหน่วยความยาวคอลัมน์ดีขึ้น

ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์

- อย่าใช้คอลัมน์ที่มีความดันมากเกินไป
- ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า pH มากหรือน้อยจนเกินไป ควรในเฟสเคลื่อนที่ที่มี pH ในช่วง 3.5-6.5
- ห้ามเก็บคอลัมน์ไว้ในบัฟเฟอร์หรือในสารละลายที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบเพราะอาจทำให้เกิดตะกอนได้และไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีตะกอนหรือขุ่น ควรกรองเฟสเคลื่อนที่เสมอ
- ระวังไมคอลัมน์ถูกกระแทก
- ไม่เก็บคอลัมน์ได้ที่อุณหภูมิสูง
- ถ้าคอลัมน์ใกล้เสื่อมสภาพให้ล้างด้วย 1% กรดอะซิติก

ตัวตรวจวัด (Detector)

ตัวตรวจวัดที่ได้นำมาใช้มากที่สุดใน HPLC ได้แก่ Ultraviolet absorbance (UV) และ Refractive index (RI) ตัวตรวจวัดชนิด UV มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์สารอินทรย์เป็นส่วนใหญ่ ตัวตรวจวัดชนิดนี้มีทั้งความยาวคลื่นเดียว (มักจะใช้ที่ 254 นาโนเมตร Mercury arc lamp) และแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (Variable wavelength) ในช่วง 190-600 นาโนเมตร ซึ่งตัวตรวจวัดใน HPLC ปั๊มรุ่น P1000 Isocratic pumps ตัวตรวจวัด UV รุ่น 1000 ของบริษัท Shimazu (รุ่นที่ใช้ในการทดลอง๗) เป็นแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (Deuterium arc lamp) การดูดกลืนแสงนี้เป็นคุณสมบัติของโมเลกุล ดังนั้นแต่ละสารประกอบจึงมีการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของตัวเอง ตัวตรวจวัดชนิด UV จัดเป็นชนิดที่มีความไวสูง สามารถตรวจวัดสามารถแยกประเภทในปริมาณถึงระดับนาโนกรัม

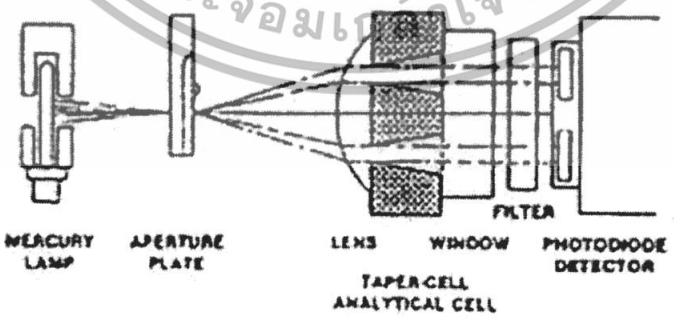
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด	ความไว (กรัม/มล.)	ผลของอุณหภูมิ	ผลของอัตราการไหล	หมายเหตุ
UV absorption	$5x10^{-5}$	น้อย	ไม่มีผล	นิยมใช้วัดในช่วง 254-280 nm
IR absorption	10^{-6}	น้อย	ไม่มีผล	-
Fluorometry	10^{-10}	น้อย	ไม่มีผล	-
Refractive index	$5x10^{-7}$	-	ไม่มีผล	วัดความแตกต่างดัชนีหักเหของสารตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่
Conductivity	10^{-8}	± 1 °C	มีผล	-
Flame ionization	10^{-8}	ไม่มีผล	มีผล	สารตัวอย่างถูกเผาให้เป็นไอออนและถูกจับโดยแอโนดเพลท
Mass spectrometry	10^{-10}	ไม่มีผล	ไม่มีผล	วิเคราะห์สารได้ถึง 0.2-1.0 nanogram

ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันเป็น การวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต เนื่องจากสารส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยหมู่ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวได้ดีเนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้ตัวตรวจวัด UV Detector เป็นหลัก ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดเพิ่มดังนี้

ตรวจวัดที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. Fixed-wavelength UV detector ตัวตรวจวัดชนิดนี้ ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้เป็นหลอดที่ทำด้วยปรอทความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยแสงผ่าน aperture plate ตรงไปยังเลนส์ ที่ทำด้วยควอทซ์ ซึ่งจะทำให้แสงผ่านเข้าไปในเซลล์อ้างอิงและเซลล์ของสารตัวอย่าง ต่อจากนั้นแสงจะผ่านกระจกควาอทซ์และแผ่นกรองซึ่งจะแยกความยาวคลื่นที่เราสนใจ ก่อนที่แสงนั้นจะถึงโฟโตไดโอด โฟโตไดโอดจะทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแสงทั้งเซลล์อ้างอิงและเซลล์ของสารตัวอย่าง เป็นสัญญาณไฟฟ้าและผ่านเข้าไปในส่วนของการขยายสัญญาณ



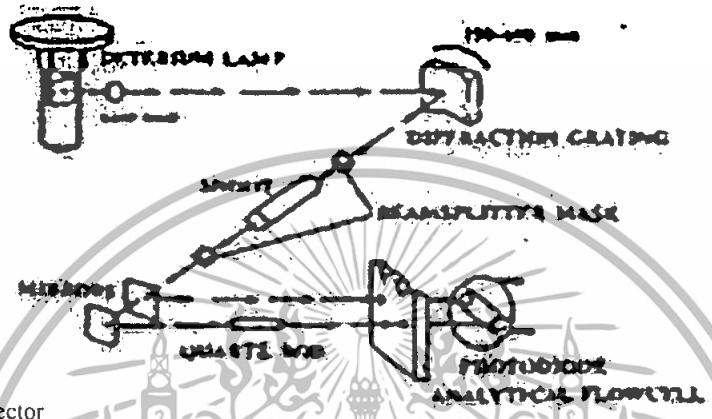
รูปที่ ฌ.4 Fixed- wavelength UV detector

ข้อจำกัดของตัวตรวจวัดประเภทนี้จะไมสามารถตรวจวัดสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 254 นาโนเมตร เพราะมีสารประกอบสำคัญหลายชนิดใช้ความยาวคลื่นในช่วง 195-225 นาโนเมตร นอกจาก mercury lamp แล้วอาจใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่น เช่น Zn lamp (206 nm) Cd lamp (214 nm) เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

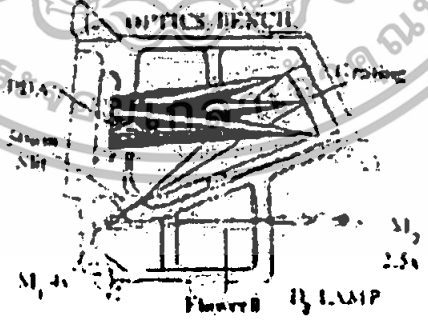
ต้น สำหรับ D_2 lamp จะเปล่งแสงออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วงยูวี (200-400 nm)และบางช่าวของ visible เมื่อต้องการความยาวคลื่นใด ๆ ก็จะใช้โมโนโครโมเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้อง

2. Variable UV detector ตัวตรวจวัดชนิดนี้จะแตกต่างจากตัวตรวจวัดประเภทแรกคือใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D_2 lamp และใช้โมโนโครโมเตอร์แยกแสงและเลือกตามต้องการได้จึงสามารถตรวจวัดสารตัวอย่างได้ทั่วไปเพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด



รูปที่ ฌ.5 Variable UV detector

3. Photodiode array detector (PDA) ตัวตรวจวัดประเภทนี้จัดว่าเป็น solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน มีลักษณะดังรูป ระบบทางเดินของแสงจะต่างจาก UV visible detector ทั่ว ๆ ไปคือระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบ reverse optics จากรูปแสงจากแหล่งกำเนิดหรือหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow through cell ก่อนที่จะไปยังโมโนโครโมเตอร์หรือเกตติง เมื่อแสงตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกไปเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบกับแผงของโฟโตไดโอดดังรูป



รูปที่ ฌ.6 Photodiode array detector

PDA (996) เป็นตัวตรวจวัดที่จะช่วยให้ข้อมูลทางโครมาโทกกราฟีมีความเด่นชัดและผลลัพธ์เป็นที่น่าเชื่อมากขึ้น เนื่องจาก มีการใช้เทคโนโลยี Taper beam และระบบการเก็บข้อมูลในคอมพิวเตอร์ซึ่งมี Milennium 2010 เป็น software ควบคุมการทำงานและการเก็บข้อมูลรวมทั้งการประมวลผลในรูปแบบ 3D graphic spectral contrast peak purity เป็นต้น จากการใช้เทคโนโลยีของ taper beam ช่วยขจัด refractive index effect

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งจะเป็นการเพิ่ม sensitivity ในส่วนของ spectral contrast เราสามารถเก็บข้อมูลมาเปรียบเทียบโดยใช้สเปกตรัมมาเปรียบเทียบกัน ซึ่งทำให้ทำ compound confirmation ได้

ส่วนประมวลผล (Data system)

ส่วนประมวลผลข้อมูล คือส่วนที่เปลี่ยนแปลงสัญญาณอนาลอกเป็นดิจิตอล

ส่วนทิ้งของเสีย (Waste)

ส่วนทิ้งของเสีย

3. ข้อปฏิบัติในการใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์

มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

- การเตรียมเฟสเคลื่อนที่น้ำที่นำมาใช้ในการเตรียมควรเลือกใช้ที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น น้ำกลั่น 2 ครั้ง หรือ 3 ครั้ง และปราศจากไอออนชนิดต่าง ๆ สำหรับสารเคมีที่ใช้เช่นเมทานอลควรใช้กรด HPLC grade เมื่อผสมเฟสเคลื่อนที่เสร็จแล้วต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน

สำหรับ membrane filter ก็ต้องเลือกให้ถูกว่าชนิดใดใช้กรองเฟสเคลื่อนที่ที่มีน้ำเป็นส่วนผสมได้ชนิดใดกรองตัวทำละลายอินทรีย์หลังจากกรองแล้วนำเฟสเคลื่อนที่ไปทำการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่นก๊าซออกซิเจน เพื่อต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่เฟสอยู่กับที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่ทำให้เกิดฟองอากาศ (bubble) ในเครื่องตรวจวัดขณะทำการทดลองอยู่ การไล่ก๊าซที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvent) กำจัดก๊าซที่ละลายอยู่ในตัวทำละลาย (degas) อาจใช้การ sonicate ในเครื่อง ultrasonic ประมาณ 15 นาที หรือผ่านก๊าซฮีเลียม 15 นาที

- เมื่อเตรียมสารตัวอย่างเสร็จแล้วก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ทุกครั้ง เพื่อป้องกันการอุดตันที่หัวคอลัมน์ ซึ่งทำให้ความดันระบบสูงกว่า ปกติ

- ก่อนฉีดสารตัวอย่าง ต้องรอคอลัมน์ถึงสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่ก่อน โดยดูจาก baseline บนเครื่องบันทึกผลที่ต่อกับตัวตรวจวัด

- ก่อนฉีดสารตัวอย่างควรตรวจสอบรอยรั่วตามข้อต่าง ๆ รวมทั้งที่ eng fitting ของคอลัมน์ด้วย ซึ่งโดยมากมักรั่วเล็กน้อย และตรวจสอบได้ก็ต่อเมื่อใช้มือแตะจะรู้สึกเย็นเนื่องจากตัวทำละลายระเหยไป ถ้ามีรอยรั่วเกิดขึ้นมักจะทำให้ระดับ baseline ยกขึ้น มีอากาศเข้าไปในระบบและอาจมี

- ไม่ควรขันข้อต่อของคอลัมน์แน่นเกินไป เพราะจะทำให้เกลียวของ fitting เป็นรอยจนรั่วได้ ซึ่งแม้จะขันต่อไปอีกก็ไม่สามารถหยุดรอยรั่วได้ เมื่อมีรอยรั่วเกิดขึ้นควรขันเพิ่มอีกเพียงเล็กน้อย และถ้ายังรั่วอยู่ควรถอดออกมาทั้งหมดแล้วจึงใส่กลับเข้าไปใหม่

- การเลือกคอลัมน์และตัวตรวจวัด เลือกชนิดคอลัมน์ให้เหมาะสมกับงาน ในกรณีที่เริ่มใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอลัมน์โดยไม่รั่วประวัติของคอลัมน์นั้นเลย ให้ล้างคอลัมน์(ไม่ต้องต่อเข้าตัวตรวจวัด) ก่อนตามวิธีที่เหมาะสม ส่วนตรวจวัดควรเลือกให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์

- การใช้คอลัมน์ในงาน HPLC ควรหลีกเลี่ยง หรือป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดัน อุณหภูมิและสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่โดยกทันหัน เนื่องจากจะทำให้การจัดตัวของอนุภาคสารที่บรรจุ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดช่องว่างในคอลัมน์ควรเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเป็นขั้น ๆ ขั้นละ0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดันอย่างกะทันหัน (pressure shock) ควรให้เวลาหลาย ๆ นาทีในการให้คอลัมน์อยู่ที่ความดันปกติของการทำงาน และปล่อยให้ความดันค่อย ๆ ลดลงมา เมื่อต้องการให้ปั๊มเลิกทำงาน การใช้ guard column สามารถช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ เนื่องจากจะมีแผ่นกรองที่มีขนาดรูอนุภาคประมาณ 0.5 ไมครอน ทำหน้าที่กรองอนุภาคที่อาจหลุดมาจากขั้นตอนการกรองตัวอย่าง และขณะเดียวกันก็เป็นการกรองเฟสเคลื่อนที่ซ้ำอีกครั้ง
- เพื่อยืดการใช้งานของคอลัมน์ ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH สูงหรือต่ำมาก ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH อยู่ในช่วง 3.5-6.5
- ตรวจดูอัตราการไหลคงที่หรือไม่โดยสังเกตจากความดัน ค่าคงที่จึงเริ่มวิเคราะห์ได้ ถ้าไม่คงที่อาจมีปัญหาที่การ degas ไม่ดีพอ ต้องทำการ degas ใหม่
- เมื่อฉีดสารตัวอย่างที่มีการเติมสารปนเปื้อนลงไป ควรล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมประมาณ 200-300 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราการไหลต่ำ ๆ
- ไม่ควรเก็บคอลัมน์ไว้ในที่ชื้นหรืออุณหภูมิที่ทำให้คอลัมน์และอนุภาคเกิดการขยายและหดตัวกลับไปกลับมา เพราะจะทำให้เกิดช่องว่างขึ้นในคอลัมน์ ดังนั้นควรเก็บอุณหภูมิระหว่าง 15-30 °C และเก็บในสภาพเปียก เช่น เก็บคอลัมน์ประเภท Liquid solid chromatographyด้วยตัวทำละลายที่แห้ง หรือเก็บคอลัมน์ประเภท reverse phase ในตัวทำละลายอินทรีย์100 % เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้