การเตรียมคอลัมน์ SPE-C18 สำหรับใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งโดยใช้ซิลิกาจากแกลบข้าวเป็นเฟสอยู่กับที่

PREPARATION OF COLUMN SPE-C18 FOR SOLID-PHASE EXTRACTION BY USING SILICA FROM RICE HUSK AS STATIONARY PHASE

ภัทราวดี จัดธานนท์

PHATTARAWADEE JADTANON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2008-SC-M-012-045

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเตรียมคอลัมน์ SPE-C18 สำหรับใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งโดยใช้ซิลิกาจากแกลบข้าวเป็นเฟสอยู่กับที่

PREPARATION OF COLUMN SPE-C18 FOR SOLID-PHASE EXTRACTION BY USING SILICA FROM RICE HUSK AS STATIONARY PHASE

T087872

ภัทรวดี จัดตานนท์

PHATTARAWADEE JADTANON

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 87872
วัน,เดือน,ปี 19 มี.ค. 2552

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2008-SC-M-012-045

PREPARATION OF COLUMN SPE-C18 FOR SOLID-PHASE EXTRACTION BY USING SILICA FROM RICE HUSK AS STATIONARY PHASE

PHATTARAWADEE JADTANON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMEMT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2008

KMITL-2008-SC-M-012-045

COPYRIGHT 2008
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเตรียมคอลัมน์ SPE-C18 สำหรับใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งโดยใช้ซิลิกาจากแกลบข้าวเป็นเฟสอยู่กับที่

Preparation of Column SPE-C18 for Solid-Phase Extraction by Using Silica from Rice Husk as Stationary Phase

นักศึกษา นางสาวภัทรวดี จัตตานนท์

รหัสประจำตัว 46068805

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เคมี (เคมีวิเคราะห์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		**ลายมือชื่อ**
รศ.อรุณี	คงศักดิ์ไพศาล	[signature]
รศ.คณิตา	ตังคณานุรักษ์	[signature]
ผศ.นงนุช	ศิวะภิญโญยศ	[signature]
รศ.ดร.อรวรรณ	ชัยลภากุล	[signature]

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 13 ตุลาคม 2551 เวลา 14.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 2 ห้อง 301

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

[signature]

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่...29......**เดือน**...ตุลาคม.........**พ.ศ.**2551....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมคอลัมน์ SPE-C18 สำหรับใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งโดยใช้ซิลิกาจากแกลบข้าวเป็นเฟสอยู่กับที่
นักศึกษา	นางสาว ภัทรวดี จัตตานนท์
รหัสประจำตัว	46068805
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี
พ.ศ.	2551
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. คณิตา ตังคณานุรักษ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะศึกษาการเตรียมคอลัมน์ SPE-C18 สำหรับใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง โดยนำซิลิกาจากแกลบข้าวมาสร้างพันธะกับออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนเป็นเฟสอยู่กับที่ โดยบรรจุในกระบอกไซริงจ์ ซึ่งคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นถูกนำมาศึกษาประสิทธิภาพทางโครมาโทกราฟีและทดสอบความใช้ได้ โดยใช้สารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์และตัวอย่างตับหมูจากแหล่งตัวอย่าง 3 แหล่ง (A, B และ C) ที่เติมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ และเททราซัยคลินที่สกัดได้จากวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งถูกตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (K_D) มีค่าเท่ากับ 2.10 ค่า breakthrough volumn (V_B) เท่ากับ 11.2 0 mL ต่อน้ำหนักสารดูดซับ 0.5000 g แฟกเตอร์ความจุ (k′) เท่ากับ 4.78 และจำนวนเพลทตามทฤษฎี (N) เท่ากับ 8.97 ค่าความเป็นเส้นตรงของระบบ (system linearity) ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลิน 21 ระดับความเข้มข้น ในช่วงตั้งแต่ 0.05 ppm ถึง 35.00 ppm พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999. ค่าความเป็นเส้นตรงของวิธี (method linearity) ศึกษาจากตัวอย่างตับหมู A, B และ C ที่เติมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลิน 5 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 1.00-9.00 ppm พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.986, 0.990 และ 0.994 ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) (n = 7) (ความทวนซ้ำได้) เท่ากับ 10.00, 7.91 และ 9.80 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) (n = 7) (ความทำซ้ำได้) เท่ากับ 1.99 ใช้วิธี pair t-test และค่า Horrat เปรียบเทียบความเที่ยงระหว่างคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นกับทางการค้าพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ความถูกต้องแสดงด้วยค่าร้อยละคืนกลับ (%recovery) ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้า เท่ากับ 77.0-98.0% (n = 7) และ 56.0-97.0% (n = 7) ตามลำดับ ค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.75,

1.03 และ 1.34 ppm ตามลำดับ และค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ (LOQ) เท่ากับ 0.06, 0.41 และ 2.24 ppm ตามลำดับ

Thesis	Preparation of Column SPE-C18 for Solid-Phase Extraction by using Silica from Rice Husk as Stationary Phase
Student	Miss.Phattarawadee Jadtanon
Student ID.	46068805
Degree	Master degree of Science
Program	Chemistry
Year	2008
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Kanita Tangkananuruk

ABSTRACT

This research was aimed to study the preparation of column SPE-C18 for solid-phase extraction by using silica from rice husk bonded phase with octadecyltrichlorosilane as stationary phase and packing in syringe barrel. The chromatographic efficiency and validation of preparation SPE-C18 column was tested by employing the standard tetracyclines hydrochlorides solution and spiked liver samples from three sources (A, B and C). The determination of tetracycline after solid phase extraction was performed on High-Performance Liquid Chromatography. The distribution coefficient (K_D) was 2.10, breakthrough volume (V_B) was 11.20 mL to sample weight 0.500 g, capacity factor (k') was 4.78 and the number of theoretical plate of column (N) was 8.97. The system linearity test was performed using 21 concentration levels, from 0.05 to 35.00 ppm of tetracycline concentration. The regression coefficient (R^2) found was 0.999. The method linearity test was performed using 5 concentration levels, from 1.00 to 9.00 ppm of the tetracycline concentrations. The regression coefficient (R^2) found were 0.986, 0.990 and 0.994 for liver samples A, B and C, respectively. The relative standard deviations (%RSD) (n = 7) for reproducibility found was 1.99 and for repeatability were 10.00, 7.91 and 9.80, respectively. From pair t-test and Horrat value showed the difference of preparation SPE-C18 column and commercial SPE-C18 column was no significant. Accuracy expressed in term of recoveries for preparation SPE-C18 column and comerercial SPE-C18 column was in the range 77.0-98.0% (n = 7) and 56.0-97.0% (n = 7), respectively. The limits of detection (LOD) found were 0.50, 0.25 and 0.72 ppm, respectively and the limits of quantitation (LOQ) found were 1.66, 0.82 and 2.39 ppm, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดี ต้องขอกราบขอบพระคุณ รศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ และ รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ และ รศ.ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาเพื่อแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาเคมีทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือ ในเรื่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ภัทรวดี จัตตานนท์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย...I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..III

กิตติกรรมประกาศ..IV

สารบัญ..V

สารบัญตาราง...VIII

สารบัญรูป...X

บทที่ 1 บทนำ...1

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์..1

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย...2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ...2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง...3

2.1 ซิลิกา...3

2.2 การสกัดด้วยเฟสของแข็ง...13

2.3 สารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์...33

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..39

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย..41

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย..41

3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย...42

3.3 วิธีการวิจัย...45

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล...57

4.1 การเตรียมอนุภาคซิลิกาจากแกลบข้าว...57

4.2 การสังเคราะห์ซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน....................................61

4.3 การสังเคราะห์ซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วย
ไทรเมทิลคลอโรไซเลน..63

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพคอลัมน์ SPE-C18....66
4.5 ผลการทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18....68

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ....72
5.1 สรุปผลการวิจัย....72
5.2 ข้อเสนอแนะ....73

เอกสารอ้างอิง....74

ภาคผนวก....79
ภาคผนวก ก. การคำนวณปริมาณหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา....80
ภาคผนวก ข. การคำนวณปริมาณออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนในการสร้างพันธะกับไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา....82
ภาคผนวก ค. การคำนวณปริมาณไทรเมทิลคลอโรไซเลนในการสร้างพันธะกับไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา....84
ภาคผนวก ง. วิเคราะห์หาปริมาณพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าวด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer....86
ภาคผนวก จ. วิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาด้วยเทคนิค Light Scattering Analysis....88
ภาคผนวก ฉ. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเฟสด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis....90
ภาคผนวก ช. วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier Transforms Infrared Spectrometry....93
ภาคผนวก ซ. ผลโครมาโทรแกรมของสารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง....96
ภาคผนวก ฌ. สัมประสิทธิ์การแจกแจง....99
ภาคผนวก ญ.ค่า Breakthrough, แฟกเตอร์ความจุและจำนวนเพลทตามทฤษฎี....102

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ฎ. การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง (System Linearity)..........................106

ภาคผนวก ฏ. การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง (Method Linearity)..........................125

ภาคผนวก ฐ. การคำนวณค่า LOD และ estimated LOQ.......................................144

ภาคผนวก ฒ. การคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยง......................................148

ภาคผนวก ณ. ปริมาณสารเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ในตัวอย่างตับหมู................158

ภาคผนวก ด. เวลาในการไหลผ่านสารในคอลัมน์ SPE-C18..................................160

ภาคผนวก ต. ทฤษฎีโครมาโทกราฟี...163

ประวัติผู้เขียน..174

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณสมบัติทางเคมีของซิลิกา..3

2.2 แสดงปฏิกิริยาเคมีของการสร้างพันธะระหว่างซิลิกากับสารเคมีชนิดต่างๆ.............................10

2.3 แสดงแต่ละชนิดสารดูดซับในกระบวนการสกัดด้วยเฟสของแข็ง...28

2.4 เปรียบเทียบความแรงของตัวทำละลายระหว่างระบบเฟสปกติและระบบเฟสย้อนกลับ
ที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง...30

2.5 แสดงชนิดของสารดูดซับที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง..31

2.6 คุณสมบัติทางเคมีของเททราซัยคลิน..33

2.7 แสดงกลไกการทำงานของสารเททราซัยคลินต่อผลิตภัณฑ์ยาและอาหาร.................................37

4.1 ผลร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้า
ที่ไม่ได้นำมาใช้ซ้ำ..69

4.2 ผลร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้า
ที่นำมาใช้งานซ้ำ..69

4.3 แสดงผล LOQ และ LOQ ของสารเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18
ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น..70

4.4 แสดงผลการทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น.............71

จ.1 การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว...89

ฌ.1 แสดงข้อมูลการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจงของสารละลายมาตรฐาน
เททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์..100

ญ.1 แสดงข้อมูลศึกษาค่า Breakthrough ของสารมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์........104

ฎ.1 แสดงผลการศึกษา System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลิน
ไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ทำการผ่านคอลัมน์ SPE-C18..107

ฎ.2 แสดงผลการศึกษา System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลิน
ไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า..112

ฎ.3 แสดงผลการศึกษา System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลิน
ไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น..118

ฏ.1 แสดงผลการศึกษา Method Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลิน
ไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า..126

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ฎ.2 แสดงผลการศึกษา Method Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น....................................134

ฐ.1 แสดงผลการศึกษาค่า LOQ และ LOQ ของสารเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น....................................145

ฒ.1 แสดงค่าการศึกษาผลค่าความถูกต้องที่ได้ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น....................................149

ฒ.2 แสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความถูกต้อง....................................151

ฒ.3 แสดงค่าการศึกษาผลที่ได้ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น....................................152

ฒ.4 แสดงผลการทดสอบสารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่ไม่ได้นำมาใช้ซ้ำที่ระดับความเข้มข้น 5.00 ppm....................................153

ฒ.5 แสดงผลที่ได้จากการคำนวณค่าความเที่ยงของคอลัมน์ SPE-C18 ที่ไม่ได้ใช้ซ้ำ....................................154

ฒ .6 แสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความเที่ยง....................................154

ฒ.7 เกณฑ์การยอมรับค่าความเที่ยงใช้เกณฑ์ AOAC และ Codex ของ EU กำหนด....................................155

ฒ.8 แสดงผลการทดสอบสารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่นำมาใช้ซ้ำที่ระดับความเข้มข้น 5.00 ppm....................................156

ฒ.9 แสดงผลที่ได้จากการคำนวณค่าความเที่ยงของคอลัมน์ SPE-C18 ที่ใช้ซ้ำ....................................156

ณ.1 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ในตัวอย่างตับหมู A, B และ C....................................159

ด.1 แสดงเวลาการไหลผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น....................................161

ด.2 เปรียบเทียบค่าจากการทำ Paired-t-test ระหว่างคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น....................................162

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 การจัดเรียงตัวกันแบบทรงเหลี่ยมสี่หน้าของซิลิกา..4

2.2 รูปแบบต่างๆ ของการเชื่อมต่อของ SiO_4 เททราฮีดอลในโครงสร้างพื้นฐานของซิลิเกต..........4

2.3 การเกิดเชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้างแบบร่างตาข่ายของ (ก) ซิลิกาแบบผลึกและ (ข) แบบไม่เป็นผลึก..5

2.4 การสร้างพันธะระหว่างหมู่อัลคิลกับพื้นที่ผิวซิลิกา..7

2.5 ตัวอย่างการเกิดคอขวดเนื่องจากขนาดรูบนผิวซิลิกา ซึ่งจะป้องกันการสร้างพันธะกับหมู่อัลคิลบนซิลิกาเจล..8

2.6 รูปแบบไซลานอลบนพื้นผิวของซิลิกา..9

2.7 ลักษณะของอนุภาคซิลิกา..9

2.8 แสดงลักษณะการสร้างพันธะบนพื้นผิวหน้าซิลิกา ซึ่งมีด้วยกัน 2 แบบ (ก) สร้างแบบโมโนเมอร์ริกเฟส และ(ข) สร้างแบบพอลิเมอร์ริกเฟส......................................11

2.9 แสดงการสร้างพันธะแบบโมโนเมอร์ริกเฟส...11

2.10 แสดงการสร้างพันธะแบบพอลิเมอร์เฟส...12

2.11 แสดงการปิดปลายบนไซลานอลอิสระด้วยไทรเมทิลไซเลนบนสารดูดซับชนิด C8...............12

2.12 เทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ ในการวิเคราะห์ยา...13

2.13 ร้อยละค่าคืนกลับของสารดูดซับสามชนิด (SDB, Oasis และซิลิกา C18)........................15

2.14 ชนิดของอุปกรณ์ ก. ชนิดบรรจุในกระบอกฉีดยา, ข. ชนิดบรรจุเป็นคาร์ทริดจ์ และ ค. ชนิดอัดเป็นแผ่นบาง...16

2.15 ขั้นตอนการทำงานการสกัดด้วยเฟสของแข็ง...18

2.16 แรงและเทคนิคในการไหลสารของกระบวนการการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (ก. โดยแรงดึงดูดโลก, ข. โดยแรงดันด้วยเข็มฉีดยา, ค.ปั้มในระบบสูญญากาศ, ง.เครื่องเหวี่ยง)..24

2.17 อุปกรณ์คอลัมน์ SPE (ก) หลอดไซริงจ์ (ข) คาร์ทริดจ์...21

2.18 แบบแผ่นบาง..22

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

2.19 ปฏิกิริยาไซลาไนเซชั่นของซิลิกา....23

2.20 กลไกการยึดจับในระบบเฟสย้อนกลับ....23

2.21 กลไกการยึดจับในระบบเฟสปกติ....25

2.22 ระบบแลกเปลี่ยนไอออน....25

2.23 โครงสร้างสารกลุ่มเททราซัยคลิน....33

2.24 การเกิดอิพิเททราซัยคลินและแอนไฮโดรเททราซัยคลิน....35

2.25 การเกิดไอโซเมอร์ไรเซชั่นของสารละลายเททราซัยคลิน....35

3.1 แสดงลักษณะการบรรจุซิลิกา-C18 ลงในหลอดไซริงจ์....51

4.1 ลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมขึ้นจากแกลบข้าวโดยผ่านการร่อนด้วยตะแกรงคัดขนาด 200 เมช....57

4.2 การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว....58

4.3 ไอโซเทอมที่ได้จากการแอดซอร์บและดีซอร์บแก๊สไนโตรเจนของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้จากแกลบข้าวโดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer....58

4.4 BJH desorption DV (log d) polt ของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer....59

4.5 กราฟ TG แสดงการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกาที่เตรียมขึ้นจากแกลบข้าว....59

4.6 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของอนุภาคซิลิกา....60

4.7 ลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิล-ไทรคลอโรไซเลน....61

4.8 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน....62

4.9 กราฟ TG แสดงการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิล-ไทรคลอโรไซเลน....63

4.10 ลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน....64

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.11 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วย ไทรเมทิลคลอโรไซเลน........65

4.12 กราฟ TG แสดงซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วย ไทรเมทิลคลอโรไซเลน........65

4.13 ไอโซเทอมการแจกแจงของเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์........66

4.14 Breakthrough curve ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์........67

ง.1 Bet plot ของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer........87

ฉ.1 กราฟการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกาโดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis........91

ฉ.2 กราฟการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกา–ออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis........91

ฉ.3 กราฟการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกา–ออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทยเมทิลคลอโรไซเลนโดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis........92

ช.1 สเปกตรัม FT-IR ของซิลิกาที่ได้จากแกลบข้าว........94

ช.2 สเปกตรัม FT-IR ของซิลิกา–ออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน........94

ช.3 สเปกตรัม FT-IR ของ ซิลิกา-ออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วย ไทรเมทิลคลอโรไซเลน........95

ช.4 สเปกตรัม FT-IR ของซิลิกา C18 ทางการค้า........95

ซ.1 ผลโครมาโทรแกรมของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.00 ppm ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18: (ก) ทางการค้า (ข) ที่เตรียมขึ้น........97

ซ.2 โครมาโทรแกรมตัวอย่างตับหมูที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น: (ก) ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C........97

ซ.3 โครมาโทรแกรมของตับหมูที่เติมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (spiked sample) ความเข้มข้น 9.00 ppm ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น: (ก) ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C........98

ญ.1 แสดงลักษณะของกราฟ Breakthrough........103

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

ฎ.1 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 อันดับที่ 1........108

ฎ.2 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 อันดับที่ 2........110

ฎ.3 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ผ่านคอลัมน์ SPE-C18........110

ฎ.4 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับ 1........113

ฎ.5 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับ 2........113

ฎ.6 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับ 3........116

ฎ.7 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า........116

ฎ.8 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับ 1........119

ฎ.9 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับ 2........119

ฎ.10 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับ 3........121

ฎ.11 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น........123

ฏ.1 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับที่ 1 : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C........127

ฏ.2 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับที่ 2 : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C........131

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

ฎ.3 แสดง Residual plot สารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C......133

ฎ.4 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับที่ 1 : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C......135

ฎ.5 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับที่ 2 : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C......139

ฎ.6 แสดง Residual plot สารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น: (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C......141

ฐ.1 แสดงความสัมพันธ์ของ spiked sample blank กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 มาตรฐานและที่เตรียมขึ้น : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C......146

ฒ.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้า......150

ต.1 การแยกสาร A ออกจาก สาร B โดยอาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี......164

ต.2 แสดงโครมาโทแกรมในการคำนวณหาค่าปัจจัยความจุ......167

ต.3 แสดงโครมาโทแกรมของสาร A และ B......169

ต.4 แสดงการแพร่วนทำให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ในเวลาคงไว้ต่างกัน......171

ต.5 การแพร่ตามความยาวของคอลัมน์......171

ต.6 การถ่ายโอนมวล......172

ต.7 Mass transfer zone (MTZ) และ Breakthrough Curve......173

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์

ในงานเคมีวิเคราะห์โดยเฉพาะทางด้านอาหาร ยาและสารพิษในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างส่วนใหญ่จะมีเมทริกซ์ที่ซับซ้อนและสารที่ต้องการวิเคราะห์มักจะมีปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น วิธีการต่างๆ ที่จะนำมาวิเคราะห์ทั้งเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีและทางโครมาโทรกราฟี (HPLC และ GC) รวมถึงเทคนิคไฮฟีเมท (hyphemated) เช่น HPLC-MS และ GC-MS เป็นต้น ไม่ว่าจะมีการพัฒนาเครื่องมือหรือเทคนิคในการวิเคราะห์อย่างไรก็ตาม ยังจำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในการกำจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ที่ปะปนอยู่ในเมทริกซ์ของตัวอย่างออกก่อน และยังเป็นการช่วยปรับเพิ่มความเข้มข้น (trace enrichment) ให้กับสารที่ต้องการวิเคราะห์อีกด้วย

วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid-Phase Extraction, SPE) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างกันอย่างกว้างขวาง นอกเหนือจากวิธีดั้งเดิม คือ วิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลว ซึ่งต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก เป็นสารที่มีราคาแพงและก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม วิธีการค่อนข้างยุ่งยากและความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ความแม่นค่อนข้างต่ำ แต่วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งช่วยในการแยกทั้งสารปนเปื้อนออกจากตัวอย่าง (clean up) และปรับเพิ่มความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำและใช้งานได้ง่าย

การสกัดด้วยเฟสของแข็งเป็นการเตรียมตัวอย่างแบบหนึ่งในลักษณะ Solid adsorption chromatography ซึ่งครอบคลุมทั้งแบบไฮโดรโฟบิกพาร์ทิชัน (Hydrophobic partition) หรือแบบเฟสย้อนกลับ (Reverse phase mode), ไฮโดรฟิลิกพาร์ทิชัน (Hydrophilic partition) หรือ แบบเฟสปกติ (normal phase mode) และโครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange Chromatography) หรือโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ (Affinity Chromatography)

ซึ่งในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นถึงการเตรียมสารดูดซับที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบเฟสย้อนกลับ โดยสารดูดซับเตรียมจากซิลิกาที่สังเคราะห์จากแกลบข้าวมาเกิดพันธะกับสารออคทะ-เดคซิลไทรคลอโรไซเลน (Octadecyltrichlorosilane, ODS หรือ C-18) แล้วบรรจุในหลอดไซริงจ์ (Syringe barelle) จากนั้นนำคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นนี้มาทดสอบการใช้งานและประสิทธิภาพในการแยกสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (Tetracycline Hydrochloride) และทดสอบการใช้งานได้จริงโดยตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ในตัวอย่างตับหมู

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อเตรียมสารดูดซับชนิดซิลิกา – ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน (ซิลิกา-C18) ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง โดยใช้ซิลิกาที่เตรียมได้จากแกลบข้าว

1.2.2 เพื่อให้ได้สารดูดซับที่บรรจุในหลอดไซริงจ์ ที่นำมาใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถใช้ทดแทนคอลัมน์ SPE-C18 ที่ผลิตขายในท้องตลาด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 เตรียมซิลิกาจากแกลบข้าวให้มีคุณลักษณะที่เหมาะสมเป็นสารดูดซับในการสกัดด้วยเฟสของแข็งและวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมขึ้น

1.3.2 สังเคราะห์อนุภาคซิลิกา – ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนและศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน

1.3.3 บรรจุซิลิกา – ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนในหลอดไซริงจ์และทดสอบประสิทธิภาพด้วยสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยกกับคอลัมน์ SPE-C18 ที่ผลิตขายทางการค้า

1.3.4 ประยุกต์นำมาใช้งานจริงกับตัวอย่างตับหมู

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นแนวทางในการผลิตสารดูดซับจากซิลิกา เตรียมได้จากแกลบข้าว ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากแกลบข้าวมาใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

1.4.2 เพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือใช้ให้มากขึ้น

1.4.3 เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าคอลัมน์ SPE-C18 จากต่างประเทศ

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ซิลิกา (Silica, SiO_2)

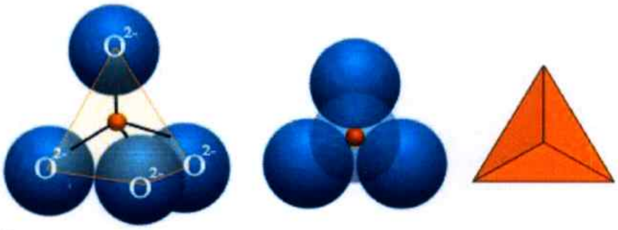
2.1.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

ซิลิกาหรือซิลิคอนไดออกไซด์เป็นสารประกอบพอลิเมอร์อนินทรีย์มีสูตรโครงสร้าง $(SiO_2)_x$ เกิดจากการรวมตัวระหว่างธาตุซิลิคอนและออกซิเจนซึ่งธาตุทั้งสองชนิดนี้มีปริมาณมากที่สุดในโลก ซิลิกาเป็นโครงสร้างที่มีธาตุซิลิคอน (silicon) 1 อะตอมอยู่ตรงกลางถูกล้อมรอบด้วยธาตุออกซิเจน (oxygen) 4 อะตอม เกิดเป็นผลึกรูปทรงที่มี 4 ด้านคล้ายปิรามิด โครงสร้างนี้เรียกว่า ซิลิกาเตตราฮีดรอน (silica tetrahedron) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีของซิลิกาแสดงดังในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีของซิลิกา

คุณสมบัติทางเคมี	
สูตรทางเคมี	SiO_2 จัดเรียงตัวแบบทรงเหลี่ยมสี่หน้า (Tetrahedral)
น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	60.08
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	มากกว่า 2200
จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	1713
ความถ่วงจำเพาะ (กรัมต่อมิลลิลิตร)	2.2

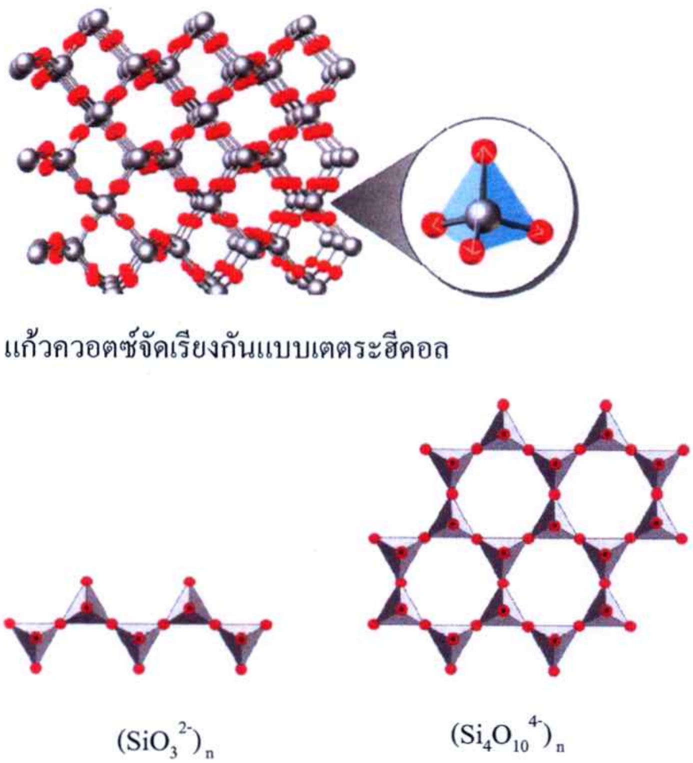
ซิลิกาเป็นองค์ประกอบของเปลือกโลกประมาณ 75.0% มีลักษณะเป็นของแข็งเม็ดเล็กๆ ที่มีรูพรุน สีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่ละลายน้ำ ไม่ไวไฟ มีความเสถียรและความคงตัวทางเคมี เมื่อสลายตัวจะเกิดเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถนำไฟฟ้าได้ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงแต่ที่อุณหภูมิต่ำจะไม่นำไฟฟ้า ถ้าหายใจเอาฝุ่นเข้าไปเป็นเวลานาน จะทำให้เป็นโรคถุงลมปอด เมื่อถูกผิวหนัง สัมผัสถูกตา กลืนหรือกินเข้าไปจะทำให้เกิดการระคายเคือง



รูปที่ 2.1 การจัดเรียงตัวกันแบบทรงเหลี่ยมสี่หน้าของซิลิกา [1]

2.1.2 ชนิดของซิลิกา

ซิลิกามีพบมากในธรรมชาติโดยเกิดจากการสะสมตามหิน เช่น ควอตซ์ (Quartz) หรือจากพืชและสัตว์ เช่น ในเปลือกหอย เป็นต้น ซิลิกาที่พบจะอยู่ในรูปของเตตระฮีดอลดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยมีสี่อะตอมออกซิเจนและหนึ่งอะตอมซิลิคอนและอาจมีการสร้างพันธะกับโลหะอื่น เช่น โซเดียม, แคลเซียมหรือเหล็ก เป็นต้น เกิดเป็นแร่ธาตุต่างๆ นอกจากที่พบตามธรรมชาติแล้ว สามารถจะสังเคราะห์ขึ้นเองได้ มีโครงสร้างเป็นแบบพอลิเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยแต่ละโครงสร้างจะเข้ายึดต่อกันเป็นแผ่น โดยมีการเชื่อมต่อออกซิเจนร่วมกันระหว่างออกซิเจนที่อยู่ในฐานของแต่ละโครงสร้าง มีลักษณะเหมือนรังผึ้งหรือช่องรูปหกเหลี่ยม (hexagonal hole) เกิดเป็นโมเลกุลใหญ่



รูปที่ 2.2 รูปแบบต่างๆ ของการเชื่อมต่อของ SiO_4 tetrahedral ในโครงสร้างพื้นฐานของซิลิเกต [2]

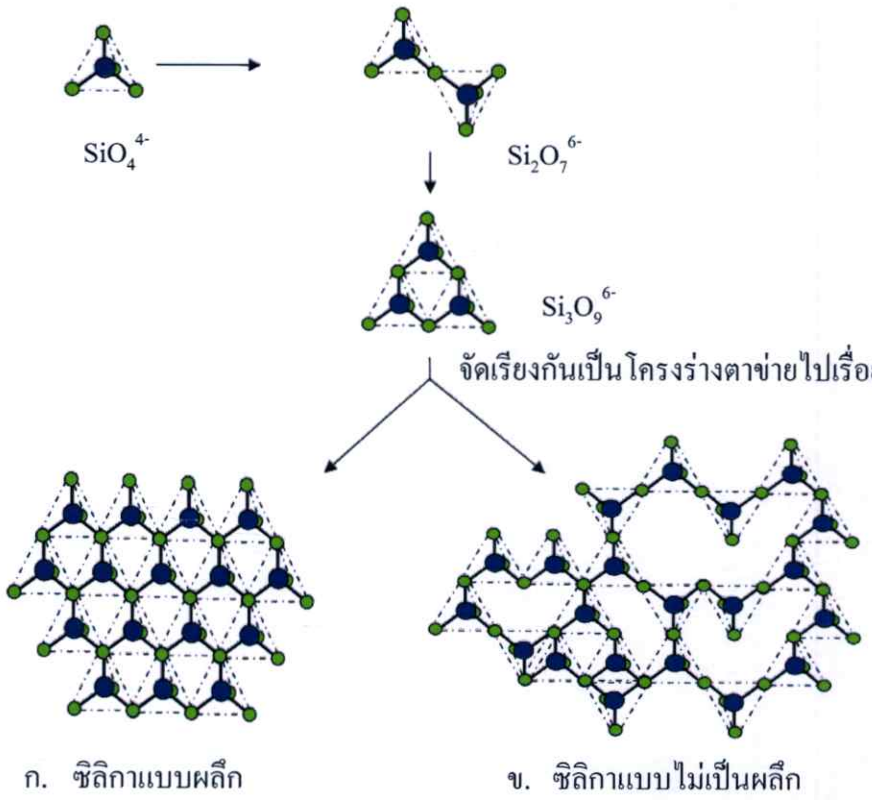
ซิลิกาที่พบแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1) ซิลิกาแบบผลึก (Crystalline Silica) เป็นซิลิกาที่มีการจัดเรียงโครงสร้างอย่างเป็นระเบียบ มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่างๆ มีทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น ควอตซ์ (Quartz), Tridymite, Cristobalite, Keatite และ Stishovite เป็นต้น

2) Microcrystalline Silica เป็นซิลิกาที่เกิดตามธรรมชาติจากการสะสมซากพืชหรือซากสัตว์

3) ซิลิกาแบบไม่เป็นผลึก (Non crystalline Silica) เป็นซิลิกาที่มีการจัดเรียงกันแบบไม่เป็นระเบียบ เช่น แก้ว หรือซิลิกาอสัณฐาน (Amorphous Silica) ซึ่งจะมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน

โดยทางโครงสร้างพื้นฐานของซิลิกาแล้วจะมีลักษณะโครงร่างตาข่าย 3 มิติแบบไม่รู้จบ (infinite three dimension network) ซิลิกาแบบอสัณฐานมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยามากกว่าซิลิกาแบบที่เป็นผลึก เนื่องจากพื้นผิวของซิลิกาแบบอสัณฐานมีหมู่ไฮดรอกซีของไซลานอล (hydroxy silanol group) ซึ่งครึ่งหนึ่งของหมู่ไฮดรอกซีของไซลานอลจะยังคงอยู่แม้ว่าให้ความร้อนถึง 400°C



รูปที่ 2.3 การเกิดเชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้างแบบร่างตาข่ายของ (ก) ซิลิกาแบบผลึก และ (ข) แบบไม่เป็นผลึก [3]

ประโยชน์ของซิลิกาสามารถนำมาใช้งานได้ในหลายๆ ด้าน ทั้งทางอุตสาหกรรม เช่น การทำกระจก และด้านเคมีหลายอย่าง เช่น ทำเป็นคอลัมน์ในทางโครมาโทกราฟีในการแลกเปลี่ยนไอออนหรือเป็นสารดูดซับไอออนโลหะ นอกจากนี้ ยังนิยมนำสารประกอบบางกลุ่ม เช่น สารประกอบอัลคิลมาสร้างพันธะกับพื้นผิวซิลิกาเพื่อประยุกต์การใช้งานให้กว้างมากขึ้น รวมทั้งการใช้งานทางด้านโครมาโทกราฟี โดยรูปร่างซิลิกาที่ใช้งานมีทั้งลักษณะอนุภาคที่เป็นทรงกลม (spherical particles) และอนุภาคที่มีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน (irregular particles)

2.1.3 การเกิดพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) ของซิลิกา

ซิลิกาเป็นสารที่ทนต่อสารเคมี โดยปกติแล้วซิลิกาจะเป็นสารที่ทนต่อกรดเกือบทุกชนิดยกเว้นกรดไฮโดรฟลูออริก (Hydrofluoric acid : HF) ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงๆ จะทำให้ซิลิกาสามารถเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้หลายแบบ การเกิดพอลิเมอไรเซชันของซิลิกาจะทำให้เกิดการจัดเรียงกันเป็นโครงร่างตาข่าย โดยที่ขั้นตอนของการเกิดจะเริ่มจากโมโนเมอร์ (monomer) รวมกันเป็นอนุภาคแล้วขยายอนุภาค หลังจากนั้นจึงเชื่อมต่อกันเป็นโครงร่างตาข่ายไปเรื่อยๆ จนได้โมเลกุลโครงร่างตาข่ายขนาดใหญ่หรือที่เรียกว่า โครงร่างตาข่ายแบบไม่รู้จบดังแสดงในรูปที่ 2.3

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวัสดุสำหรับบรรจุในคอลัมน์ที่มีขนาดอนุภาคระดับไมโครเมตรเพื่อสร้างพันธะที่มีความเสถียรมากขึ้น โดยควบคุมขนาดอนุภาคและขนาดรูพรุน ซึ่งโดยหลักแล้วซิลิกาเจลสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด ดังนี้ คือ ซิลิกาเจลที่อยู่ในรูปแบบ A (type A) และ B (type B)

1) ซิลิกาเจลรูปแบบ A หรือโซลเจล (solgel) เกิดจากการรวมตัวของซิลิกาโซล ซึ่งมีพื้นที่ผิวน้อยกว่า 200.00 m^2/g มีความเป็นรูพรุนต่ำและมีขนาดของรูพรุนสม่ำเสมอ ผนังของซิลิกาชนิดนี้มีความหนาและแข็ง โซลเจลเป็นสารที่เกิดจากอนุภาคแขวนลอยที่ไม่ละลายในของเหลวแล้วเกิดเป็นเจลขึ้น เชื่อมต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่ระหว่าง alkoxysilanes ซึ่งเป็นอนุภาคคอลลอยของซิลิกาอสัณฐาน มีอยู่มากกว่า 50.0% และกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในสารละลายซิลิกาโซล [4]

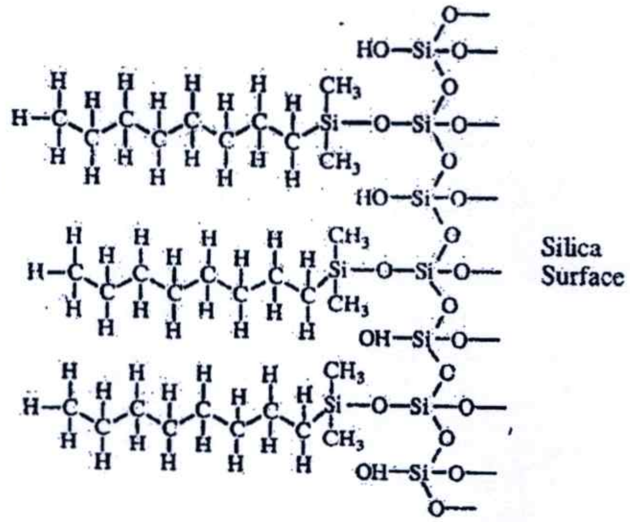
2) ซิลิกาเจลรูปแบบ B (type B) หรือเรียกว่าซีโรเจล (xerogel) และ ซิลเจล (silgel) หรือ โคลเสสซิงฟูมซิลิกา (coalescing fumed silica) มีพื้นที่ผิวมากกว่า 200.00 m^2/g มีความเป็นรูพรุนสูงและมีขนาดของรูพรุนไม่สม่ำเสมอ ผนังของซิลิกาชนิดนี้บางและไม่แข็ง

คุณสมบัติของซิลิกาที่ใช้เป็นของแข็งยึดเกาะ สามารถนำไปสร้างพันธะกับหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ ของสารบางกลุ่มได้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (เช่น การบวม) เพราะซิลิกามีความเสถียรสูงทำให้สามารถเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ได้หลายชนิดและสามารถปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ (gradient elution) ได้ด้วย แต่ซิลิกาก็ยังมีข้อจำกัดในการนำมาใช้เป็นของแข็งยึดเกาะในคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพราะซิลิกาจะละลายที่ค่า pH สูงๆ เช่น ซิลเจล (silgel) หรือ ซีโรเจล

(xerogel) ที่ตกตะกอนจากสารละลายซิลิเกตจะใช้งานไม่ได้ที่ pH สูงกว่า 8.00 ส่วนคอลัมน์ซิลิกาที่เกิดจากการรวมตัวกันของซิลิกาโซล (เรียกว่า โซลเจล (solgel)) จะถูกใช้งานได้ที่ pH ต่ำกว่า 9.00 แต่ถ้าใช้ที่ pH สูงกว่า 9.00 ซิลิกาจะเกิดการละลายอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เฟสเคลื่อนที่บางชนิดจะทำให้ซิลิกาที่บรรจุในคอลัมน์เกิดการยุบลง (callapse) ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของคอลัมน์ลดลง [5,6]

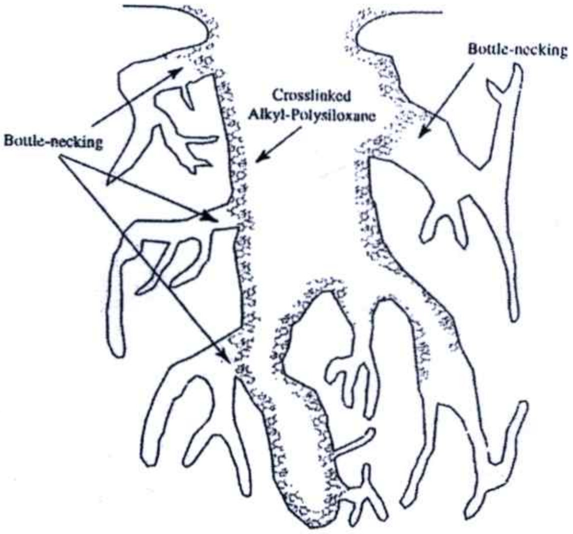
2.1.4 การสร้างพันธะระหว่างซิลิกากับสารประกอบ

ซิลิกามีการนำมาใช้งานทางด้านโครมาโทกราฟีและการสกัดด้วยเฟสของแข็งมาก โดยปกติแล้วอนุภาคซิลิกาที่นำมาใช้งานจะนิยมนำมาสร้างพันธะเคมีบนพื้นผิวซิลิกากับสารประกอบ เพราะซิลิกาเจลจะเกิดการทำปฏิกิริยากับตัวทำละลายผสมได้ไม่ดี เนื่องจากน้ำจะลดปฏิกิริยาการทำงานของซิลิกา ซึ่งมีผลต่อการยึดจับสาร ดังนั้นจึงต้องมีการปรับผิวหน้าซิลิกาให้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เพื่อให้สามารถจับตัวทำละลายได้ ซิลิกาจะสร้างพันธะกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยเชื่อมต่อระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับ ซิลิกาด้วยโครงสร้าง ซิลิคอน – ออกซิเจน – ซิลิคอน (Si–O–Si) ซึ่งเป็นพื้นฐานในการสร้างพันธะกับอนุภาคซิลิกากับหมู่อัลคิล เนื่องจากการสร้างพันธะระหว่างอนุภาคซิลิกากับหมู่ฟังก์ชั่นจะมีทั้งที่เป็นฟังก์ชั่นเดี่ยว (monofunctional) และฟังก์ชั่นสาม (trifunctional) จะมีลักษณะคล้ายแปรงดังแสดงในรูปที่ 2.4 ดังนั้นบางครั้งจะเรียกเฟสอยู่กับที่ชนิดออแกนโนไซเลน (organosilane) ว่า brush phase ชนิดของสารฟังก์ชั่นที่สร้างพันธะ ได้แก่ C4, C8 หรือ C18 เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.3 แสดงถึงชนิดสารที่นำมาสร้างพันธะกับซิลิกา



รูปที่ 2.4 การสร้างพันธะระหว่างหมู่อัลคิลกับพื้นที่ผิวซิลิกา [7]

200.00–600.00 m^2/g และมีพื้นที่ผิวเฉลี่ยประมาณ 500.00 m^2/g มีเส้นผ่าศูนย์กลางรูตั้งแต่ 50–500°A ปกติแล้วอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบ่งได้ 3 ขนาด คือ อนุภาคมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 5.0-10.0 μm ใช้ในงานวิเคราะห์ HPLC เรียกว่า อนุภาครูขนาดเล็ก (Micro porous particle) ถ้าอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลายเฉลี่ยเท่ากับ 30.0-50.0 μm เรียกว่า อนุภาครูขนาดกลาง (Pellicular particle) และอนุภาคขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลายเฉลี่ยเท่ากับ 50.0-250.0 μm เรียกว่า อนุภาครูขนาดใหญ่ (Macro porous particle หรือ Large porous particle) ซึ่งพื้นที่ผิวและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคซิลิกาจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานในการยึดจับสาร เช่น ขนาดของอนุภาคที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 50.0 μm จะนำมาใช้ในโครมาโทกราฟีแบบแยกขนาด เป็นต้น นอกจากนี้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางจะมีผลในการสร้างพันธะกับสารอัลคิลและการยึดจับสารวิเคราะห์ เช่น ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคน้อยกว่า 10.0 μm จะเกิดลักษณะที่เรียกว่า คอขวด (bottle necking) ขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2.5 บนพื้นผิวซิลิกา ทำให้ไม่สามารถเกิดการสร้างพันธะกับสารอัลคิล เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคเล็กมาก ทำให้สารที่นำมาสร้างพันธะไม่สามารถผ่านเข้าไปได้

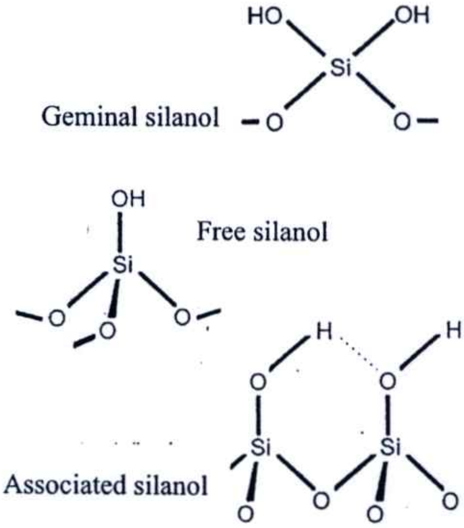


รูปที่ 2.5 ตัวอย่างการเกิดคอขวดเนื่องจากขนาดรูบนผิวซิลิกา ซึ่งจะป้องกันการสร้างพันธะกับหมู่อัลคิลบนซิลิกาเจล [7]

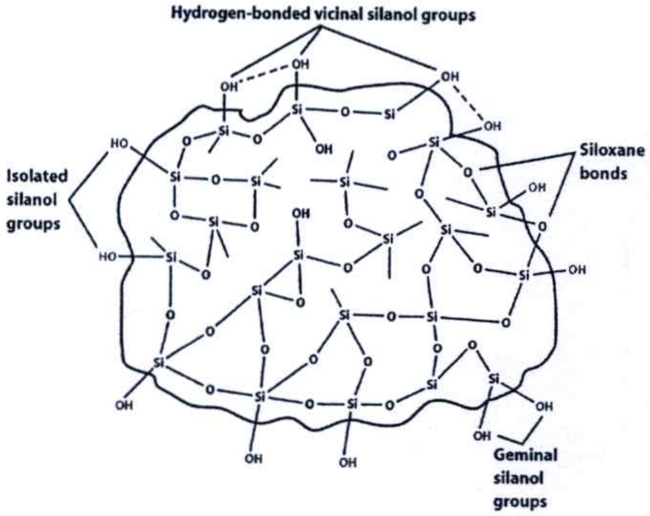
โดยซิลิกาที่มีสภาวะเหมาะสมในการใช้งานจะต้องมีไซลานอลเพียงพออยู่บนพื้นผิว ซึ่งบนพื้นผิวซิลิกามีหมู่ไซลานอลสูงสุดถึง 8.00 ไมโครโมลต่อตารางเมตร หมู่ไซลานอลบนผิวซิลิกาแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ซึ่งชี้แจงความแตกต่างของไซลานอลแต่ละชนิด โดยเทคนิค Magic Angle-Spinning (MAS) ^{29}Si NMR และ Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy Fourier Transform

แบ่งได้เป็น 3 ชนิด ซึ่งชี้แจงความแตกต่างของไซลานอลแต่ละชนิด โดยเทคนิค Magic Angle-Spinning (MAS) ^{29}Si NMR และ Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy Fourier Transform (DRIFT) ได้ดังนี้ คือ ไซลานอลเจอมินอล (geminal silanol) ประกอบด้วยไซลานอลหนึ่งอะตอมและมี 2 หมู่ไฮดรอกซีมายึดเกาะ, ไซลานอลอิสระ (free silanol) ประกอบด้วยไซลานอลหนึ่งอะตอมและมีหนึ่งหมู่ไฮดรอกซี โดยไม่มีหมู่ไฮดรอกซีอื่นเข้ามาใกล้ แต่ถ้ามีหมู่ไฮดรอกซีบนไซลานอลอื่นมาใกล้และเกิดพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อเรียกว่า associated silanol ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งลักษณะไซลานอลเหล่านี้ทำให้ผิวหน้าของซิลิกามีความเป็นขั้วสูงสามารถยึดจับสารมีขั้วได้ดี

ลักษณะพื้นที่ผิวซิลิกาที่ประกอบด้วยหมู่ไซลานอลทั้ง 3 ชนิด เป็นดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.6 รูปแบบไซลานอลบนพื้นผิวของซิลิกา [8]

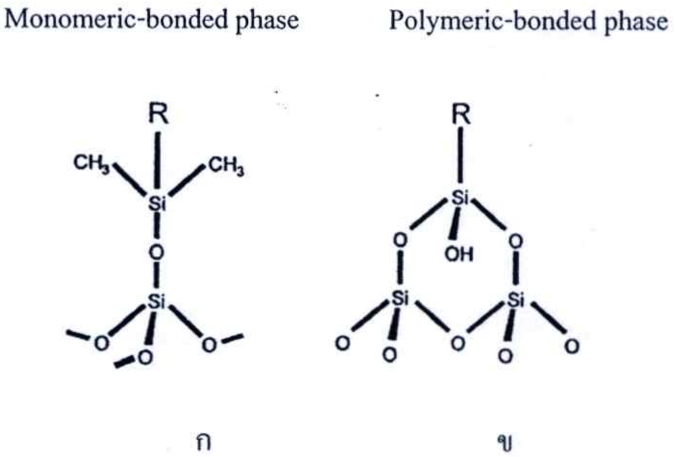


รูปที่ 2.7 ลักษณะของอนุภาคซิลิกา [9]

การทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายอินทรีย์กับหมู่ไซลานอล (Si-OH) บนพื้นผิวซิลิกา โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีด้วยกัน 3 แบบ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 วิธีแรกจะอาศัยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (esterification) เป็นการสร้างพันธะระหว่างหมู่ไฮดรอกซีของแอลกอฮอล์กับหมู่ไซลานอลของซิลิกา ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่คงตัว เนื่องจากอีเทอร์ที่สร้างพันธะ (Si–O–C) สามารถถูก hydrolyse ได้ง่ายในสภาวะกรด วิธีที่สองอาศัยปฏิกิริยาคลอริเนชั่น (chlorination) โดยหมู่ไซลานอลจะทำปฏิกิริยากับ SO_2Cl_2 ได้ Si-Cl แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับสารออร์แกโนเมทาลิก (organometallic) เช่น Grignard หรือ สารออร์แกโนลิเทียม (organolithium) ด้วยพันธะ Si–C มีความคงตัวสูง และวิธีสุดท้ายอาศัยปฏิกิริยาออร์แกโนไซเลน (เป็นวิธีที่นิยมนำมาสร้างพันธะกับซิลิกามากที่สุด ทั้งในการสกัดด้วยเฟสของแข็งและโครมาโทกราฟี) โดยสารออร์แกโนคลอโรไซเลน (organochlorosilane) หรือ ออร์แกโนอัลคอคซิไซเลน (organoalkoxy silane) สร้างพันธะเคมีแบบไซลอกเซน (siloxane) ที่เสถียรในรูปแบบพันธะ (Si–O–Si–C) ที่ pH เหมาะสม คือ 2.00-7.50 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เรียกว่า ไซลาไนเซชั่น (silanization) การเข้ายึดจับระหว่างซิลิกากับสารออร์แกโนไซเลนจะมีด้วยกัน 2 ลักษณะ คือ ปฏิกิริยาที่สภาวะไม่มีน้ำ (anhydrous conditions) จะได้โมโนเมอร์ริกเฟส (monomeric phase) และในสภาวะที่ควบคุมความชื้น จะได้พอลิเมอร์ริกเฟส (polymeric phase) ดังแสดงในรูปที่ 2.8

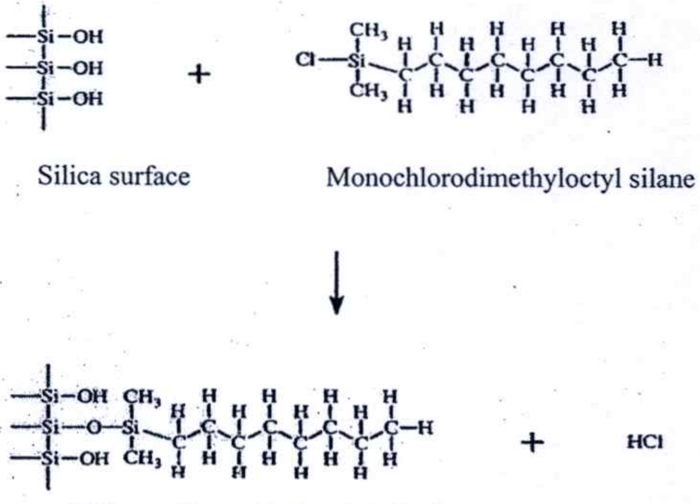
ตารางที่ 2.2 แสดงปฏิกิริยาเคมีของการสร้างพันธะระหว่างซิลิกากับสารเคมีชนิดต่างๆ [8]

Reaction type	Reaction	Surface
1) Esterification	$Si\text{-}OH + R\text{-}OH \rightarrow Si\text{-}OR + H_2O$	Si-O-C
2) Chlorination	$Si\text{-}OH + SO_2Cl_2 \rightarrow Si\text{-}Cl + SO_2 + HCl$ a) $Si\text{-}Cl + BrMgR \rightarrow Si\text{-}R + MgClBr$ b) $Si\text{-}Cl + Li\text{-}R \rightarrow Si\text{-}R + LiC$	Si-C
3) Organosilanizion	a) $Si\text{-}OH + X\text{-}SiR'_2R \rightarrow Si\text{-}O\text{-}SiR'_2R + HX$ b) $Si\text{-}OH + X_3\text{-}Si\text{-}R \rightarrow Si\text{-}O\text{-}Si(OY)_2\text{-}R + 3HX$ Y = Si, H	Si-O-Si-C



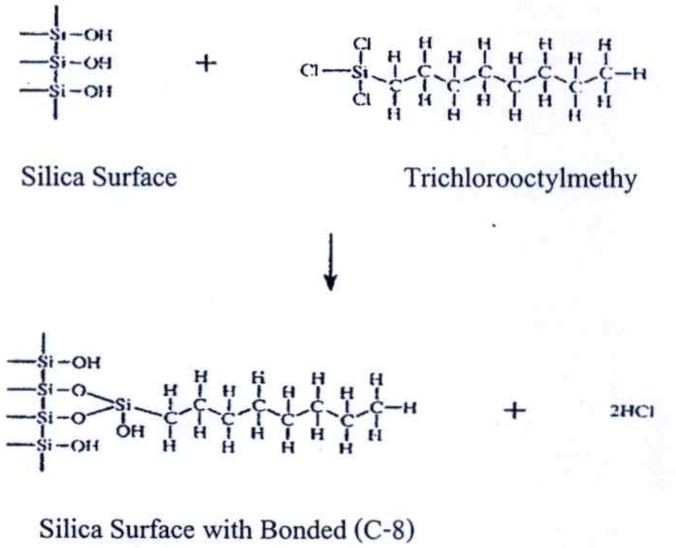
รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะการสร้างพันธะบนพื้นผิวหน้าซิลิกา ซึ่งมีด้วยกัน 2 แบบ (ก) สร้างแบบโมโนเมอร์ริกเฟส (monomeric phase) และ(ข) สร้างแบบพอลิเมอร์ริกเฟส (polymeric phase) [8]

ลักษณะโมโนเมอร์ริกเฟส คือ สารออร์แกโนคลอโรไซเลนจะสร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซีของ ไซลานอลบนซิลิกาเพียงหมู่เดียว ดังแสดงในรูปที่ 2.9



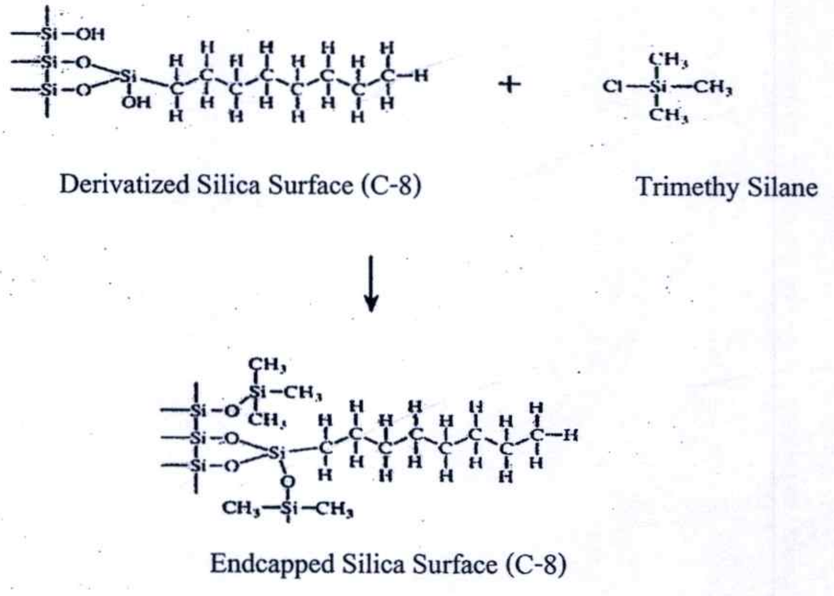
รูปที่ 2.9 แสดงการสร้างพันธะแบบโมโนเมอร์ริกเฟส [7]

ขณะที่การสร้างแบบพอลิเมอร์ริกเฟส หมู่ไฮดรอกซีของซิลิคอนสองหมู่จะสร้างพันธะไทรคลอโรออร์แกโนไซเลน ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ซึ่งการสร้างพันธะแบบนี้จะมีค่าคงตัวมากกว่าการสร้างพันธะแบบโมโนเมอร์ริกเฟส เนื่องจากมีการสร้างพันธะมากกว่า



รูปที่ 2.10 แสดงการสร้างพันธะแบบพอลิเมอร์เฟส [7]

แต่หมู่ไฮดรอกซีบนผิวซิลิกาไม่สามารถสร้างพันธะได้ทั้งหมด ทำให้เหลือหมู่ไฮดรอกซีบางหมู่ จึงต้องทำการปิดปลาย (end capped) เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่วิเคราะห์กับหมู่ไซลานอลบนผิวซิลิกา ปฏิกิริยาการปิดปลายที่หมู่ไซลานอลที่เหลือทำโดยใช้สารไทรเมทิลคลอโรไซเลน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังในรูปที่ 2.11 ทำให้ซิลิกาที่ผิวหน้ามีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ

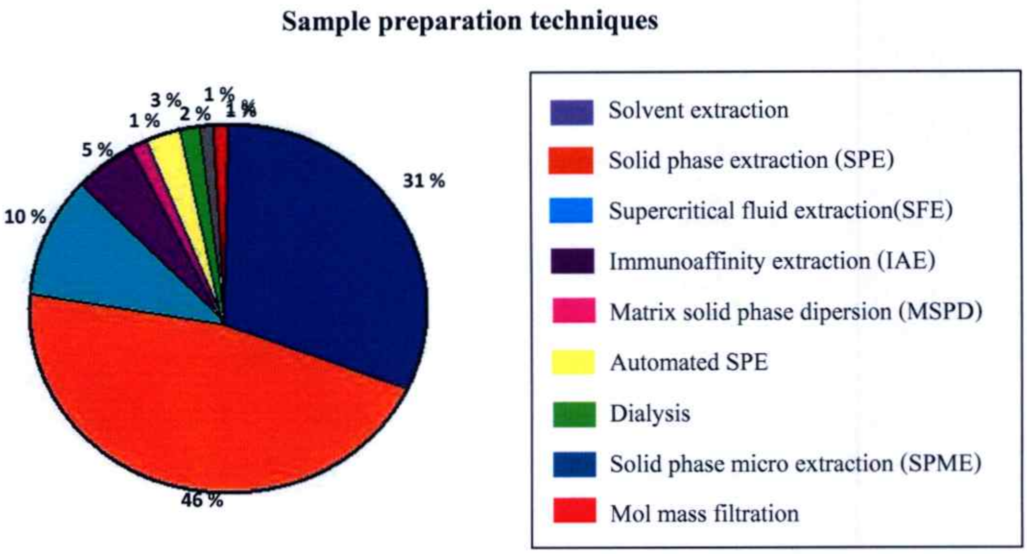


รูปที่ 2.11 แสดงการปิดปลายบนไซลานอลอิสระด้วยไทรเมทิลไซเลน (trimethylsilane) บนสารดูดซับชนิด C8 [7]

2.2 วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction)

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างมีมาตั้งแต่ก่อนปี ค.ศ.1968 และเริ่มมีการใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งในปี ค.ศ.1970 ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม จึงได้มีการพัฒนาสารดูดซับและอุปกรณ์ให้ใช้งานได้สะดวกและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในเดือนตุลาคมปี ค.ศ.1977 เริ่มมีการใช้สารดูดซับชนิดซิลิกาที่มีการสร้างพันธะและใช้มากในทางโครมาโทกราฟี ในปี ค.ศ.1989 เริ่มมีการพัฒนาอัดตัวดูดซับให้เป็นแผ่นบาง (disk) หรือบางครั้งอาจเรียกว่าเมมเบรน (membranes) มาใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง ซึ่งแผ่นบางจะทำจากเทฟลอนหรือกระดาษใยแก้ว

วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase extraction, SPE) เป็นวิธีการสกัดที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถแยกสารวิเคราะห์ออกจากสารปนเปื้อนได้และช่วยปรับเพิ่มความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญเพื่อให้ได้ค่าคืนกลับที่สูงที่ระดับความเข้มข้นต่ำ มีการรายงานพบว่า [7] มีการใช้หลายวิธีการนำมาเตรียมสารตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 เทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ ในการวิเคราะห์ยา [10]

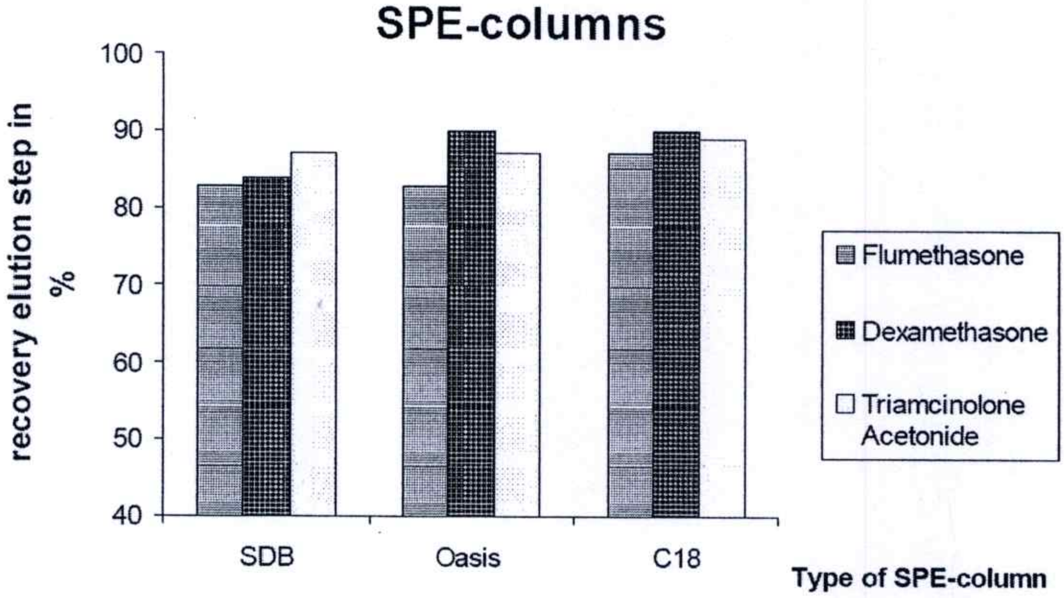
จากภาพแสดงให้เห็นว่าในการสกัดสารด้วยตัวทำละลายและวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมมากถึง 31.0% และ 46.0% ตามลำดับ ส่วนวิธีการอื่นๆ ไม่ค่อยเป็นที่นิยมมากนัก ตั้งแต่ปี ค.ศ.1970 เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งจัดว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารวิเคราะห์จากตัวอย่างผสม สามารถใช้เตรียมตัวอย่างหลายชนิดและใช้ปริมาณตัวทำ

ละลายน้อย อีกทั้งวิธีการจะช่วยทางสิ่งแวดล้อมไม่ให้มีการใช้ตัวทำละลายที่มากเกินไปเหมือนวิธีการการสกัดด้วยเฟสของเหลว (liquid-liquid extraction)

นอกจากนี้การสกัดด้วยเฟสของแข็งเป็นวิธีการที่ให้ผลแม่นยำและเที่ยงตรง สามารถเตรียมตัวอย่างได้หลายชนิด เช่น ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ, เลือด, ยาหรืออาหาร เป็นต้น เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว โดยมีสารดูดซับเป็นเฟสของแข็ง ซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญในการแยกสาร มีทั้งชนิดที่เป็นคอลัมน์หรือคาร์ทริดจ์ (cartridge) และแผ่นบาง (disk) การเลือกใช้ชนิดสารดูดซับจะขึ้นกับสารประกอบที่ทำการวิเคราะห์

การสกัดจะอาศัยหลักการที่สารตัวอย่างในสถานะของเหลวไหลผ่านสารดูดซับที่เป็นของแข็ง และถูกจับไว้ที่สารดูดซับ ซึ่งขั้นตอนการทำงานจะประกอบด้วยกัน 4 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเตรียมคอลัมน์ (column preparation), ขั้นตอนการผ่านสารตัวอย่าง (sample loading), ขั้นตอนการล้างคอลัมน์ (column postwash) และขั้นตอนการชะสารตัวอย่าง (sample desorption) ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้จะช่วยในการกำจัดสารปนเปื้อนและปรับเพิ่มความเข้มข้นให้กับวิเคราะห์ สารดูดซับที่นำมาใช้จะต้องมีพื้นที่ผิวที่มาก สามารถยึดจับสารวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี มีความคงตัวต่อตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารตัวอย่าง อีกทั้งต้องมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่ดีกับสารตัวอย่าง

โดยทั่วไปแล้วจะนิยมใช้ซิลิกาเป็นสารดูดซับและอาจมีการสร้างพันธะเพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารได้กว้างขวางยิ่งขึ้น ในระบบเฟสย้อนกลับ (reversed phase) กลุ่มไซลานอลบนซิลิกาจะทำงานได้ขึ้นอยู่กับสารที่สร้างพันธะ เช่น คอลัมน์ที่ผลิตจากพอลิเมอร์ ที่นิยมใช้มากเป็นพวกโคพอลิเมอร์ คือ polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) จะให้ค่าคงตัวพีเอชที่กว้าง มีความยืดหยุ่นในการจับสาร ซึ่งส่งผลให้ดึงสารออกได้ง่ายและจับสารได้มาก แต่มีข้อเสีย คือ เมื่อสกัดสารที่ความเข้มข้นสูงจะเกิดการบวมของพอลิเมอร์และให้ค่าคืนกลับที่ต่ำกว่าสารดูดซับซิลิกา C18 ดังแสดงในรูปที่ 2.13 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารดูดซับสามชนิด โดยสองชนิดแรกเป็นสารดูดซับที่ทำจากพอลิเมอร์ คือ สเตียรีนไดไวนิลเบนซิน (styrene-divinylbenzene, SDB) ของ J.T Baker และโอเอซิส (Oasis) ของ Waters Chromatography ตามลำดับ และสารดูดซับชนิดที่สามเป็นซิลิกา C18 ทดสอบค่าร้อยละคืนกลับสารสามชนิด คือ ฟูเมทาโซน (flumethasone), ดิซาเมทาโซน (dexamethasone) และไทรแอมซิโนโลน อะซิโทไนต์ (triamcinolone acetonide) พบว่าซิลิกา C18 ให้ร้อยละการคืนกลับที่สูงกว่าชนิดสารดูดซับพอลิเมอร์

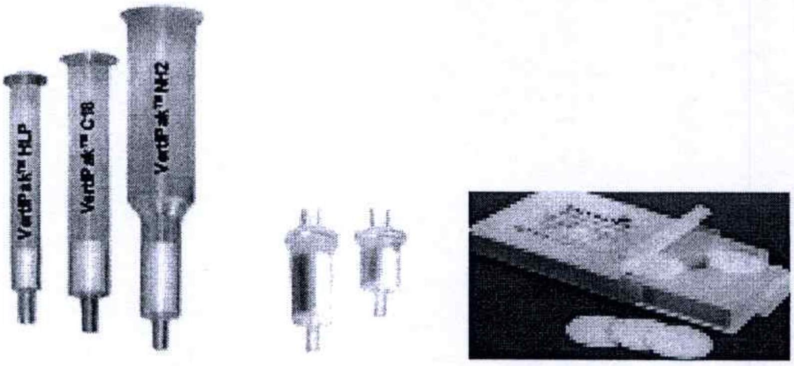


รูปที่ 2.13 แสดงร้อยละค่าคืนกลับของสารดูดซับสามชนิด (SDB, Oasis และซิลิกา C18) [10]

2.2.1 หลักการของวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

หลักการของวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งมีหลักการทำงานหรือกลไกในการแยกสารคล้ายกับเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลว-ของเหลว (Liquid-Liquid Chromatography) โดยสารดูดซับที่ใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งเป็นชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในคอลัมน์สำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph, HPLC) ดังนั้น สารดูดซับหรือเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่จะมีสภาพขั้วที่ต่างกัน เช่น สารดูดซับที่มีขั้วจะต้องเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ไม่มีขั้ว สารประกอบที่มีขั้วจะถูกยึดจับกับสารดูดซับ แต่ถ้าสารดูดซับมีสภาพไม่มีขั้ว เฟสเคลื่อนที่ต้องมีขั้ว สารประกอบมีขั้วจะถูกชะออกมาอย่างรวดเร็ว เป็นต้น ซึ่งมีทั้งการสกัดแบบเฟสย้อนกลับ (reverse phase), แบบเฟสปกติ (normal phase), แลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange) และคัดแยกตามขนาด (Size Exclusion) แต่ขนาดของสารดูดซับที่ใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง โดยทั่วไปมีขนาดอนุภาคตั้งแต่ 40.0-100.0 μm และขนาดรูพรุน 50-500 A° ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (3.0-10.0 μm)

วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง สารดูดซับจะถูกบรรจุใน 3 ลักษณะ คือ บรรจุในกระบอกฉีดยา (syring barral), บรรจุเป็นคาร์ทริดจ์ (cartridge) และอัดเป็นแผ่นบาง (disk) เหมือนกับแผ่นเมนเบรน (membrane) ดังแสดงในรูปที่ 2.14



ก. ข. ค.

รูปที่ 2.14 ชนิดของอุปกรณ์ ก. ชนิดบรรจุในกระบอกฉีดยา (syring barral), ข. ชนิดบรรจุเป็นคาร์ทริดจ์ (cartridge) และ ค. ชนิดอัดเป็นแผ่นบาง (disk) [11]

เมื่อผ่านตัวอย่างไปยังสารดูดซับ สารที่เราต้องการวิเคราะห์ที่มีอยู่ในตัวอย่างจะถูกดูดซับ ในขณะที่สารปนเปื้อนบางชนิดอาจจะถูกดูดซับไว้ด้วย และบางชนิดอาจจะถูกปล่อยทิ้งไป หลังจากนั้นใช้ตัวทำละลายที่ชะสารปนเปื้อนที่ถูกดูดซับออกก่อน และตามด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับชะสารที่เราต้องการวิเคราะห์ออกมา

ดังนั้นในการชะจะเริ่มจากใช้ตัวทำละลายที่ความแรงในการชะสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้น้อยก่อน จึงค่อยๆ เพิ่มเป็นตัวทำละลายที่มีความแรงในการชะสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้สูง ตัวอย่างเช่น วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งที่เป็นระบบเฟสย้อนกลับ สารดูดซับจะเป็นสารที่ไม่มีขั้ว จะเลือกใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ และเลือกสารมีขั้วเป็นสารชะ ซึ่งเลือกใช้น้ำเป็นสารชะตัวแรก จากนั้นตามด้วยเมทานอลหรืออะซิโตนซึ่งมีความแรงในการชะเพิ่มขึ้นเป็นสารชะต่อจากน้ำ เป็นต้น จะเห็นว่า วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งจะดูดซับกลุ่มสารมิใช้เฉพาะโมเลกุลของสารเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงมีการนำวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งไปใช้เป็นขั้นตอนแรกในการแยกสารปนเปื้อนออก เพื่อปรับเพิ่มความเข้มข้นก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ ต่อไป

กลไกการทำงานของการสกัดด้วยเฟสของแข็งมีด้วยกัน 4 ขั้นตอน คือ

1) ขั้นตอนการปรับสภาพของสารดูดซับ

เป็นขั้นตอนแรกในการเตรียมสารดูดซับให้พร้อมใช้งาน โดยผ่านตัวทำละลายไปยังสารดูดซับ เพื่อปรับสภาวะและกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อยู่ในสารดูดซับ รวมทั้งช่วยในการไล่อากาศออกจากคอลัมน์ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดช่องว่าง ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารดูดซับ โดยทั่วไปแล้วตัวทำละลายที่นิยมเลือกใช้ คือ เมทานอล แล้วจึงตามด้วยน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ โดยจะช่วยกระตุ้นกลไกการทำงานของสารดูดซับให้พร้อมที่จะรับสารตัวอย่าง ซึ่งถ้าสารดูดซับแห้งระหว่างการปรับสภาพจะต้องเริ่มต้นการปรับสภาพใหม่อีกครั้ง เนื่องจากสารดูดซับจะไม่มีประสิทธิภาพการทำงานเพียงพอและให้ค่าคืนกลับสารวิเคราะห์ต่ำ

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

นอกจากนี้ ในขั้นตอนการปรับสภาพสารดูดซับอาจเพิ่มการทำความสะอาดสารดูดซับมากขึ้น โดยใช้ตัวทำละลายตัวอย่างชะผ่านหลังจากปรับสภาพด้วยเมทานอล แล้วจึงตามด้วยเมทานอลและน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์อีกครั้ง เพื่อกำจัดสารปนเปื้อนออกจากสารดูดซับ ซึ่งจะทำให้สารดูดซับมีความสะอาดมากขึ้น

2) ขั้นตอนการผ่านสารตัวอย่างหรือสารวิเคราะห์

เป็นขั้นตอนที่สารตัวอย่างจะถูกดูดซับอยู่บนสารดูดซับ โดยกลไกการจับสารจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง, ปริมาณสารตัวอย่าง, ชนิดของเฟสอยู่กับที่, แรงดึงดูดระหว่างเฟสรวมทั้งปั๊มและระบบเครื่องมือ

กลไกการจับสารจะรวมถึงแรงวันเดอร์วาลส์ (Van der Waals (non-polar, hydrophobic, partition)), พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond), แรงไดโพล–ไดโพล (dipole-dipole), การแยกขนาด (size exclusion) และการแลกเปลี่ยนไอออนบวก–ไอออนลบ (cation-anion exchange) ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้จะทำให้สารวิเคราะห์และสารปนเปื้อนบางส่วนถูกจับอยู่กับสารดูดซับ

3) ขั้นตอนการชะสารปนเปื้อนออกจากคอลัมน์

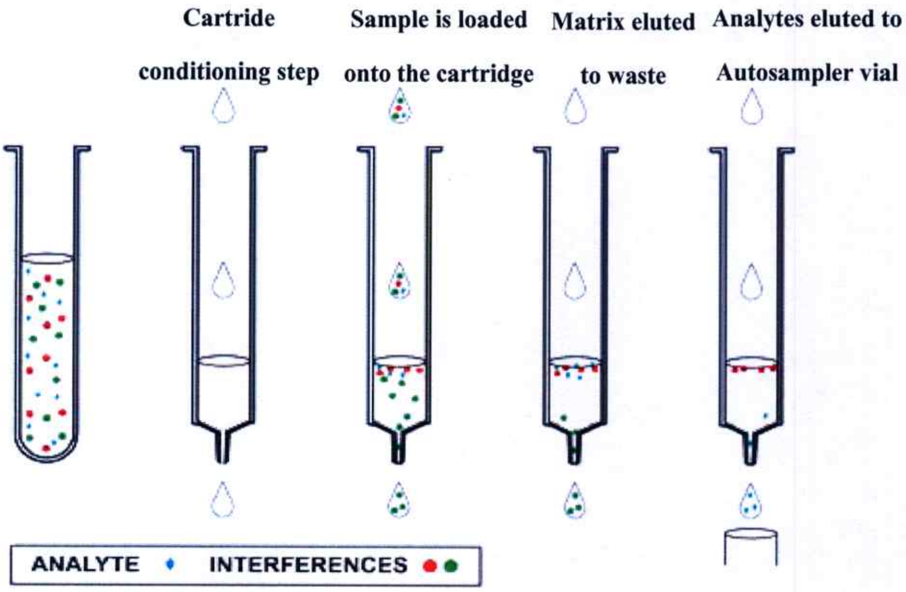
ขั้นตอนนี้จะชะสารที่ไม่ต้องการออกจากคอลัมน์เหลือเพียงสารวิเคราะห์ที่ต้องการเท่านั้น โดยขั้นตอนนี้จะใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีความแรงพอในการชะสารวิเคราะห์ออกจากสารดูดซับ เพราะอาจจะทำให้สารวิเคราะห์ไหลออกมาพร้อมกับสารปนเปื้อน

4) ขั้นตอนการชะสารวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์

เป็นขั้นตอนสุดท้ายในการสกัดตัวอย่าง โดยขั้นตอนนี้จะต้องเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีความจำเพาะกับสารวิเคราะห์และสารดูดซับในคอลัมน์ ทำให้สามารถดึงสารวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์ได้ ซึ่งขั้นตอนนี้จะต่างจากขั้นตอนที่ 3 คือ จะชะเพียงสารวิเคราะห์เท่านั้น แต่สารปนเปื้อนจะถูกจับกับคอลัมน์

กระบวนการพื้นฐานของวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง ตั้งแต่ขั้นตอนการปรับสภาวะคอลัมน์จนถึงขั้นตอนการชะสารวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 2.15 ซึ่งสารวิเคราะห์และสารปนเปื้อนจะถูกจับไว้ในคอลัมน์และมีการชะออกโดยตัวทำละลาย

87872



รูปที่ 2.15 ขั้นตอนการทำงานการสกัดด้วยเฟสของแข็ง [12]

2.2.2 วิธีการใช้งานการสกัดด้วยเฟสของแข็งในแต่ละระบบ [13]

2.2.2.1 ระบบเฟสย้อนกลับ(reversed phase)

1. การปรับสภาวะ

A. ล้าง packing bed ด้วยเมทานอล

B. ล้าง packing bed ด้วยน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์

ต้องระวังไม่ให้ packing bed แห้งก่อนผ่านสารตัวอย่าง

2. การผ่านสารตัวอย่าง

ผ่านสารตัวอย่างบน packing bed โดยใช้อัตราการไหลผ่านประมาณ 1.00-5.00 mL/min เพื่อให้สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาจับอยู่บน packing bed

3. ขั้นตอนการล้าง

ชะสารบางส่วนที่มีแรงในการจับน้อยหรือสารปนเปื้อนที่ไม่ต้องการด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว

4. ขั้นตอนการชะ

ใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เพื่อชะสารวิเคราะห์

2.2.2.2 ระบบเฟสปกติ (normal phase)

1. การปรับสภาวะ

ล้าง packing bed ด้วยตัวทำละลายไม่มีขั้ว ต้องระวังไม่ให้ packing bed แห้งก่อนผ่านสารตัวอย่าง

2. การผ่านสารตัวอย่าง

ผ่านสารตัวอย่างบน packing bed โดยใช้อัตราการไหลผ่านประมาณ 1.00-5.00 mL/min เพื่อให้สารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์จับอยู่บน packing bed

3. ขั้นตอนการล้าง

ชะสารบางส่วนที่มีแรงในการจับน้อยหรือสารปนเปื้อนที่ไม่ต้องการด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว

4. ขั้นตอนการชะ

ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว เพื่อชะสารวิเคราะห์

2.2.2.3 ระบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchanges)

1. การปรับสภาวะ

ล้าง packing bed ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนต่ำประมาณ 0.001-0.010 โมลาร์

2. การผ่านสารตัวอย่าง

ผ่านสารตัวอย่างบน packing bed โดยใช้อัตราการไหลผ่านประมาณ 1.00-2.00 mL/min เพื่อให้สารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์จับอยู่บน packing bed

3. ขั้นตอนการล้าง

ชะสารบางส่วนที่มีแรงในการจับน้อยหรือสารปนเปื้อนที่ไม่ต้องการด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนต่ำ

4. ขั้นตอนการชะ

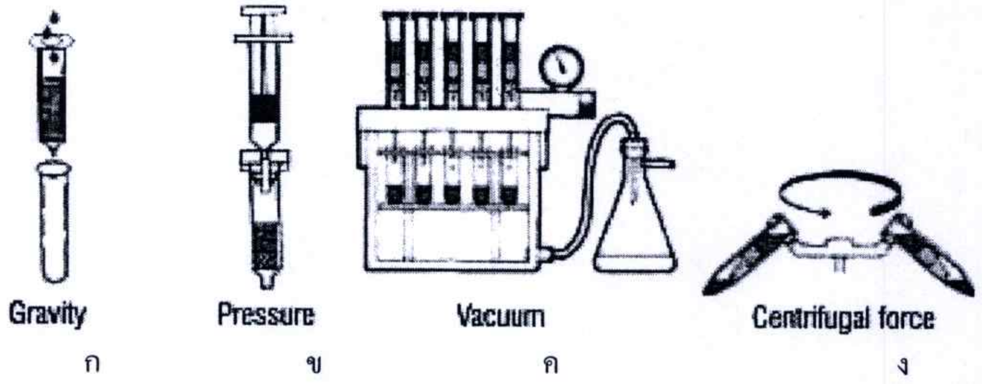
ชะด้วยสารละลายที่มีความเข้มข้นเกลือสูงประมาณ 0.10-0.50 โมลาร์ หรือใช้สารละลายพีเอชบัฟเฟอร์

2.2.3 ระบบการไหลผ่านคอลัมน์ SPE-C18

สารดูดซับของคอลัมน์ SPE ส่วนมากจะมีขนาดอนุภาคตั้งแต่ 63.0-125.0 μm โดยแรงในการไหลแต่ละระบบจะต้องเหมาะสม ไม่เร็วมากเกินไป เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับลดลง วิธีการผ่านสารละลายลงในคอลัมน์ SPE สามารถทำได้ทั้งในระบบอัตโนมัติและแรงดัน เช่น การหมุนเหวี่ยง (centrifugal) หรือใช้แรงดัน (pressure) เป็นต้น ในบางระบบที่มีการใช้คอลัมน์ SPE จำนวนมากอาจต่อเข้ากับปั๊มสูญญากาศ (vacuum) การใช้คอลัมน์ SPE ดังแสดงในรูปที่ 2.16

ระบบการไหลผ่านของของเหลวผ่านสารดูดซับทำได้หลายลักษณะ เช่น

1) โดยแรงดึงดูดโลก
2) โดยแรงดันด้วยเข็มฉีดยา
3) ปั๊มในระบบสูญญากาศ
4) เครื่องเหวี่ยง



รูปที่ 2.16 แรงและเทคนิคในการไหลสารของกระบวนการการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (ก.โดยแรงดึงดูดโลก, ข.โดยแรงดันด้วยเข็มฉีดยา, ค.ปั้มในระบบสุญญากาศ, ง.เครื่องเหวี่ยง) [14]

2.2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

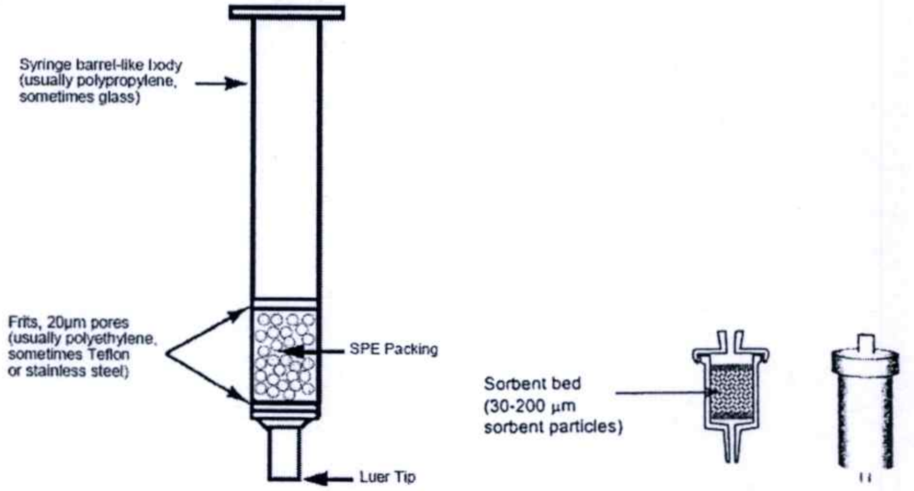
สารดูดซับที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็งในเชิงพาณิชย์ถูกบรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์ 3 ลักษณะ โดยส่วนใหญ่จะเป็นแบบคาร์ทริดจ์ (cartridge) หรือหลอดไซริงจ์ (syringe barelle) และอีกลักษณะเป็นแผ่นบาง (disk)

1) หลอดไซริงจ์ (syringe barelle)

สารดูดซับจะถูกบรรจุอยู่ในกระบอกฉีดยาประมาณ 1 ใน 3 ของขนาดกระบอกฉีดยา ดังแสดงในรูปที่ 2.17 โดยสารดูดซับจะถูกปิดด้านล่างและด้านบนด้วยแผ่นฟริตโพลีเอทิลลีน หลอดไซริงจ์มีขนาดบรรจุปริมาณสารละลายตั้งแต่ 1.00-25.00 mL และบรรจุสารดูดซับได้ตั้งแต่ 0.0500 ถึง 10.0000 g ดังนั้นหลอดไซริงจ์จึงมีด้วยกันหลายขนาด ตามปริมาณที่รับสารละลายและปริมาณสารดูดซับ

2) แบบคาร์ทริดจ์ (Cartridges)

บางครั้งเรียกกันว่า คอลัมน์ ซึ่งจะมีการบรรจุคล้ายหลอดไซริงจ์ คือ มีแผ่นฟริตโพลีเอทิลลีนปิดด้านบนและด้านล่างของสารดูดซับ และบรรจุในหลอดฉีดยาขนาดเล็ก ดังแสดงในรูป 2.17 แต่ขนาดของบรรจุภัณฑ์จะมีขนาดเล็กกว่าหลอดไซริงจ์ สามารถบรรจุสารดูดซับได้ตั้งแต่ 0.1000 ถึง 1.0000 g



(ก) (ข)

รูปที่ 2.17 อุปกรณ์คอลัมน์ SPE (ก) หลอดไซริงจ์ (ข) คาร์ทริดจ์ [11]

คอลัมน์ SPE ประกอบด้วยส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ

- polypropylene tubes
- porous polyethylene frits
- sorbents และ/หรือ stationary phases

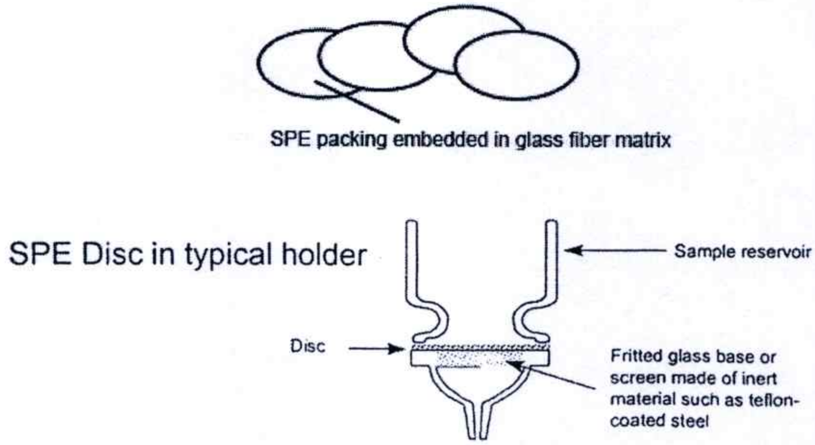
ปิดด้านบนและด้านล่างของสารดูดซับจะถูกปิดด้วยแผ่นฟริตโพลีเอทิลีนที่มีรูพรุน (porous polyethylene frits) ดังแสดงในรูปที่ 2.17 เพื่อไม่ให้สารดูดซับหลุดออกจากคอลัมน์ ส่วนมากจะเป็นชนิด พอลิเอทิลีน (polyethylene) นอกจากนี้ยังมีชนิดที่เป็นเทฟลอน (Teflon) และส่วนที่เหลือว่างของกระบอกฉีดยาจะใช้เพื่อรับสารตัวอย่างหรือตัวทำละลาย ขนาดของคอลัมน์ SPE จะมีด้วยกันหลายขนาดขึ้นอยู่กับปริมาณสารดูดซับที่บรรจุ โดยปริมาณของสารดูดซับที่ใช้จะขึ้นอยู่กับมวลสารวิเคราะห์ที่สกัดหรือสารปนเปื้อนในตัวอย่าง เฉลี่ยแล้วน้ำหนักสารวิเคราะห์ที่ถูกดูดซับจะมีประมาณไม่เกิน 5.0% ของน้ำหนักสารดูดซับ ดังนั้นปริมาณของสารดูดซับที่ใช้จะมีตั้งแต่ 1.0000 ถึง 10.0000 g หรืออาจมากกว่านั้น คอลัมน์ขนาดเล็กจะมีปริมาณสารดูดซับน้อยมากเป็นมิลลิกรัม ซึ่งใช้เวลาในการสกัดนานเป็นชั่วโมงหรือมากกว่านั้น ขณะที่คอลัมน์ขนาดใหญ่ซึ่งมีสารดูดซับปริมาณมากในหน่วยกรัม จะใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่าประมาณ 20.00 นาที หรือน้อยกว่านั้น แต่ใช้ปริมาณของตัวทำละลายที่มากกว่าคอลัมน์ขนาดเล็ก

3) แบบแผ่นบาง (Disk)

แบบแผ่นบางเป็นสารดูดซับที่ถูกอัดเป็นแผ่นบาง (disk) เหมือนเมมเบรน ชนิดของแผ่นบางที่ใช้มีด้วยกัน 3 ชนิด ชนิดแรกจะเป็น porous disk ที่ใช้ปิดระหว่างสารดูดซับ ชนิดที่สองเป็น

แบบใช้กับสารดูดซับชนิดพอลิเมอร์ และชนิดสุดท้ายใช้กับสารดูดซับที่เป็นใยแก้วหรือใยกระดาษ ซึ่งการเลือกใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารดูดซับ

แผ่นบางจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 4.0-90.0 mm นำมาบรรจุลงในเข็มฉีดยา จะเรียกว่า disk cartridge ดังแสดงในรูปที่ 2.18 ซึ่งแผ่นบางจะมีขนาดที่บางและกว้างเท่ากับกระบอกฉีดยา จะใช้ในกรณีที่มวลของสารดูดซับน้อยมาก จึงทำให้สารไหลผ่านได้เร็ว แต่ถ้าอนุภาคสารดูดซับมีขนาดใหญ่อาจต้องใช้ขนาดแผ่นบางที่กว้างขึ้น โดยประโยชน์หลักของแผ่นบางคือ ทำให้ขั้นตอนในการสกัดเร็วขึ้นต่อหน่วยมวลของสารดูดซับ ทำให้สามารถสกัดตัวอย่างได้เป็นจำนวนร้อยหรือพันตัวอย่างต่อสัปดาห์



รูปที่ 2.18 แบบแผ่นบาง [11]

2.2.5 กลไกการทำงานของระบบการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

การที่สารประกอบจะถูกจับไว้บนสารดูดซับหรืออนุภาคในคอลัมน์จะขึ้นอยู่กับแรงที่เกิดขึ้นระหว่างสารวิเคราะห์กับสารดูดซับ แรงที่เกิดขึ้นระหว่างอนุภาค ได้แก่

1) แรงวันเดอร์วาลส์ (Van der Waals) เป็นแรงดึงดูดที่เกิดขึ้นระหว่างสารไม่มีขั้ว
2) แรงไดโพล – ไดโพล (dipole - dipole) เป็นแรงดึงดูดที่เกิดขึ้นระหว่างสารมีขั้ว
3) แรงพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen - bridge bonding) และ
4) แรงไฟฟ้าสถิต (Electrostatic) เป็นแรงดึงดูดที่เกิดขึ้นไอออน

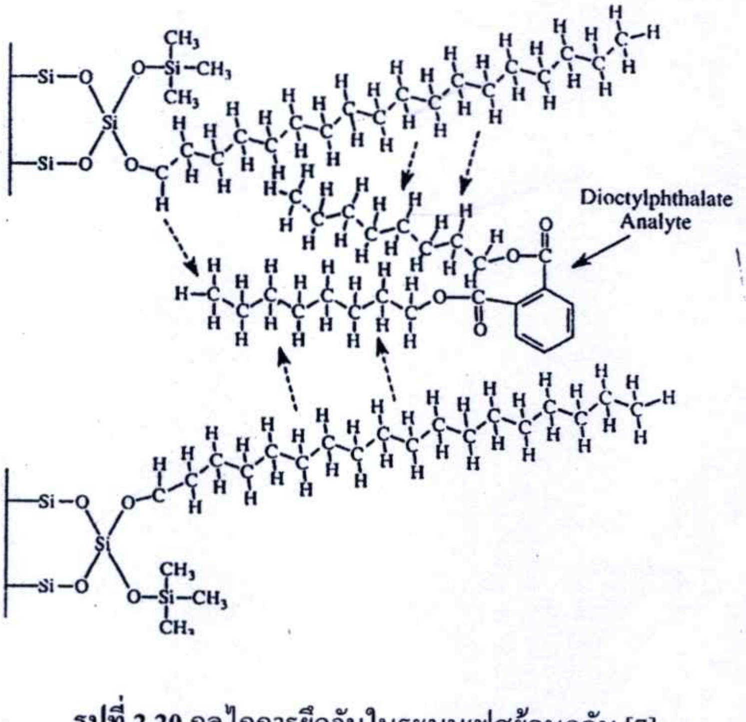
แรงปฏิกิริยาต่างๆ เหล่านี้ทำให้เกิดการกระจายและการดูดซับเพื่อให้เกิดกลไกการแยกเหมือนในระบบโครมาโทกราฟี ซึ่งมีทั้งระบบโครมาโทกราฟีแบบปกติ, ระบบโครมาโทกราฟีแบบย้อนกลับ, ระบบโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนและระบบโครมาโทกราฟีแบบแยกขนาด

2.2.5.1 ระบบเฟสย้อนกลับ(Reversed phase)

ในระบบเฟสย้อนกลับ ตามทฤษฎีของ Horvath-Sinanoglu เฟสอยู่กับที่เป็นสารไม่มีขั้ว เกิดจากใช้ซิลิกาเป็นของแข็งยึดเกาะมาสร้างพันธะกับสารอินทรีย์ เช่น C2, C8 หรือ C18 เป็นต้น เนื่องจากกลุ่มไซลานอลบนผิวหน้าของซิลิกาจะมีคุณสมบัติชอบน้ำ ซึ่งจะสร้างพันธะกับสารอินทรีย์ ดังแสดงในรูปที่ 2.19

รูปที่ 2.19 ปฏิกิริยาไซลาไนเซชั่น (silanisation) ของซิลิกา [15]

ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นสารมีขั้ว ดังนั้นสารวิเคราะห์ที่ไม่มีขั้วสูงจะมีผลในการยึดจับต่อผิวหน้าในคอลัมน์มาก ดังแสดงในรูปที่ 2.20 สารวิเคราะห์ที่ไม่มีขั้วจะถูกจับไว้ที่เฟสอยู่กับที่อย่างแรง ประเภทสารที่วิเคราะห์ ได้แก่ หมู่อะโรมาติก (aromatic) หรืออะลิฟาติกเอมีน (aliphatic amines) เช่น อัลเคน, ฮาโลเจน, เอมีนและกรดคาร์บอกซิลิก เป็นต้น



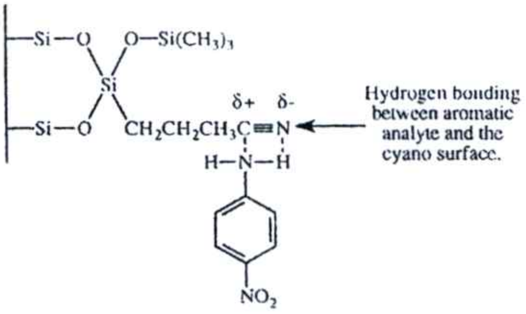
รูปที่ 2.20 กลไกการยึดจับในระบบเฟสย้อนกลับ [7]

แรงยึดจับสารวิเคราะห์ในระบบเฟสย้อนกลับเป็นแรงระหว่างพันธะคาร์บอนและไฮโดรเจนระหว่างสารวิเคราะห์กับพื้นผิวซิลิกา ชนิดคอลัมน์ในระบบนี้ ได้แก่ C18 และ C8 หรือชนิดที่เป็นพอลิเมอร์ เช่น ENVI-18 และ ENVI-8 ชนิดสารดูดซับที่นิยมใช้ในระบบเฟสย้อนกลับส่วนมากเป็นคาร์บอน 18 ซึ่งโดยแขนของคาร์บอนชนิด C18 จะเป็นโมเลกุลสารที่ไม่มีขั้ว เกิดการเชื่อมต่อระหว่างคาร์บอนและไฮโดรเจนตามแรงวันเดอร์วาลส์ สามารถจับสารประกอบ เช่น กลุ่มสารสีในน้ำผลไม้ สารประกอบไม่มีขั้วในน้ำผลไม้จะถูกยึดจับกับแขนไฮโดรคาร์บอนและสารประกอบมีขั้วจะถูกยึดจับเพียงเล็กน้อยกับส่วนซิลิกาที่มีขั้ว การเลือกใช้ตัวทำละลายจึงต้องใช้สารประกอบที่มีความแรงที่สามารถชะสารออกจากสารดูดซับ โดยจะใช้ตัวทำละลายมีขั้วแยกสารมีขั้วออกมาก่อน จากนั้นใช้ตัวทำละลายไม่มีขั้วหรือมีความแรงในการชะสารวิเคราะห์ เช่น เมทานอลซึ่งมีแรงในการชะมากกว่าน้ำ ซึ่งน้ำมีความเป็นขั้วมากกว่าโดยใช้น้ำเป็นสารชะสารประกอบที่มีขั้วสูงออกมา เช่น ในการแยกสารสีในน้ำผลไม้ จะใช้น้ำเป็นตัวชะสารที่มีขั้ว เช่น น้ำตาล, กรดและสารแต่งกลิ่นออกจากสารดูดซับ และใช้สารละลายแอลกอฮอล์ซึ่งมีความเป็นขั้วน้อยกว่าน้ำชะสารสีที่ต้องการออกจากสารดูดซับ

นอกจากโครงสร้างของสารดูดซับในระบบเฟสย้อนกลับที่นิยมใช้มาก คือ C18 ยังมีชนิดที่เป็น C4, C8 เป็นต้น หรือชนิดที่เป็นพอลิเมอร์ ส่วนใหญ่จะมีค่า carbon loading ประมาณ 5.0–18.0% มีเส้นผ่านศูนย์กลางรูประมาณ 60–125 °A โดยพันธะที่สร้างมีทั้งชนิดที่เป็นโมโนเมอร์ริกหรือพอลิเมอร์ริก ซึ่งถ้าทำการปิดปลายจะทำให้ค่าความจุของสารดูดซับมากขึ้น ถ้าไม่ได้ทำการปิดปลายอาจเกิดปฏิกิริยาอันดับที่สอง (Secondary Interactions) ได้ โดยกลไกการจับสารของวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งที่มีซิลิกาเป็นวัสดุสามารถเกิดปฏิกิริยาอันดับที่สองขึ้นในระบบเฟสย้อนกลับ โดยกลไกการจับสารในอันดับแรกเป็นปฏิกิริยาไม่มีขั้ว แต่เนื่องจากมีอนุภาคซิลิกาเป็นส่วนสำคัญอาจเกิดปฏิกิริยามีขั้วเป็นอันดับที่สองกับไซลานอล โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิบนผิวซิลิกาหรือกลุ่มไซลานอลบนผิวซิลิกา (Si-OH)

2.2.5.2 ระบบเฟสปกติ (Normal phase)

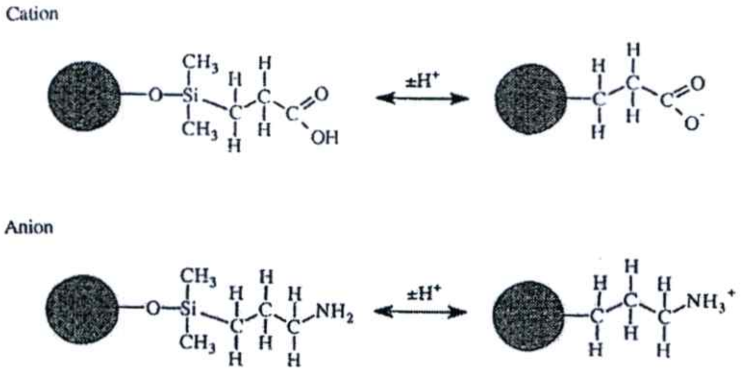
กลไกการดูดซับพื้นฐานในระบบเฟสปกติจะเป็นกลไกดูดซับสารมีขั้ว แรงที่เกิดขึ้นเป็นแรงพันธะไฮโดรเจนและแรงไดโพล-ไดโพล ซึ่งจะสัมพันธ์กับแรงยึดจับระหว่างเฟสอยู่กับที่และสารละลายในเฟสเคลื่อนที่ มีการยึดจับดังแสดงในรูปที่ 2.21



รูปที่ 2.21 กลไกการยึดจับในระบบเฟสปกติ [7]

2.3.5.3 ระบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange phase)

พื้นฐานการแลกไอออนเป็นการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างสองเฟส เป็นปฏิกิริยาระหว่างสารละลายและเฟสของแข็ง ยึดจับไอออนด้วยแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic) โดยกระบวนการจะเกิดการปรับเข้าสู่สมดุล ซึ่งมีระบบไอออนด้วยกันสองแบบ คือ แลกเปลี่ยนไอออนบวกซึ่งจะยึดจับสาร เช่น กรดคาร์บอกซิลิกหรือ กรดซัลโฟนิก เป็นต้น ส่วนอีกระบบเป็นการแลกเปลี่ยนไอออนลบยึดจับสาร เช่น แอมโมเนียม เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.22 แสดงถึงกลไกการทำงานของระบบแลกเปลี่ยนไอออน



รูปที่ 2.22 ระบบแลกเปลี่ยนไอออน [7]

2.2.6 การเลือกชนิดสารดูดซับ

การเลือกใช้สารดูดซับเป็นสิ่งที่สำคัญในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง เนื่องจากสารดูดซับแต่ละชนิดให้ผลในการดูดซับสารประกอบต่างกัน ซึ่งถ้าเลือกสารดูดซับไม่เหมาะสมจะส่งผลให้ดูด

ซับสารวิเคราะห์ได้ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการเลือกใช้สารดูดซับจะขึ้นกับความสามารถในการดูดซับหรือความจำเพาะของสารดูดซับต่อกลุ่มของสารที่ต้องการวิเคราะห์

การพิจารณาเลือกใช้สารดูดซับว่าใช้ในงานวิเคราะห์ระบบใดเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด ปัจจัยการเลือกสารดูดซับมีด้วยกันดังต่อไปนี้

1) ลักษณะทางกายภาพและเคมีของตัวอย่าง

ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เพื่อให้สารวิเคราะห์สามารถถูกจับอยู่กับสารดูดซับได้ดี เช่น ลักษณะความเป็นขั้วของสารวิเคราะห์, กลุ่มฟังก์ชันของสารตัวอย่าง, ความสามารถในการถูกละลาย, น้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น

2) การเลือกจับสาร

มีสองกระบวนการในการสกัดสาร คือ อย่างแรกสารประกอบที่ปนเปื้อนจะต้องถูกจับไว้ที่สารดูดซับและยอมให้สารวิเคราะห์ไหลผ่านได้ ดังนั้นในขั้นตอนนี้สารปนเปื้อนที่ไม่ต้องการจะถูกเลือกจับไว้ในการแยกสารตัวอย่าง ส่วนในกระบวนการที่สองจะตรงกันข้ามกับกระบวนการแรก คือ สารวิเคราะห์จะถูกจับไว้กับสารดูดซับ ขณะที่สารปนเปื้อนจะไหลผ่าน ไม่ถูกจับไว้ โดยถูกชะออกก่อนสารวิเคราะห์ ซึ่งวิธีหลังนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้มากกว่า

3) ชนิดสารดูดซับ

ชนิดสารดูดซับแต่ละชนิดจะให้คุณสมบัติในการเลือกจับที่ต่างกัน ซึ่งควรจะเลือกใช้สารดูดซับที่สามารถแยกโครงสร้างระหว่างสารวิเคราะห์และสารปนเปื้อนตัวอย่างได้มากที่สุด ดังนั้นการเลือกใช้สารดูดซับควรพิจารณาถึงผลในการเลือกจับที่เหมาะสมที่สุด เพื่อให้ได้ค่าคืนกลับที่สูงที่สุด

4) การเลือกขนาดสารดูดซับ

ถ้ามีการใช้ขนาดสารดูดซับที่ไม่เหมาะสมจะทำให้ค่าการคืนกลับของสารตัวอย่างมีค่าต่ำ ซึ่งถ้าขนาดของสารดูดซับที่ใช้ใหญ่เกินไปจะทำให้เกิดการจับสารไว้อย่างแข็งแรงและชะสารวิเคราะห์ออกได้ไม่สมบูรณ์ ขณะที่สารดูดซับที่มีขนาดเล็กเกินไปจะทำให้จับสารวิเคราะห์ได้ไม่สมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้ค่าคืนกลับน้อย ตามกฎทั่วไปแล้วขนาดของสารดูดซับจะต้องสามารถจุสารวิเคราะห์ได้ 1.0-3.0%

5) การเลือกใช้ตัวทำละลายชะสารและสภาวะที่เหมาะสม

ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีความแรงเหมาะสมกับสารดูดซับ โดยทั่วไปแล้วสารดูดซับที่ใช้ในระบบเฟสปกติจะมีความเป็นขั้วมากกว่าตัวทำละลาย ส่วนสารดูดซับในระบบย้อนกลับจะมีความเป็นขั้วน้อยกว่าตัวทำละลาย ในระบบแลกเปลี่ยนไอออนสารดูดซับจะมีความแรงตามความเข้มข้นไอออนและระดับพีเอชสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อควบคุมประจุไอออน

การเลือกตัวละลายที่ใช้ในการชะปนเปื้อนต้องสามารถดึงสารปนเปื้อนออกได้แต่ต้องไม่ชะสารวิเคราะห์ปนออกมาด้วย ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารวิเคราะห์จะต้องแรงพอและสามารถชะสารวิเคราะห์แม้ในปริมาณน้อย (1.00-2.00 mL) ได้อย่างสมบูรณ์

ดังนั้น การเลือกใช้สารดูดซับจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้การสกัดได้ผลที่ดีที่สุด เพราะสารดูดซับแต่ละชนิดจะมีการทำงานแตกต่างกัน ซึ่งการเลือกใช้ต้องพิจารณาสารตัวอย่างที่ทำการสกัด สารดูดซับที่ใช้ในระบบการสกัดด้วยเฟสของแข็งจะคล้ายกับโครมาโทกราฟีแบบของเหลว โดยชนิดของสารดูดซับมีด้วยกับสามชนิด คือ

ก. ระบบเฟสย้อนกลับในระบบนี้จะนิยมใช้สารดูดซับชนิด C18 มากที่สุด นอกจากนี้ มีทั้งชนิด C8, C4, C2, C1 และ Phenyl โดยทั่วไปแล้วสารดูดซับในระบบย้อนกลับจะจับสารประกอบที่มีความแรงขั้วปานกลางจนถึงสารประกอบที่ไม่มีขั้ว ในการปรับสภาวะเริ่มแรกของสารดูดซับระบบนี้จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวแรกแล้วจึงตามด้วยตัวทำละลายน้ำ ในการชะสารประกอบที่มีความเป็นขั้วปานกลางจะต้องใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วปานกลาง ขณะที่สารประกอบที่ไม่มีขั้วต้องใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่าในการชะ

ข. ระบบเฟสปกติ ได้แก่ สารดูดซับที่เป็นซิลิกา, อะมิโนและอะลูมินา เป็นต้น ซึ่งสารดูดซับในระบบเฟสปกติจะจับแยกจับสารประกอบที่มีขั้ว ในการปรับสภาวะจะต้องใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วส่วนในขั้นตอนการชะจะต้องใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าในการชะ

ค. ระบบแลกเปลี่ยนไอออน จะใช้สารดูดซับสองชนิด ชนิดแรกเป็นสารดูดซับแลกเปลี่ยนไอออนลบ (Strong Anion Exchange Resin) และชนิดที่สองเป็นสารดูดซับแลกเปลี่ยนไอออนบวก (Strong Cation Exchange Resin) ขณะสกัดจะเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนลบและไอออนบวกที่ต้องการวิเคราะห์กับไอออนลบและไอออนบวกที่หมู่ฟังก์ชั่นของเรซิน ตามลำดับ

ในการทำงานสารตัวอย่างและสารประกอบจะถูกแยกวัดตามชนิดสารดูดซับที่เหมาะสม โดยสารวิเคราะห์ที่สนใจจะถูกจับไว้ แล้วจึงถูกชะออกภายหลัง เช่น การวิเคราะห์หาสารไม่มีขั้ว ได้แก่ ยาฆ่าแมลงหรือยารักษาโรคในสารตัวอย่างที่มีขั้ว เช่น น้ำหรือยูเรียจะต้องเลือกใช้สารดูดซับในระบบเฟสย้อนกลับซึ่งสารดูดซับชนิด C18 หรือ C8 จะมีคุณสมบัติในการจับสารประกอบที่ไม่มีขั้ว โดยสารประกอบที่มีความเป็นขั้วจะถูกชะออกพร้อมกับตัวทำละลายที่มีขั้ว แล้วจึงใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วชะสารที่วิเคราะห์ ดังนั้น การวิเคราะห์สารจึงจำเป็นต้องเลือกสารดูดซับที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในแยกสารวิเคราะห์ ซึ่งตารางที่ 2.3 จะแสดงถึงชนิดสารดูดซับที่ใช้ในแต่ละระบบ

ตารางที่ 2.3 แสดงแต่ละชนิดสารดูดซับในกระบวนการสกัดด้วยเฟสของแข็ง [7]

Sorbent	Structure	Typical capacity/load
	Reversed phase (nonpolar)	
Octadecyl (C18)	$-(CH_2)_{17}-CH_3$	17% C
Octyl (C8)	$-(CH_2)_7-CH_3$	14% C
Ethyl (C2)	$-CH_2-CH_3$	4.8% C
Cyclohexyl	$-CH_2-CH_2$-Cyclohexyl	12% C
Phenyl	$-CH_2-CH_2-CH_2-(C_6H_5)$	10.6% C
Graphite carbon	Pure carbon	
Copolymers	Styrene/divinylbenzene (PS/DVB)	
	Normal phase (polar)	
Cyano (CN)	$-(CH_2)_3-CN$	10.5% C, 2.4% N
Amino (NH_2)	$-(CH_2)_3-NH_2$	6.4% C, 2.2% N
Diol	$-(CH_2)_3-OCH_2CH(OH)CH_2(OH)$	8.6% C
Silica gel	-SiOH	
Florisil	Mg_2SiO_3	
Alumina	Al_2O_3	
	Ion exchanger	
Amino (NH_2)	$-(CH_2)_3-NH_3^+ Cl^-$	1.6 meq/g
Quaternary amine	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_3^+ Cl^-$	0.7 meq/g
Carboxylic acid	$-(CH_2)_3-COO^- H^+$	0.4 meq/g
Sulfonic acid	$-(CH_2)_3-(C_6H_5)-SO_3^- H^+$	1.0 meq/g
Cation exchanger	PS/DVB-$SO_3^- H^+$	5.2 meq/g
Anion exchanger	PS/DVB-$CH_2-N(CH_3)_3^+ Cl^-$	1.2 meq/g

แต่ละชนิดของสารดูดซับจะให้ผลทำงานที่ต่างกัน เช่น ในระบบเฟสย้อนกลับ (C18, C8, C2) เฟสที่ใช้เป็นแบบไม่มีขั้ว แรงปฏิกิริยาในระบบนี้จะเป็นแรงวันเดอร์วาลส์ สามารถแยกทั้งสารประกอบอะโรมาติกและไม่ใช่สารประกอบอะโรมาติก ใช้ในการสกัดโมเลกุลสารไม่มีขั้วจากสารมีขั้ว โดยปกติแล้วสารดูดซับชนิด C8 จะมีแรงในการยึดจับสารไม่มีขั้วได้น้อยกว่า C18 ขณะที่ชนิด C2 จะมีแรงในการยึดจับได้น้อยที่สุดและชะสารออกได้เร็วโดยใช้ตัวทำละลายน้อย ค่า %carbon loading จะต่างกันแล้วแต่ชนิดสารดูดซับ ซึ่งชนิดสารดูดซับ C2 มีค่าร้อยละ carbon loading น้อยที่สุด ดังนั้น C2 จึงมีแรงยึดจับสารน้อยกว่า C18

ส่วนในระบบเฟสปกติ เช่น สารดูดซับชนิดไซยาโน (Cyano) สามารถแยกได้ทั้งสารประกอบที่มีขั้วและไม่มีขั้ว การทำงานจะเหมือนกับระบบเฟสย้อนกลับคือหลังจากการปรับสภาพแล้วจะสามารถแยกได้ทั้งสารมีขั้วและไม่มีขั้ว แรงที่เกิดเป็นแรงไดโพล (dipole) ระหว่างสารวิเคราะห์กับกลุ่มไนไตรท์ หรือสารดูดซับชนิดอะลูมินาใช้ในการสกัดสารอะลูมินาที่มีขนาดตั้งแต่ 50.0–200.0 μm พื้นผิวของสารดูดซับจะยึดจับอะลูมินัมด้วยแรงพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซี โดยมีพีเอชของผิวหน้าควบคุมการทำงาน หรือชนิดสารดูดซับชนิดไดออล (Diol) จะใช้แยกสารประกอบมีขั้วโดยดึงสารไม่มีขั้วออกจากตัวอย่าง แรงที่เกิดเป็นพันธะไฮโดรเจน หลักการ

ทำงานจะคล้ายกับซิลิกาเจลแต่ให้ผลในการทำงานดีกว่า ส่วนในระบบแลกเปลี่ยนไอออน เช่น กลุ่มอะมิโนสามารถแยกสารมีขั้วหรือแลกเปลี่ยนไอออนที่แรงอ่อน (weak ion exchanger) แรงที่เกิดจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสารประกอบกลุ่ม OH, NH หรือ SH นอกจากสารดูดซับที่กล่าวมานี้ ยังมีชนิดสารดูดซับอื่นอีกในการทำงาน โดยพิจารณาเลือกใช้ตามสารที่ทำการวิเคราะห์

ดังนั้นอิทธิพลการเลือกสารดูดซับจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารตัวอย่างที่ทำการวัด และสารวิเคราะห์ต้องสามารถเกิดแรงปฏิกิริยากับเฟสอยู่กับที่ได้ ชนิดของตัวอย่างจึงเป็นตัวบอกในการเลือกใช้ชนิดของสารดูดซับ ดังนั้น สารวิเคราะห์มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำควรจะเลือกใช้ชนิดสารดูดซับไม่มีขั้ว ส่วนการวิเคราะห์สารมีขั้วควรจะเลือกชนิดสารดูดซับที่มีขั้วและการวิเคราะห์สารไอออนนิกควรจะเลือกชนิดแลกเปลี่ยนไอออน

นอกจากการพิจารณาชนิดของสารดูดซับในเหมาะกับระบบ ยังต้องพิจารณาถึงความแรงในการชะสาร เช่น ถ้าเป็นระบบเฟสย้อนกลับตัวทำละลายที่ใช้ต้องมีความเป็นขั้วปานกลางหรือไม่มีขั้ว ดังแสดงในตารางที่ 2.4 เพื่อชะสารวิเคราะห์ออกจากสารดูดซับซึ่งยึดด้วยแรงเวนเดอร์วาล์ โดยตัวทำละลายที่ใช้จะเข้าไปสร้างพันธะไฮโดรเจนกับไซลานอลอิสระบนพื้นผิวซิลิกาแทนสารวิเคราะห์ ทำให้แรงยึดระหว่างซิลิกากับสารวิเคราะห์หลุดออกจากกัน โดยน้ำจะมีแรงในการชะน้อยที่สุดและเฮกเซนจะมีความแรงในการชะมากที่สุดเพราะมีความไม่มีขั้วมากที่สุด ซึ่งจะตรงข้ามกับในระบบเฟสปกติที่ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว โดยเฮกเซนจะมีความแรงในการชะน้อยที่สุด ขณะที่น้ำมีความแรงในการชะมากที่สุดในระบบ ดังนั้นการเลือกใช้ในแต่ละระบบจะเริ่มจากการใช้ตัวทำละลายที่มีแรงในการชะน้อยจนกระทั่งใช้ตัวทำละลายที่มีแรงในการชะมาก

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบความแรงของตัวทำละลายระหว่างระบบเฟสปกติและระบบเฟสย้อนกลับที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง [13]

Normal Phase	Weak Solvent	**Reversed Phase**
Hexane		Water
Isooctane		Methanol
Toluene		Isopropyl alcohol
Chloroform		Acetonitrile
Methylene chloride		Acetone
Tetrahydrofuran		Ethyl acetate
Ethyl ether		Ethyl ether
Ethyl acetate		Tetrahydrofuran
Acetone		Methylene chloride
Acetonitrile		Chloroform
Isopropyl alcohol		Toluene
Methanol		Isooctane
Water	Strong Solvent	Hexane

2.2.7 การประยุกต์ใช้งาน

วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งเป็นที่นิยมนำมาใช้มากในการสกัดแยกสาร เนื่องจากสามารถแยกสารวิเคราะห์อินทรีย์ออกจากตัวอย่างเหลวโดยจะสกัดสารปนเปื้อนออกจากตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์ที่ราคาพอเหมาะและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารปนเปื้อนในตัวอย่างดีและเร็ว สามารถนำมาใช้ก่อนการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC), โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) หรือเทคนิควิเคราะห์อื่นๆ อีกทั้งสามารถนำมาใช้ในงานต่างๆ มากมาย ทั้งทางยา, เกษตรกรรมและสิ่งแวดล้อม ชนิดของสารดูดซับมีด้วยกันหลายชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด การเลือกชนิดของสารดูดซับจำเป็นต้องพิจารณาเพื่อให้เหมาะสมกับงานวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2.5 แสดงถึงชนิดของสารดูดซับ, ลักษณะพื้นผิวของสารดูดซับและการประยุกต์ใช้งาน

ตารางที่ 2.5 แสดงชนิดของสารดูดซับที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง [7]

สารดูดซับ	ลักษณะพื้นผิว	การประยุกต์ใช้
C18	Hydrophobic, non-polar bonded silica phase	-แยกสาร hydrophobic จากสารละลาย aqueous -ยาหรือเป็ปไทด์ออกจากซีรั่ม พลาสม่า ยูเรีย -สารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ -ยาฆ่าแมลง, ยากำจัดศัตรูพืชในตัวอย่าง -กรดอินทรีย์ในเหล้า, เครื่องดื่ม
C8	Hydrophobic, non-polar bonded silica phase	-แยกสาร hydrophobic แต่จะจับได้น้อยกว่า C18 -ยาหรือเป็ปไทด์ออกจากซีรั่ม พลาสม่า ยูเรีย
Silica	Hydrophilic, polar, slightly basic phase	-แยกสารมีขั้วต่ำถึงมีขั้วปานกลางจาก สารละลาย non-aqueous -ตัวอย่างไขมัน -ยากำจัดศัตรูพืชในอาหาร -วิตามิน A, D, E และ K -สารอินทรีย์สังเคราะห์
Alumina A	Hydrophilic, polar, acidic phase	-แยกสาร hydrophilic จากสารละลาย non-aqueous -น้ำตาล, คาเฟอีนในน้ำโคล่า, วิตามินในน้ำผลไม้ -ยาปฏิชีวินะ -สารผสมในอาหารสัตว์
Alumina N	Hydrophilic, polar, neutral phase	-แยกสาร hydrophilic จากสารละลาย non-aqueous -น้ำมันปิโตรเลี่ยม -สารผสมในอาหารสัตว์ -สารประกอบอินทรีย์
Alumina B	Hydrophilic, polar, basic phase	-แยกสาร hydrophilic จากสารละลาย non-aqueous -ยาฆ่าแมลง, ยากำจัดศัตรูพืช, สารมลภาวะ

ตารางที่ 2.5 แสดงชนิดของสารดูดซับที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (ต่อ)

Accell Plus CM	Hydrophilic, polar, acidic cation exchange phase	-แยกสารไอออนบวกจากสารละลาย non-aqueous และ aqueous -สกัดสารโปรตีน เอนไซม์และ immunoglobulin ในสภาวะด่างอ่อน -สารอินทรีย์สังเคราะห์ -สารสเตอรอยด์
Accell Plus QMA	Hydrophilic, polar, basic anion exchange phase	-แยกสารไอออนลบจากสารละลาย non-aqueous และ aqueous -โปรตีน, เอนไซม์, สารโกลบูลิน, เป็ปไทด์ -แยกสีจากไวด์, น้ำผลไม้ -สารประกอบฟีนอลลิก
Amino Propyl NH2	Hydrophilic, moderately polar slightly basic phase	-น้ำมันปิโตรเลี่ยม -น้ำตาล saccharides -สารประกอลฟีนอลและฟีนอลลิก -สารประกอบสี
Cyano Propyl CN	Hydrophobic, moderately non-polar neutral phase	-ตัวอย่างของเหลวหรือตัวทำละลายอินทรีย์ -ยาในเลือด -ผลิตภัณฑ์หมักเชื้อ -ยาฆ่าแมลง
Diol	Hydrophobic, moder ately non-polar neutral phase	-ตัวอย่างของเหลวหรือตัวทำละลายอินทรีย์ -แร่ธาตุในน้ำ -ยาปฏิชีวนะในเครื่องสำอาง -แยกสาร hydrophobic
DNPH-Silica	Reagent coated	-สาร formaldehyde, aldehydes และ ketones ในอากาศ

2.3 สารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (Tetracycline Hydrochloride)

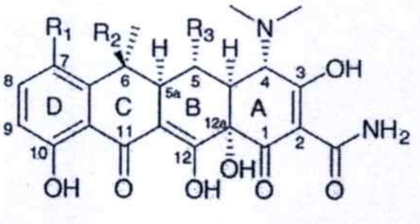
สารกลุ่มเททราซัยคลินเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่มีค่าสเปกตรัมกว้าง มีการนำมาใช้อย่างมากในการต้านเชื้อ สามารถรักษาโรคต่างๆ ได้ แต่ก็มีทั้งข้อดีและข้อเสียในการใช้ยาเช่นกัน

2.3.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

คุณสมบัติทางเคมีของเททราซัยคลินแสดงดังในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติทางเคมีของเททราซัยคลิน

คุณสมบัติทางเคมี	
ชื่อสารเคมี	: (4S,4aS,5aS,6S,12aS)-4-Dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a- pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxonaphthacene-2-Carboxamide
สูตรโมเลกุล	$C_{22}H_{24}N_2O_8$-HCl
น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	480.9
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	214 – 215 ºC
เลขที่ทะเบียน CAS	64-75-5



รูปที่ 2.23 โครงสร้างสารกลุ่มเททราซัยคลิน [16]

เททราซัยคลินจะประกอบด้วยวงแหวนหกเหลี่ยม 4 วงเรียงต่อกัน octahydro-naphthacenes เป็นอนุพันธุ์ของ polycyclic naphthacenecarboxamide โดยยากลุ่มนี้จะผลิตขึ้นจากเชื้อราตระกูล *Streptomyces* ยาที่ค้นพบตัวแรก คือ คลอเททราซัยคลิน (chlortetracycline) ค้นพบในปี ค.ศ.1948 แยกจากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* ต่อมาค้นพบยาออกซีเททราซัยคลิน (oxytetracycline) แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces rimosus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1952 สามารถผลิตยาในรูปกึ่งการสังเคราะห์ได้ โดยดึงอะตอมคลอรีนออกจากสารคลอเททราซัยคลินได้ยาอีกตัว เรียกว่า เททราซัยคลิน

(tetracyclines) แต่อาจมีผลกระทบน้อยกับเชื้อรา เททราซัยคลินในทางการค้ามีด้วยกันสามชื่อ คือ tetracycline, tetracycline hydrochloride และ tetracycline phosphate complex

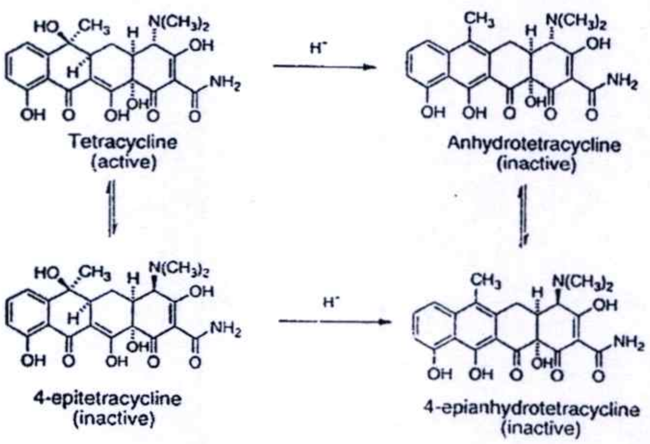
มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น รสขมเล็กน้อย แต่เป็นสีดำเมื่อโดนแสงแดดแรงๆ ในสภาวะอากาศชื้น จะสูญเสียคุณสมบัติในการทำงานเมื่ออยู่ในรูปสารละลายหรือโดยความร้อน ต้องเก็บไว้ในที่ทึบแสงและแห้ง ในรูปที่เป็นสารละลาย ยาอาจเก็บที่อุณหภูมิห้องระหว่างการใช้แต่ในทางการผลิตจะเก็บใช้ไว้เพียง 12.00-24.00 ชั่วโมง จะเกิดการสลายตัว ดังนั้นเมื่อใช้ในช่วงเวลาสั้นๆ ก็จะใช้ในความเข้มข้นน้อยๆ โดยทั่วไปแล้วยากลุ่มเททราซัยคลินในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์มักจะนิยมกินในรูปแคปซูล

สารละลายเททราซัยคลินจะละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอล (ประมาณ 1 ใน 100 ส่วน) เป็นต้น ดังนั้นจึงใช้เป็นสารละลายที่ใช้ในการสกัด ส่วนสารละลายจำพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ สารเททราซัยคลินจะไม่ละลายหรือละลายได้น้อย ละลายน้ำได้ปานกลาง (1 ใน 10 ส่วน) สามารถละลายได้ทั้งในสารละลายกรดและด่าง โดยจะเกิดเป็นสารแขวนลอย 1.0% ที่ pH 1.80 ถึง 2.80 คุณสมบัติของสารเททราซัยคลินจะลดลงที่ pH ต่ำกว่า 2.00 และจะถูกทำลายในสารละลายด่างแก่ สามารถเกิดเป็นสารละลายเชิงซ้อนที่ไม่ละลายได้กับไอออนบวก โสามารถละลายได้ทั้งในสารละลายกรดและสารละลายด่าง คงตัวในรูปไอออนบวกที่ค่า pH เป็นกรด (น้อยกว่า 3.00) และในรูปไอออนลบจะมีค่า pH เป็นด่าง (มากกว่า 8.00) สามารถอยู่ในรูปของ zwitterionic จะมีค่า pH เป็นกลาง (4.00-7.00) ปรกติค่า pH จะอยู่ประมาณ 5.60

สารละลายเททราซัยคลินมีความสามารถในการเกิดเชิงซ้อนกับโลหะไอออนบวก ได้แก่ Fe^{3+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} เป็นต้น การเกิดสารเชิงซ้อนของสารเททราซัยคลินกับโลหะจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าสเปกตรัมของยูวี โดยชนิดและปริมาณการเกิดคีเลทขึ้นอยู่กับพีเอชหรือโลหะที่เข้าทำปฏิกิริยา รูปแบบการเกิดเชิงซ้อนจะอยู่ในรูป TC + metal + ligand เกิดการเปลี่ยนโครงสร้าง ดังนั้นสารเททราซัยคลินจึงสามารถเกิดผลทางชีวภาพกับ DNA ของแบคทีเรีย

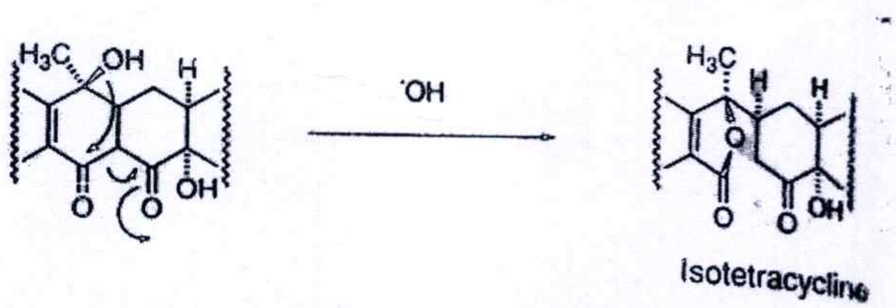
ในสภาวะกรดแรงมากหรือที่ pH ต่ำๆ จะเกิดเป็นแอนไฮโดรเททราซัยคลิน (anhydrotetracycline) เกิดจากวงคาร์บอนที่ไม่เสถียรภายใต้สภาวะกรดและอุณหภูมิที่สูง เกิดการสูญเสียน้ำที่คาร์บอนตำแหน่ง 5a กับไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่ง 6 และเกิดการหลุดออกของโปรตอน (O-11 หรือ O-12) ระหว่างวง D กับวง C และเชื่อมต่อที่ตำแหน่ง 11-11a แทน ผลิตภัณฑ์แอนไฮโดรเททราซัยคลิน (anhydrotetracycline, ATC) สารแอนไฮโดรเททราซัยคลินรูปนี้จะไม่ทำงาน รวมถึงการเกิดอิพิเททราซัยคลิน (epianhydrotetracycline) ในสภาวะกรดบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ดังแสดงในรูปที่ 2.24 รูปแบบของไอโซเมอร์ (isomer) เหล่านี้จะไม่สามารถเกิดได้ระหว่างการสกัด

ด้วยบัพเฟอร์ McIlvaine ที่ pH 4.00 หรือเก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิ 20°C โดยไม่โดนแสง แต่สารอิพิเททราซัยคลินสามารถกลับไปอยู่ในรูปที่ทำงานได้ภายใต้สภาวะเป็นด่าง



รูปที่ 2.24 การเกิดอิพิเททราซัยคลิน (epianhydrotetracycline) และแอนไฮโดรเททราซัยคลิน (anhydrotetracycline) [17]

ส่วนการเกิดไอโซเททราซัยคลิน (isotetracycline) เกิดโดยที่คีโตนตำแหน่งที่ 12 ในสภาวะด่างสร้าง β-ketone ของพันธะ 11-11a โดยหมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอน 6 จะเชื่อมต่อกับตำแหน่ง 11-keto ดังแสดงในรูปที่ 2.25 ซึ่งการเปลี่ยนรูปเหล่านี้จะทำให้คุณสมบัติของยาหมดไป อีกทั้งยังแสดงความเป็นพิษต่อร่างกาย



รูปที่ 2.25 การเกิดไอโซเมอร์ไรเซชั่น (isomerization) ของสารละลายเททราซัยคลิน [17]

2.3.2 การทำงาน

ยากลุ่มเททราซัยคลินเป็นยาที่ผลิตขึ้นใช้ต่อต้านแบคทีเรีย ซึ่งมีช่วงสเปกตรัมที่กว้างเพื่อให้ออกฤทธิ์วงกว้างทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ จึงสามารถใช้กำจัดเชื้อได้มาก เช่น *Chlamydiaceae, Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., *spirochaetes* spp. เป็นต้น นอกจากนี้เททรา

ซัยคลินสามารถต้านโปรโตซัวบางชนิด รวมถึงเชื้อรา, ยีสต์และและไวรัส จากประสิทธิภาพการทำงานของเททราซัยคลินทำให้มีการใช้อย่างกว้างขวาง

สารเททราซัยคลินเป็นสารที่ต้านแบคทีเรียทั้ง aerobic และ anaerobic โดยเททราซัยคลินยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย สามารถกำจัดแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูงแม้ใช้ยาต้านในปริมาณความเข้มข้นน้อย เททราซัยคลินจะเข้าไปจับทั้งไรโบโซมและ mRNA โดยจะเข้าไปในผนังเซลล์แบคทีเรียด้วยระบบ transport เททราซัยคลินภายในเซลล์แบคทีเรียจะเข้าจับในตำแหน่งไรโบโซม 30S ทำให้เกิดการป้องกันการเข้าจับ aminoacyl-transfer RNA ที่ตำแหน่งตัวรับ A ซึ่งเป็นตำแหน่งที่รับข้อมูล RNA-ribosome ดังนั้นยากลุ่มนี้จะเข้าไปทำการยับยั้งการสังแคราะห์โปรตีนและการหายใจของแบคทีเรีย แยกไรโบโซมจากเซลล์ eukaryotic และ prokaryotic ส่งผลต่อแบคทีเรียเท่านั้น ไม่ส่งผลต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ถ้ามีการใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูงอาจส่งผลให้เข้าไปในแซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เททราซัยคลินเกิดโลหะไอออนคีเลทไม่สัมพันธ์กับการต้านแบคทีเรีย แต่พบว่าการจับกับแมกนีเซียมอาจส่งผลลดความสามารถการจับกับ ไรโบโซม tRNA ในกระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์แบคทีเรีย ซึ่งแมกนีเซียมจะมีสะสมในเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากการเกิดเชิงซ้อนนี้จะอยู่ภายในผนังเซลล์พลาสมาแบคทีเรีย ทำให้ลดการผ่านเททราซัยคลินเข้าเซลล์โปรโตปลาสซึม

เททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์มีใช้กันอย่างกว้างขวางมากในทางการยารักษา ใช้รักษาตับและโรคมาลาเรียโดยจะเข้าไปต่อต้านปรสิตในเลือดและเนื้อเยื่อ, ใช้บ้วนปากลดอาการแผลเปื่อยในปาก, โรคแผลในกระเพาะอาหาร, โรครูมาติซึม โรคผิวหนัง, ไข้จุด, ไข้รากสาดใหญ่, เยื่อตาขาวอักเสบ, ภาวะเยื่อบุผิวคอหอยอักเสบ, ไซนัสอักเสบหรือปอดอักเสบ บางรายงานพบว่าสามารถใช้ในรักษาสิวโดยระงับการเจริญเติบโตและป้องกันการอักเสบของสิว

นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาในทางปศุสัตว์เพื่อป้องกันโรค เพิ่มการเจริญเติบโตและควบคุมแบคทีเรียโดยใส่ในอาหารสัตว์ ในสหรัฐมีการใช้ในหมูประมาณ 90.0% และ 40.0% ในทางปศุสัตว์

2.3.3 การดูดซึม การกระจายและการขับออก

ในทางเภสัชกรรมสารเททราซัยคลินจะถูกดูดซึมประมาณร้อยละ 60.0-80.0 ของยา ซึ่งตัวยาบางส่วนจะเข้าจับไอออนโลหะบวกเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่ไม่ละลายจึงส่งผลยับยั้งการดูดซึมสารเมื่อรับประทานแล้วจะซึมเข้าสู่ร่างกายเข้าภายใน 30.00 นาที และจะออกฤทธิ์ภายใน 1.00-3.00 ชั่วโมง โดยกระเพาะอาหารจะดูดซึมเททราซัยคลินเพียง 75.0% สารเชิงซ้อนไอออนบวก เช่นอลูมิเนียม, เหล็ก, แคลเซียมและแมกนีเซียมธาตุจะป้องกันการดูดซึมเททราซัยคลิน ซึ่งมาพร้อมกับอาหารและผลิตภัณฑ์นม รวมทั้งยาลดกรดในกระเพาะอาหารซึ่งประกอบด้วยอลูมิเนียมและเหล็กจะดูดซึมสาร เททราซัยคลินประมาณ 20.0-60.0% ของปริมาณยา ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.7 ดังนั้น

ควรหลีกเลี่ยงการบริโภคสารเททราซัยคลินร่วมกับยาลดกรดในกระเพาะ, ผลิตภัณฑ์นมและธาตุเหล็ก นอกจากนี้ หลังจากดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้ว สารเททราซัยคลินจะกระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย และอาจเข้าจับกับผิวหน้ากระดูก (18) ดังนั้นถ้าใช้กับทารกจะส่งผลให้เกิดการฟอกสีฟันและการเจริญเติบโตของฟัน

ตารางที่ 2.7 แสดงกลไกการทำงานของสารเททราซัยคลินต่อผลิตภัณฑ์ยาและอาหาร

ชนิด	กลไกการทำงาน
ผลิตภัณฑ์นมหรือสารที่ประกอบด้วยแคลเซียม หรือ แมกนีเซียม	ลดการดูดซึมของผลิตภัณฑ์นม
เกลือของเหล็ก	ลดการดูดซึมของเหล็ก
ยา digoxin	ลดการทำงานทางชีวภาพ และทำให้ยาเกิดเป็นพิษ
ยาต้านการจับเป็นก้อนของเลือด	ลดประสิทธิภาพทำงานของยา
ธาตุลิเทียม	เพิ่มความเป็นพิษของลิเทียม

นอกจากนี้ ถ้าเกิดแก็สในกระเพาะอาหาร ยาเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์จะมีการดูดซึมไม่สมบูรณ์ ได้เพียงประมาณ 60.0-80.0% ของปริมาณยา เกิดการดูดซึมไม่สมบูรณ์เนื่องจากเททราซัยคลินเกิดเป็นไอออนภายใต้สภาวะกรดและด่าง ในรายงานของ Barr et al. (1971) พบว่าโซเดียมไบคาร์บอเนตมีผลทำให้การดูดซึมเททราซัยคลินลดลงร้อยละ 50.0 รวมทั้งลดการกระจายตัวของยา อีกทั้งส่งผลให้ยาตัวอื่นๆ มีการทำงานน้อยลง

ภายในระบบหมุนเวียนร่างกาย สารเททราซัยคลินจะมีการกระจายผ่านโครงร่างและเนื้อเยื่อในเซลล์ไปตามตับ, ม้าม, ไต, ลำไส้เล็ก, กล้ามเนื้อ กระดูกและไขกระดูก หลังจากยาผ่านตับแล้วจะถูกขับออกผ่านทางน้ำดีในลำไส้ ซึ่งขับออกทางปัสสาวะ สารเททราซัยคลินอาจถูกกำจัดหลังจากการรับประทานไป 2.00-12.00 ชั่วโมง ปนออกมาในปัสสาวะประมาณ 40.0-70.0% ของปริมาณยาที่ใช้

2.2.4 ผลกระทบจากการใช้

การใช้ปริมาณยาเททราซัยคลินที่มากเกินไปจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของตับ บางรายงานพบว่าจะเพิ่มเอนไซม์ในตับ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบไขมันในตับ เป็นพิษต่อตับอย่างรุนแรงอาจถึงตายได้ นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดโรคอื่นๆ ตามมา เช่น โรคดีซ่าน, เกิดแก็สในกระเพาะรวมถึงอาการคลื่นไส้, อาเจียนและท้องร่วง, เกิดการระคายเคืองท้อง นอกจากนี้ทำให้ปาก

แห้ง, ลิ้นอักเสบและฟอกสีลิ้นรวมทั้งเป็นแผลเปื่อยในปาก ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง ซึ่งถ้ามีการใช้ยากับผู้ป่วยที่เป็นโรคไตอยู่แล้วจะทำให้เพิ่มความรุนแรงของโรคลูคิเมียมากขึ้น เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและอาจจะทำให้น้ำหนักลดลงอีกด้วย เนื่องจากไม่อยากอาหาร ปัสสาวะมากผิดปกติ ระคายเคืองลำไส้เล็ก

นอกจากนี้ สารเททราซัยคลินจะเข้าไปจับในกระดูกและฟัน ส่งผลต่อการสร้างแคลเซียม โดยจะเข้าไปเกาะแคลเซียมในกระดูกและเป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของกระดูก สีของฟันและกระดูกเป็นสีเหลือง เมื่อใช้กับทารกหรือสตรีมีครรภ์ อาจทำให้ปวดศรีษะและผิดปกติบริเวณผิวหนังและตา เกิดการระคายเคืองตาทำให้เกิดภาวะสายตาสั้นชั่วคราว, เป็นไข้ ทำให้ทารกและเด็กเล็กเจริญเติบโตไม่เต็มที่ นอกจากนี้โรคภูมิแพ้อาจจะเกิดขึ้นได้จากการใช้เททราซัยคลิน

ผลกระทบเหล่านี้อาจเกิดในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งอาการเหล่านี้จะค่อยๆ หมดไปถ้างดการใช้ยาเททราซัยคลินหรือเปลี่ยนไปใช้ยากลุ่มอื่นแทนในการรักษา แต่ก็อาจส่งผลกระทบในระยะยาวได้ เช่น โรคปอดอักเสบ, การทำงานของไตและต่อมไธรอยด์เสื่อม, สีของกระดูกซีดลง, อวัยวะภายในฝ่อลีบ, เม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อเกิดมากผิดปกติทำให้ลดความสามารถในการทำงานของเม็ดเลือดขาว, ยังยั้งการทำงานทางเคมีของเซลล์เม็ดเลือดสีและการสังเคราะห์โปรตีนทำให้เป็นโรคโลหิตจาง, โรคผิวหนังอักเสบและโรคหืด มีปัสสาวะและน้ำตาลมากผิดปกติ เป็นต้น

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. D. Jedsadapattarakul [4] การเตรียมซิลิกาที่มีความบริสุทธิ์สูงจากแกลบข้าว เพื่อใช้เป็นของแข็งยึดเกาะ (solid support) ให้เฟสอยู่กับที่ที่บรรจุในคอลัมน์ที่จะใช้ใน GC และ HPLC โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0% (w/v) สกัดซิลิกาจากขี้เถ้าแกลบของเปลือกข้าว จะได้สารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต (Na_2SiO_3) ปรับ pH เท่ากับ 10.00 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 15.0% (v/v) เกิดเจลของซิลิกา นำเจลที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องเครื่องพ่นแห้ง ผงซิลิกาที่ได้สามารถนำมาทำเฟสอยู่กับที่คอลัมน์ GC และ HPLC สำหรับคอลัมน์ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยอาศัยปฏิกิริยาไซเลไนเซชัน (silanization) กับสารประกอบพวกออร์กาโนคลอโรไซเลน เช่น trimethylchlorosilane (TMCS) และ hexamethyldisilizane (HMDS) อาศัยปฏิกิริยาไซเลไนเซชันกับ octadecyltrichlorosilane (ODS) ซึ่งจะได้เฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ทั้งสองเทคนิคที่มีราคาถูก นำคอลัมน์ GC และ HPLC มาทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์

2. Hisao Oka และคณะ [19] วิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเททราซัยคลิน ได้แก่ ออกซิเททราซัยคลิน (oxytetracycline), เททราซัยคลิน (tetracycline) และ คลอเททราซัยคลิน (chlortetracycline) ที่ผสมในผลิตภัณฑ์อาหารมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบทินเลเยอร์ (thin layer chromatography), เคฟิลารี่อิเล็กโฟไรซิส (capillary electrophoresis) และโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography) โดยมีซิลิกาเป็นเฟสอยู่กับที่และใช้สารละลาย EDTA และกรดออกซาลิกในระหว่างขั้นตอนการวิเคราะห์ตั้งแต่การสกัดสารละลายและกำจัดสารปนเปื้อน จนถึงขั้นตอนการตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี

3. Collin R. Anderson และคณะ [16] สกัดสารกลุ่มเททราซัยคลินจากตัวอย่างชนิดต่างๆ เช่น เนื้อหมู, เนื้อวัว, ปลา, นม, ไข่ไก่และน้ำผึ้ง โดยใช้วิธีการแยกสารวิเคราะห์จากสารตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคของเหลวโครมาโทกราฟีชนิด C18 หรือ C18-RP ที่มียูวีเป็นตัวตรวจวัด ซึ่งในขั้นตอนการสกัดเททราซัยคลินจากตัวอย่าง ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvaine/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ที่ pH 4.00 ใช้สกัดจากสารตัวอย่าง และสารละลายกรดออกซาลิกผสมในเฟสเคลื่อนที่

4. Jiantao Li และคณะ [20] สกัดสารกลุ่มเททราซัยคลินจากน้ำผึ้งด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE-C18) โดยเชื่อมต่อโดยตรงกับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 365 nm ใช้สารผสม 0.8% ของกรดฟอร์มิกและอะซิโทรไนไตร์เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากการทดลองพบว่า มีค่า limits of detection (LODs) ที่ 5.00-12.00 ng/g มีค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานร้อยละ 3.4-7.1 ในเวลาการทดสอบ 1 วัน และร้อยละ 3.2-8.9 ในเวลาการทดสอบ 3 วัน ตามลำดับ

5. Xiao gang Hu และคณะ [21] สกัดสารเททราซัยคลินโดยใช้ Molecularly imprinted polymer (MIP) ในการเตรียมตัวอย่างอาหารไก่, เนื้อไก่และนม และตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโท

กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) สารดูดซับที่ใช้มีขนาดอนุภาค 19.5 μm เคลือบลงบนแผ่นพอลิเมอร์ ผลที่ได้เปรียบเทียบกับแผ่น non-imprinted polymer (NIP) จากผลการทดลองพบว่า ให้ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 5.0–200.0 μg/L และค่าต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ในช่วง 1.0–2.3 μg/L

6. Wendy C. Andersen และคณะ [22] ตรวจวัดปริมาณยาปฏิชีวนะ tracycline, oxytetracycline, และ chlortetracycline ในตัวอย่างกุ้งและนม โดยใช้คอลัมน์โคพอลิเมอร์ SPE ในการแยกสกัด และตรวจวัดด้วยคอลัมน์ C8 เฟสเคลื่อนที่ใช้สารละลายผสมระหว่างเมทานอล, อะซิโตร์ไนไตร์และ 0.1% ของกรดฟอร์มิกหรือ 0.01 โมลาร์ของกรดออกซาลิก และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 370 nm จากผลการทดลอง ทำการตรวจวัดสารเททราซัยคลินในตัวอย่างกุ้งและนมที่ความเข้มข้น 50.0, 100.0, 200.0, 300.0 และ 400.0 ng/g ซึ่งให้ค่าคืนกลับมากกว่าร้อยละ 75.0 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานน้อยกว่าร้อยละ 10.0 ซึ่งในตัวอย่างกุ้งจะมีการตกค้าง 25.0–400.0 ng/g และตกค้างในตัวอย่างนม 50.0–300.0 ng/g

7. Eugen S. Andreiadis [23] ศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ SPE ที่มีเฟสอยู่กับที่เป็นซิลิกา C18 ด้วยสารละลายมาตราฐาน para-chloraniline (PCA) ในอัตราการไหลและความเข้มข้นต่างกัน โดยนำมาต่อกับระบบปั๊มของ HPLC โดยสารละลายจะผ่านคอลัมน์เข้าเครื่องตรวจวัดโดยตรง ค่าที่ได้นำมาพลอตกราฟ breakthrough หาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ทั้งค่าความจุ, จำนวนเพลททางทฤษฎีและร้อยละค่าคืนกลับ

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1. ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน (Octadecyltrichlorosilane) A.R.grade บริษัท Fluka
2. ไทรเมทิลคลอโรไซเลน (Trimethylchlorosilane) A.R.grade บริษัท Fluka
3. เททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (Tetracycline Hydrochloride) HPLC grade บริษัท Fluka $\geq$ 95.0%
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate anhydrous) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
5. กรดซิตริก (Critric acid monohydrate) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
6. ไดโซเดียมเอทาลีนไดเอมีนเททราอะซีเทรต (disodium ethylenendiamine tetracetate) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
7. กรดออกซาลิก (Oxalic acid) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
8. โทลูอีน (Toluene) A.R.grade บริษัท BDH
9. ไพริดีน (Pyridine) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
10. อะซิโทไนไทรล์ (Acetonitrile) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
11. อะซิโทไนไทรล์ (Acetonitrile) HPLC grade บริษัท LAB SCAN
12. เมทานอล (Methanol) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
13. เมทานอล (Methanol) HPLC grade บริษัท LAB SCAN
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) A.R. grade บริษัท LAB SCAN
15. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) A.R. grade บริษัท LAB SCAN
16. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide) A.R. grade บริษัท LAB SCAN
17. น้ำมันพาราฟิน (Parafin liquid for oil bath) A.R.grade บริษัท Fisher Chemicals
18. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) A.R.grade บริษัท BDH
19. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) A.R. grade บริษัท Fisher Scientific
20. อะซิโตน (Acetone) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
21. น้ำกลั่น (Distillation water) และน้ำปราศจากไอออน(Deionization water, DI)
22. แกลบข้าว

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM): 1455VP/EDAX®, LEO
2. เครื่องเทอร์โมกราวิเมทริก อนาไลซ์เซอร์ (Thermogravimetric Analyzer; TGA): Pyris 1 TGA, Perkin Elmer
3. เครื่องวัดพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุน (Surface Area Analyzer): Autosorb-1, Quana Chrome
4. เครื่องวัดการกระจายตัวของอนุภาค (Particle Size Analyzer): Mastersizer X, MaLYeRN
5. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (Fourier Transforms Infrared Spectrometer; FT-IR): FTIR spectrum GX, Perkin Element
6. เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวแบบสมรรถณะสูง (High Performance Liquid Chromatograph; HPLC): water 510 HPLC pump/waters 486 Tunable absorbance detector, MILLIPORE
7. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter): Model type 215 Denver Instrument
8. เครื่องร่อนคัดขนาดอนุภาค (Sieve shaker): Refsch type vibro
9. ตะแกรงร่อน (Sieve) ขนาด 35 เมช (500 μm), 170 เมช (90 μm) และ 230 เมช (63 μm) : ASTM E11, Endecotts Ltd.
10. เตาเผาความร้อนสูง (High temperature furnace): CSF 1200, Carbolite Furnaces
11. แท่นให้ความร้อนและปั่นกวน (Hotplate & stirrer): Framo® Geratetechnik, Model type: M21/1 m
12. เครื่องเขย่า (Shaker) : GALLENKAMP
13. ปั๊มดูดอากาศ (Vacuum pump) : ASPIRATOR A-35

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 เตรียมอนุภาคซิลิกาจากแกลบข้าว

1) ศึกษาวิธีการเตรียมสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกตจากแกลบข้าว
2) ศึกษาวิธีการเตรียมอนุภาคซิลิกาจากสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต
3) ตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ-เคมีของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว
    - ตรวจคุณลักษณะการกระจายตัวของอนุภาคซิลิกา
    - ตรวจคุณลักษณะหาปริมาณพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของอนุภาคซิลิกา
    - ตรวจคุณลักษณะหมู่ฟังก์ชันของอนุภาคซิลิกา
    - ตรวจคุณลักษณะการเปลี่ยนเฟสของอนุภาคซิลิกา

3.2.2 สังเคราะห์ซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน

1) เตรียมซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน ด้วยปฏิกิริยาไซลาไนเซชัน
2) ปิดปลายที่ว่องไว (end-capping) ของซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนแล้ว โดยทำปฏิกิริยากับไทรเมทิลคลอโรไซเลน
3) ตรวจคุณลักษณะทางกายภาพ-เคมีของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน
    - ตรวจคุณลักษณะการกระจายตัวของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน
    - ตรวจคุณลักษณะการเปลี่ยนเฟสของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน
    - ตรวจคุณลักษณะหมู่ฟังก์ชันของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน

3.2.3 ทำการบรรจุซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน (หรือซิลิกา-C18) ลงในหลอดไซริงจ์ขนาด 3 mL (50 x 6 mm i.d.)

3.2.4 ตรวจสอบความใช้ได้ของสารดูดซับซิลิกา-C18 ที่บรรจุในหลอดไซริงจ์ที่เตรียมขึ้น

โดยใช้สารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (HPLC grade) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน และสารละลาย spiked sample มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้สารดูดซับซิลิกา-C18 ที่เตรียมขึ้นและตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวแบบสมรรถณะสูง (HPLC) พร้อมทั้งเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า

ค่าทางสถิติที่ใช้ในการประเมินผลมีดังนี้

- ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)
- ความเที่ยง (Precision)
- ความแม่น (Accuracy)

- ขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of Detection) และขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ (Limit of Quantitation)

3.2.5 วิเคราะห์ปริมาณเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ในตัวอย่างตับหมู

3.2.6 สรุปผลการทดลองและรายงานผลการทดลอง

3.3 วิธีการวิจัย

สภาวะที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคซิลิกาที่สามารถนำมาใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ เตรียมโดยอาศัยการอบแห้งและบดเพื่อคัดขนาดอนุภาค

3.3.1 การเตรียมสารละลาย

3.3.1.1 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 M

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นมา 83.60 mL ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1.00 ลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1.0 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.1.2 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 15.0 % (v/v)

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นมา 150.00 mL ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1.00 ลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1.0 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0 % (w/v)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 100.0000 กรัม ใส่บีกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น เทใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1.0 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

3.3.1.4 การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 15.0 % (v/v)

นำสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มา 150.0 mL ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1.0 ลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1.0 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.1.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ 1000.00 ppm [24]

ชั่งสารมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์มาจำนวน 0.0100 กรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 100.00 mL โดยละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลชนิด HPLC grade สารละลายที่ได้สามารถเก็บไว้ใช้ได้ 3 เดือน โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3.3.1.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ 100.00 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 1000.00 ppm มา 10.00 mL ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 mL แล้วเจือจางด้วยเมทานอลชนิด HPLC grade จนปริมาตรครบ 100.00 mL สารละลายที่ได้สามารถเก็บไว้ใช้ได้ 3 เดือน โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3.3.1.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ 10.00 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ 100.00 ppm มา 1.00 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 10.00 mL โดยละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลชนิด HPLC grade สารละลายที่ได้สามารถเก็บไว้ใช้ได้ 3 เดือน โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3.3.1.8 การเตรียมสารละลายมาตราฐานเททราซัยคลินความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 2.50, 3.50, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00 และ 35.00 ppm

เตรียมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.50 ppm โดยปิเปตสารละลายมาตราฐานเททราซัยคลินเข้มข้น 10.00 ppm มา 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.50 mL ใส่ขวดวัดปริมาตร 10.00 mL เจือจางด้วยเมทานอลชนิด HPLC grade จนปริมาตรครบ 10.00 mL

เตรียมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินความเข้มข้น 1.00, 2.00, 2.50, 3.50, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00 และ 35.00 ppm โดยปิเปตสารละลายมาตราฐานเททราซัยคลินเข้มข้น 100.00 ppm มา 0.10, 0.20, 0.25, 0.35,0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00 และ 3.50 mL ใส่ขวดวัดปริมาตร 10.00 mL เจือจางและปรับปริมาตรด้วย เมทานอลชนิด HPLC grade จนปริมาตรครบ 10.00 mL เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้องไว้ใช้ได้เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.3.1.9 การเตรียมสารละลายกรดเมทานอลิกออกซาลิก

ชั่งกรดออกซาลิก 1.2600 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลชนิด HPLC grade ในขวดวัดปริมาตร 1.00 ลิตร โดยเตรียมใช้วันต่อวัน

3.3.1.10 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่

ชั่งกรดออกซาลิกมา 1.2600 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร 1.00 ลิตร

ผสมสารละลายกรดออกซาลิกที่เตรียมขึ้นกับอะซิโทไนไทรล์ชนิด HPLC grade และเมทานอลชนิด HPLC grade ในอัตราส่วน 65 : 15 : 20 (v/v) จากนั้นกรองผ่านเฟสเคลื่อนที่ด้วยกระดาษกรองเมนเบรนที่มีความละเอียด 0.45 μm และทำการไล่แก๊สโดยเขย่าสารละลายด้วยเครื่องอัลทราโซนิก (ultrasonic bath) เป็นเวลา 30.00 นาที สารละลายที่ได้ต้องเตรียมใช้วันต่อวัน

3.3.1.11 การเตรียมสารละลาย Mcllvaine buffer [24.]

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 28.4000 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร 1.00 ลิตร

ชั่งกรดซิตริกโมโนไฮเดต 21.0000 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร 1.00 ลิตร

นำสารละลายกรดซิตริก 1.00 ลิตร ผสมกับสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 625.00 mL ในขวดวัดปริมาตรขนาด 2.00 ลิตร แล้วปรับค่า pH ให้ได้ประมาณ 4.00 ± 0.05 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 0.10 M หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.10 M

3.3.1.12 การเตรียมสารละลาย Mcllvaine buffer – EDTA

ชั่งไดโซเดียมเอทาลีนไดเอมีน–เททราอะซิเทรต มา 60.5000 กรัม เติมลงใน Mcllvaine buffer ที่เตรียมขึ้นจากข้อ 3.3.1.11 เขย่าให้เข้ากัน สารละลายที่เตรียมได้เก็บไว้ใช้ต่อสัปดาห์

3.3.1.13 การเตรียมสารละลายตัวอย่างจากตับหมู [24.]

ชั่งตัวอย่างตับหมูหนัก 5.0000 กรัม บดให้ละเอียด ใส่ในหลอด polypropylene centrifuge ขนาด 50.0 mL เติมสารละลาย Mcllvaine buffer – EDTA ปริมาตร 20.00 mL เขย่าผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30.00 วินาที และทำการล้างด้านข้างของหลอดด้วยสารละลาย Mcllvaine buffer – EDTA ในปริมาตร 2.00 mL ซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำหลอดที่ได้มาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10.00 นาที แล้วทำการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงเป็นเวลา 10.00 นาที ด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที แยกสารละลายที่ได้ออกจากตะกอนเก็บใส่ในบีกเกอร์ ส่วนตะกอนที่เหลือนำไปเติมสารละลาย Mcllvaine buffer – EDTA ในปริมาตร 20.00 mL จากนั้นทำการเขย่าและเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งในเวลาและความเร็วรอบเท่าเดิม จะได้สารละลายที่แยกมาในรอบที่สอง นำตะกอนที่ได้มาสกัดซ้ำอีกครั้งโดยเติมสารละลาย Mcllvaine buffer – EDTA ปริมาตร 10.00 mL จากนั้นทำการเขย่าเป็นเวลา 10.00 นาที แล้วทำการหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 20.00 นาที ด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที รวบรวมสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมด 3 ครั้งเข้าด้วยกัน

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมากรองผ่านกระดาษกรองชนิดใยแก้วที่มีความละเอียด 0.45 μm ด้วยระบบสูญญากาศและล้างด้วยสารละลาย Mcllvaine buffer – EDTA จะได้สารละลายตัวอย่างใส

3.3.1.14 การเตรียมสารละลายตัวอย่างจากตับหมูที่เติมสารมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (spiked sample)

ชั่งตัวอย่างตับหมูหนัก 5.0000 กรัม ใส่ในหลอด polypropylene centrifuge ขนาด 50.0 mL บดให้ละเอียด เติมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินเข้มข้น 100.00 ppm ปริมาตร 0.10 mL จะได้ตัวอย่างตับหมู (spiked sample) ที่มีความเข้มข้นของเททราซัยคลิน 1.00 ppm จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.13

ทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้น โดยเปลี่ยนปริมาตรสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินที่เติม โดยเติมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินเข้มข้น 100.00 ppm ปริมาตร 0.30, 0.50, 0.70 และ 0.90 mL ตามลำดับ จะได้ตัวอย่างตับหมู (spiked sample) ที่มีความเข้มข้นของเททราซัยคลิน 3.00, 5.00, 7.00 และ 9.00 ppm ตามลำดับ และนำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.13

3.3.2 การเตรียมอนุภาคซิลิกาจากแกลบข้าว [4]

3.3.2.1 วิธีการเตรียมสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกตจากแกลบข้าว

นำเถ้าแกลบไปเผาที่อุณหภูมิ 700ºC เป็นเวลา 1.00 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 35 เมช (mesh) และล้างแกลบที่ร่อนได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 M โดยการแช่และคนด้วยเครื่องกวนและแท่งแม่เหล็กช่วยกวนเป็นเวลา 1.00 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ ล้างด้วยน้ำกลั่นจนน้ำล้างที่ได้เป็นกลาง นำเถ้าแกลบไปอบที่อุณหภูมิ 110ºC เป็นเวลา 12.00 ชั่วโมง

ชั่งเถ้าแกลบแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน นำไปต้มกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0% (w/v) ที่อุณหภูมิ 80-85ºC เป็นเวลา 1.00 ชั่วโมง โดยปริมาตรของสารละลายที่ใช้คำนวณจากความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0 % (w/v)

$$SiO_2 + 2\,NaOH \longrightarrow Na_2SiO_3 + H_2O$$

$$NaOH(required) = \left[\frac{X \times \left(\frac{y\%}{100}\right)}{MW_{\cdot SiO_2}}\right] \times 2\left(MW_{\cdot NaOH}\right)$$

กำหนดให้	X	คือ น้ำหนักของเถ้าแกลบ (กรัม)
	Y	คือ เปอร์เซ็นต์ของซิลิกาที่มีอยู่ในเถ้าแกลบ (%)
	$M.W._{\cdot SiO2}$	คือ น้ำหนักโมเลกุลของซิลิคอนไดออกไซด์
	$M.W._{\cdot NaOH}$	คือ น้ำหนักของโมเลกุลโซเดียมไฮดรอกไซด์

ทิ้งสารละลายสีน้ำตาลอ่อนที่ได้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและทำการกรองสารละลายด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ จะได้สารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต 10.0 % (w/v)

3.3.2.2 วิธีการเตรียมอนุภาคซิลิกาจากสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต

ปรับ pH ของสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 15.0% (v/v) ให้เป็น 10.00 จะได้เจลเกิดขึ้น แล้วปรับ pH ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 15.0% (v/v) ให้ลดลงเป็น 1.00 เพื่อทำให้เจลเกิดการกระจายตัว เก็บสารละลายทิ้งไว้เป็นเวลา 24.00 ชั่วโมง ปรับพีเอชด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 15.0% (v/v) ให้เป็น 7.00 นำไปอบที่ 110ºC เป็นเวลา 24.00 ชั่วโมง

นำอนุภาคซิลิกาที่ได้มาล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นโดยการแช่และคนด้วยแท่งแม่เหล็กและเครื่องช่วยกวนเป็นเวลา 20.00 นาที กรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ ล้างด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12.00 ชั่วโมง จากนั้นทำการบดและคัดขนาดอนุภาคซิลิกา โดยร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 170 และ 230 เมช

3.3.2.3 ตรวจคุณลักษณะทางกายภาพ-เคมีของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว

- ตรวจคุณลักษณะรูปร่างเม็ดซิลิกาด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)
- ตรวจคุณลักษณะการกระจายตัวของอนุภาคด้วยเทคนิค Light Scattering Analysis (Mastersizer X)
- ตรวจคุณลักษณะหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier Transforms Infrared Spectrometry (FT-IR)
- ตรวจคุณลักษณะหาปริมาณพื้นที่ผิวและขนาดของรูพรุนด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer

3.3.3 ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ซิลิกา – ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน [25]

จากข้อมูล Kenvin D, 2003 [26] การเกิดปฏิกิริยาไซลาไนเซชันของออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนบนไซลานอล พื้นผิวของซิลิกา สามารถเกิดได้สูงสุดเพียงครึ่งหนึ่งหรือ 50.0% ของปริมาณไซลานอลที่มีบนพื้นผิวทั้งหมด เนื่องมาจากผลของความเกะกะ (steric effect) ระหว่างหมู่ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนด้วยกัน จากงานวิจัยของ อมรรัศมี, 2550 [25] พบว่าปริมาณสารละลายออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนเพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณไซลานอลบนพื้นที่ผิวทั้งหมดเป็นปริมาตรที่เหมาะสมในการสร้างพันธะบนพื้นผิวซิลิกา

3.3.3.1 การสังเคราะห์ซิลิกา – ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน

ชั่งซิลิกาที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.3.2.2 มา 5.0000 กรัม เทลงในขวดก้นกลม 3 คอขนาด 500.00 mL เติมโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ 95.00 mL ปั่นกวน 5.00 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมไพริดีนที่มีจำนวนโมลเท่ากับโมลของสารละลายออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน ทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2.00 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน 9.84×10^{-4} โมล (0.3818 กรัม) (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ข.) ที่ละลายในโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ 5.00 mL ลงไปในขวดก้นกลม 3 คอ และคนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก โดยรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลานาน 48.00 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน

3.3.3.2 ขั้นตอนการล้างซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ได้จากข้อ 3.3.3.1

นำสารที่ได้ไปกรองและล้างด้วยโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ แล้วนำไปปั่นกวนในสารละลายผสมอะซิโทไนไทรล์-น้ำ (ที่มีอัตราส่วน 60:40) เป็นเวลา 3.00 ชั่วโมง จากนั้นล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย อะซิโทไนไทรล์และเมทานอล ตามลำดับ (ปริมาตรของสารแต่ละชนิดที่ใช้ล้าง 500.00 mL) ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 140°C ในตู้อบสุญญากาศเป็นเวลานาน 8.00 ชั่วโมง [27]

3.3.3.3 ตรวจคุณลักษณะทางกายภาพของซิลิกา – ออคทะเดคซิลไทรคลอโร-ไซเลน

- ตรวจคุณลักษณะรูปร่างอนุภาคซิลิกาด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)
- ตรวจคุณลักษณะหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier Transforms Infrared Spectrometry (FT-IR)
- ตรวจคุณลักษณะการเปลี่ยนเฟสด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis (TGA)

3.3.4 วิธีการสังเคราะห์ซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน [25]

3.3.4.1 การสังเคราะห์ซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน

นำซิลิกาที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3.2 มา 5.0000 กรัม เทลงในขวดก้นกลม 3 คอ เติมโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ 195.00 mL ปั่นกวน 10.00 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมไพริดีนลงไป 1.94×10^{-2} โมล ทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2.00 ชั่วโมง ค่อย ๆ เติมสารละลายไทรเมทิลคลอโรไซเลน 1.94×10^{-2} โมล (2.1140 กรัม) (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.) ที่ละลายในโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ 5.00 mL ลงไปในขวดปฏิกิริยา คนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก แล้วรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 110ºC เป็นเวลานาน 60.00 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน

3.3.4.2 ขั้นตอนการล้างซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน ที่ได้จากข้อ 3.3.4.1

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มากรองและล้างด้วยโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ ตามด้วยไดคลอโรมีเทน, เมทานอลและอะซิโตน ตามลำดับ โดยปริมาตรของสารแต่ละชนิดที่ใช้เท่ากับ 500.00 mL นำไปอบที่อุณหภูมิ 110ºC ในตู้อบสุญญากาศเป็นเวลานาน 12.00 ชั่วโมง [28]

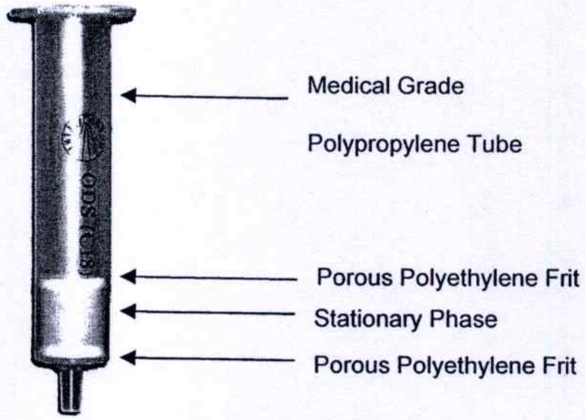
3.3.4.3 ตรวจคุณลักษณะทางกายภาพ-เคมีของซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน

- ตรวจคุณลักษณะรูปร่างลักษณะเม็ดซิลิกาด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)
- ตรวจคุณลักษณะหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier Transforms Infrared Spectrometry (FT-IR)
- ตรวจคุณลักษณะการเปลี่ยนเฟสด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis (TGA)

3.3.5 การบรรจุซิลิกา-C18 ที่ผ่านการปิดปลายแล้วลงในหลอดไซริงจ์

- ชั่งซิลิกา-C18 ที่ปิดปลายที่ว่องไวแล้วจำนวน 0.5000 กรัม
- ใส่ฟริตลงในหลอดไซริงจ์ขนาด 3.0 mL (50 x 6 mm i.d.) จากนั้นทำการบรรจุซิลิกาที่ชั่งน้ำหนักมาเรียบร้อยแล้วลงในหลอดไซริงจ์ เคาะรอบๆ หลอดไซริงจ์เบาๆ เพื่อให้ซิลิกา-C18 ภายในหลอดไซริงจ์อัดแน่นและสม่ำเสมอ

- จากนั้นใส่ฟริตอีกด้าน จะได้คอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น ซึ่งมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะการบรรจุซิลิกา-C18 ลงในหลอดไซริงจ์

3.3.6 ศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น

นำคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นไปทดสอบประสิทธิภาพ โดยหาค่าต่างๆ ดังนี้

1) ค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution Coefficient)
2) Breakthrough
3) แฟกเตอร์ความจุ (Capacity factor,k')
4) จำนวนเพลทตามทฤษฎี (Number of theoretical plates of the column, N)

3.3.6.1 ค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution Coefficient) [29]

การทดสอบหาค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจงจะใช้วิธีการทดลองการดูดซับแบบแบทช์ (batch sorption experiments) โดยชั่งซิลิกา-C18 ที่เตรียมขึ้นมา 0.1000 กรัม ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 50.00 mL จากนั้นใส่สารละลายเททราซัยคลินมาตราฐานความเข้มข้น 0.10 ppm ในปริมาตร 10.00 mL นำไปเขย่าที่ 175 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.00 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายใสไปตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC ที่มีสภาวะเครื่องดังต่อไปนี้ [24]

คอลัมน์	: HiQ Sil C18 W 5 μm (150 x 4.6 mm i.d.)
ตัวตรวจวัด	: ตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 360 nm
สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (3.3.1.10)	: oxalic acid/acetonitile/methanol (65/15/20, v/v)
อัตราการไหล	: 1.00 mL/min
ปริมาตรที่ฉีด	: 20 μL

ทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้น โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายเททราซัยคลินเป็น 0.30, 0.50, 0.70, 0.90, 1.00, 3.00, 4.00, 5.00, 7.00 และ 9.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.3.6.2 Breakthrough

เป็นการทดสอบเพื่อหาจุดอิ่มตัวของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นโดยนำสารละลายเททราซัยคลินความเข้มข้น 10.00 ppm ปริมาตร 25.00 mL มาผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น โดยเก็บสารละลายทุกๆ 1.00 mL แล้วนำสารละลายแต่ละมิลลิลิตรที่เก็บได้มากรองผ่านเมมเบรนที่มีความละเอียด 0.45 µm ไปตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินด้วยเครื่อง HPLC [23] ด้วยสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.1 หาได้จากสมการ [23]

$$V_B = 0.05C_o \qquad (1)$$

หมายเหตุ V_B = ปริมาตร breakthrough

C_o = ความเข้มข้นเริ่มต้น

นำค่าที่ได้จากการทดลองมาพลอตกราฟระหว่างปริมาตรของสารละลายที่เก็บได้ (mL) ในแกน X กับความเข้มข้นของเททราซัยคลิน (ppm) ที่ตรวจวัดได้ในแกน Y

3.3.6.3 แฟกเตอร์ความจุ (Carpacity factor,k') [23]

จากกราฟที่ได้จากข้อ 3.3.6.2 สามารถทราบค่าปริมาตรการคงไว้ (V_R) และปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ (V_M) ได้ นำมาคำนวณหาค่าแฟกเตอร์ความจุได้จากสมการ [23] ต่อไปนี้

$$V_R = V_M(1 + K') \qquad (2)$$

หรือ

$$k' = \frac{V_R}{V_M} - 1 \qquad (3)$$

โดย

$$V_R = 0.5C_o \qquad (4)$$

หมายเหตุ V_R = ปริมาตรการคงไว้ (retention volumn)

V_M = ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่

3.3.6.4 จำนวนเพลทตามทฤษฎี (Number of theoretical plates of the column, N) [23]

จากกราฟที่ได้จากข้อ 3.3.6.2 สามารถหาค่า V_R และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกราฟ (σ_V) ได้ นำมาคำนวณจำนวนเพลททางทฤษฎีได้จากสมการต่อไปนี้

$$N = \frac{V_R\left(V_R - \sigma_V\right)}{\sigma_V^{2}} \qquad (5)$$

หมายเหตุ σ_V = ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของกราฟ

3.3.6.5 การใช้งานซ้ำได้หรือความทน (Ruggedness)

นำสารละลายมาตราฐานเททราซัยคลินที่ความเข้มข้น 5.00 ppm ปริมาตร 10.00 mL (3.3.1.8) มาผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและเตรียมขึ้นเอง ซึ่งต้องปรับสภาวะของคอลัมน์ SPE-C18 ตามขั้นตอน [24] ดังนี้

1) **ขั้นตอนการปรับสภาวะคอลัมน์ SPE-C18**

ชะสารดูดซับในหลอดไซริงจ์ด้วยสารละลายเมทานอล 30.00 mL แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 20.00 mL

2) **ขั้นตอนการผ่านตัวอย่าง**

ผ่านสารละลายมาตราฐานเททราซัยคลินที่ความเข้มข้น 5.00 ppm ปริมาตร 10.00 mL

3) **ขั้นตอนการล้าง**

ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 20.00 mL ชะสารดูดซับในหลอดไซริงจ์ และทิ้งให้แห้ง ซึ่งระหว่างขั้นตอนการปรับสภาวะถึงขั้นตอนการล้างต้องระวังอย่าให้คอลัมน์ SPE-C18 แห้ง

4) **ขั้นตอนการชะ** [24]

ชะคอลัมน์ SPE-C18 ด้วยสารละลายกรดเมทานอลิกออกซาลิกปริมาตร 6.00 mL ลงในขวดปรับปริมาตร 10.00 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดปรับปริมาตร นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านเมมเบรนที่มีความละเอียด 0.45 μm แล้วตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินด้วยเครื่อง HPLC สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.1

ทำการทดลองซ้ำ 3 วัน แต่ละวันทำซ้ำ 7 ครั้ง โดยใช้คอลัมน์ SPE-C18 อันเดิม

3.3.7 ทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น

3.3.7.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

1. System linearity

นำสารละลายมาตราฐานเททราซัยคลินเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 2.50, 3.50, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00 และ 35.00 ppm ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1.8 มาผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าตามขั้นตอนในข้อที่

3.3.6.5 และตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินด้วยเครื่อง HPLC แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 6 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยของสัญญาณที่อ่านได้ที่แต่ละระดับความเข้มข้น พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลิน (แกน X) และสัญญาณที่อ่านได้เฉลี่ย (แกน Y) คำนวณหาสมการเส้นถดถอย (regression) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least squares method) ทั้งนี้ค่าความชัน (slope) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Regression Coefficient, R^2) และจุดตัดแกน Y ของสมการเส้นถดถอยสามารถนำมาเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาการยอมรับความถูกต้องได้

โดยผลของความเป็นเส้นตรงที่ดีจะได้กราฟเส้นตรง ที่มีความชัน = 1 ค่า R^2 = 1 (โดยทั่วไปยอมรับค่า R^2 ที่ 0.999 ถึง 0.995) และค่าจุดตัดแกน y = 0

2. Method linearity

นำสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1.13 และ 3.3.1.14 มาผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าตามขั้นตอนในข้อที่ 3.3.6.5 และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 7 ครั้ง นำสัญญาณที่อ่านได้แต่ละระดับความเข้มข้นมาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานเททราซัยคลิน (แกน X) และพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (แกน Y) จากกราฟคำนวณหาสมการเส้นถดถอย โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด ทั้งนี้ค่าความชันของสมการเส้นถดถอย ในการพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและจุดตัดแกน Y สามารถนำมาเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาการยอมรับความถูกต้อง

3.3.7.2 ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงเป็นค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลทดสอบตัวอย่างที่ทำการทดสอบซ้ำหลายครั้ง โดยนำสารละลายมาตราฐานเททราซัยคลินที่ความเข้มข้น 5.00 ppm ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.6.5 โดยทำซ้ำ 7 ครั้ง ตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินด้วยเครื่อง HPLC คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation ; % RSD) จากสมการต่อไปนี้

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\overline{X}} \qquad (6)$$

หมายเหตุ $\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ

3.3.7.3 ความถูกต้อง (Accuracy)

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ system linearity โดยใช้สูตร

$$\%\mathrm{Recovery} = \frac{(C_1 - C_2)\times 100}{C_3} \qquad (7)$$

หมายเหตุ C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง (Unfortified sample)

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

3.3.7.4 ขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection, LOD) และขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ (Limit of Quantitation, LOQ)

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.3.7.1 ตอน 2 มาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้นของเททราซัยคลิน แล้วนำมาพลอตกราฟกับความเข้มข้นเททราซัยคลิน จะได้จุดตัดแกน y แทนด้วย S_b

คำนวณค่า LOD และ LOQ ได้จากสมการ ต่อไปนี้

$$LOD = 3S_b \qquad (8)$$

$$LOD = 10S_b \qquad (9)$$

3.3.8 การตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินในตัวอย่างตับหมู

เตรียมสารละลายตัวอย่างตับหมู 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง A, B และ C) ตามข้อ 3.3.1.13 และ 3.3.1.14 มาผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าตามขั้นตอนในข้อที่ 3.3.6.5 และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 7 ครั้ง

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

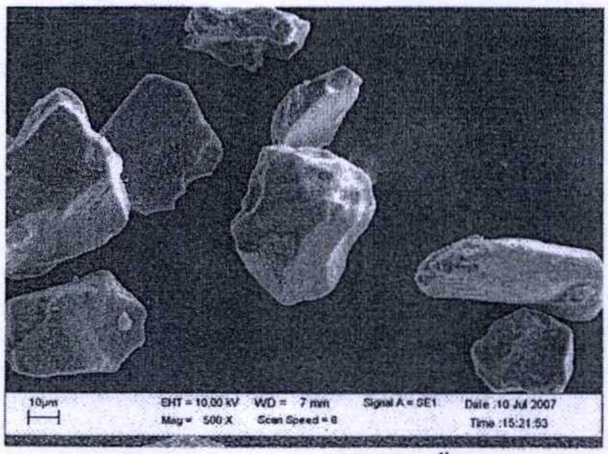
1. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. ศูนย์บริการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการเตรียมอนุภาคซิลิกาจากแกลบข้าว

4.1.1 วิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้จากแกลบข้าวด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope

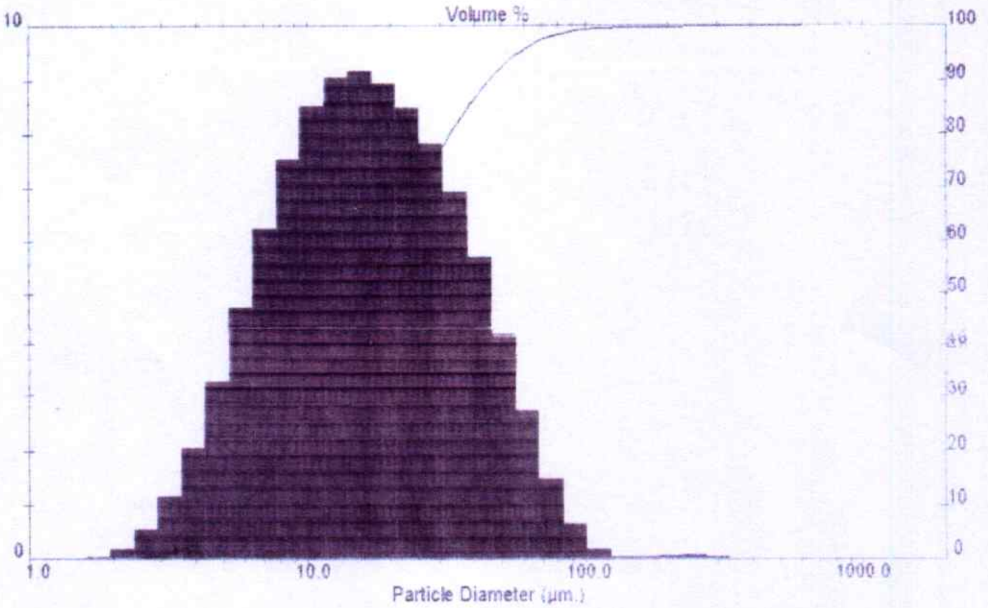


รูปที่ 4.1 ลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมขึ้นจากแกลบข้าว โดยผ่านการร่อนด้วยตะแกรงคัดขนาด 200 เมช

เมื่อนำซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าวที่ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 200 เมช มาวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและขนาดของอนุภาคด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope พบว่าอนุภาคซิลิกาที่ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 200 เมช มีลักษณะไม่แน่นอน พื้นผิวเรียบ ขนาดไม่สม่ำเสมอและรูปร่างของอนุภาคไม่เป็นทรงกลม ดังแสดงในรูปที่ 4.1

4.1.2 วิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาด้วยเทคนิค Light Scattering analyzer

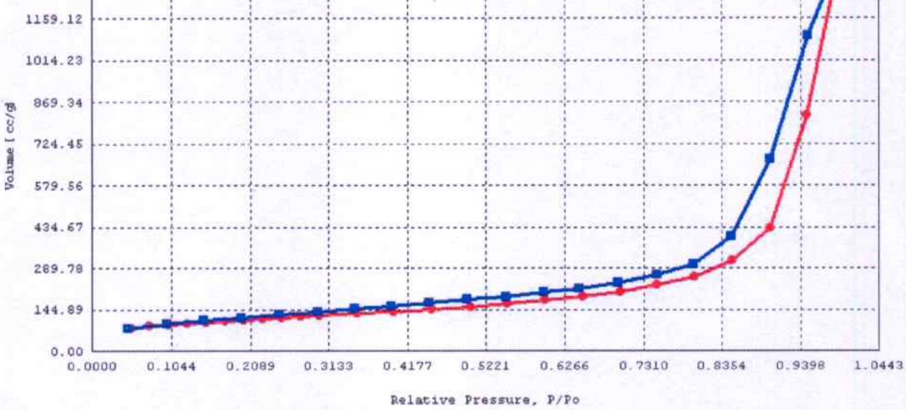
ผลการศึกษาการกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมขึ้นจากแกลบข้าวที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 200 เมช ด้วยเทคนิค light scattering analysis พบว่าอนุภาคซิลิกาส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 16.2 μm เส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคที่ 10-90% จะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 5.9-45.4 μm ดังแสดงในรูปที่ 4.2



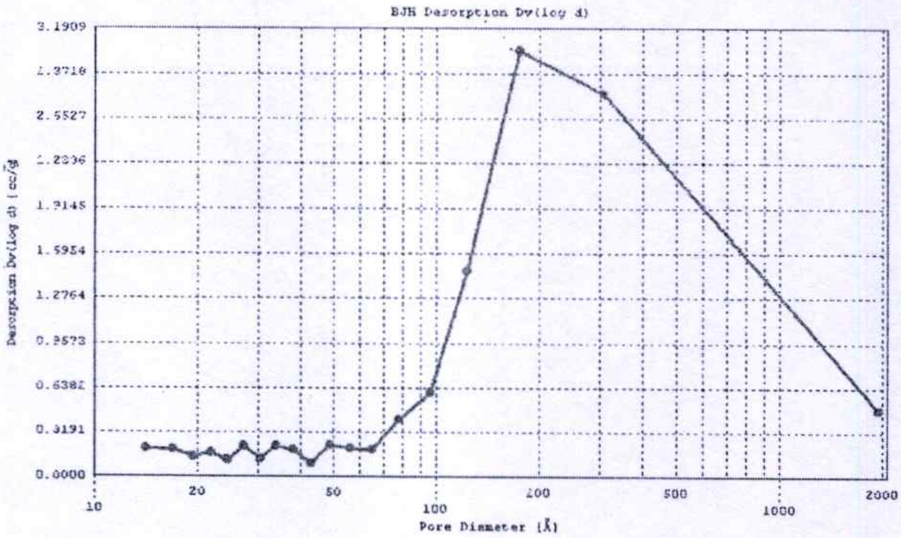
รูปที่ 4.2 การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว

4.1.3 วิเคราะห์หาปริมาณพื้นที่ผิวและขนาดของรูพรุนอนุภาคซิลิกาด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer

ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4



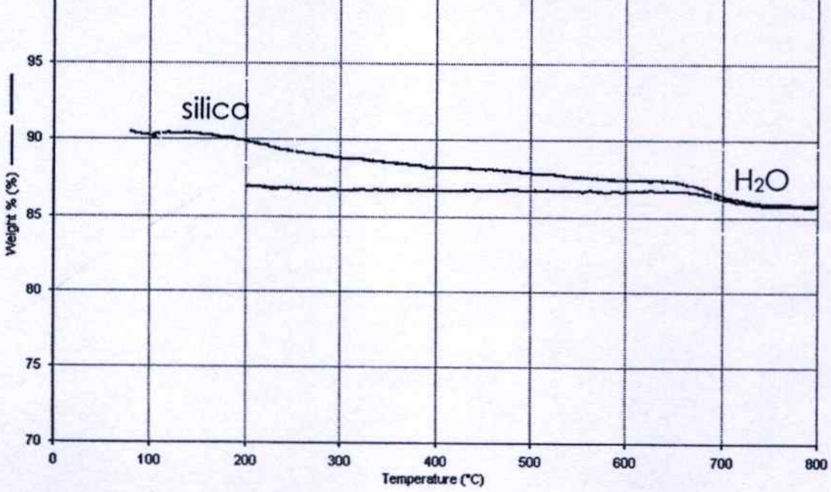
รูปที่ 4. 3 ไอโซเทอมที่ได้จากการแอดซอร์บและดีซอร์บแก๊สไนโตรเจนของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้จากแกลบข้าว โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer



รูปที่ 4.4 BJH desorption DV (log d) polt ของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer

จากผลการวิเคราะห์อนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าวซึ่งผ่านตะแกรงร่อนขนาด 200 เมช ด้วยเครื่อง Surface area Analyzer ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4 พบว่าอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มีพื้นที่ผิวประมาณ 386.43 m^2/g และขนาดรูพรุน (pore diameter) ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 175 Å

4.1.4 วิเคราะห์การเปลี่ยนเฟสอนุภาคซิลิกาด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis



รูปที่ 4.5 กราฟTG แสดงการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกาที่เตรียมขึ้นจากแกลบข้าว

ผลการวิเคราะห์ซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าวด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis ดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าน้ำหนักที่สูญหาย (Weight loss) ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 200ºC จะเกิดสูญเสียน้ำหรือสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในซิลิกา โดยร้อยละน้ำหนักที่สูญหาย (% Weight loss) จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 200–700°C

4.1.5 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันอนุภาคซิลิกาด้วยเทคนิค Fourier Transforms Infrared Spectrometry

สเปกตรัมของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมขึ้นจากแกลบข้าว แสดงดังในรูปที่ 4.6 ได้สเปกตรัมของการดูดกลืนที่สำคัญคือ

ก. หมู่ O–H ยืด ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลที่ประมาณ 3437 cm^{-1}

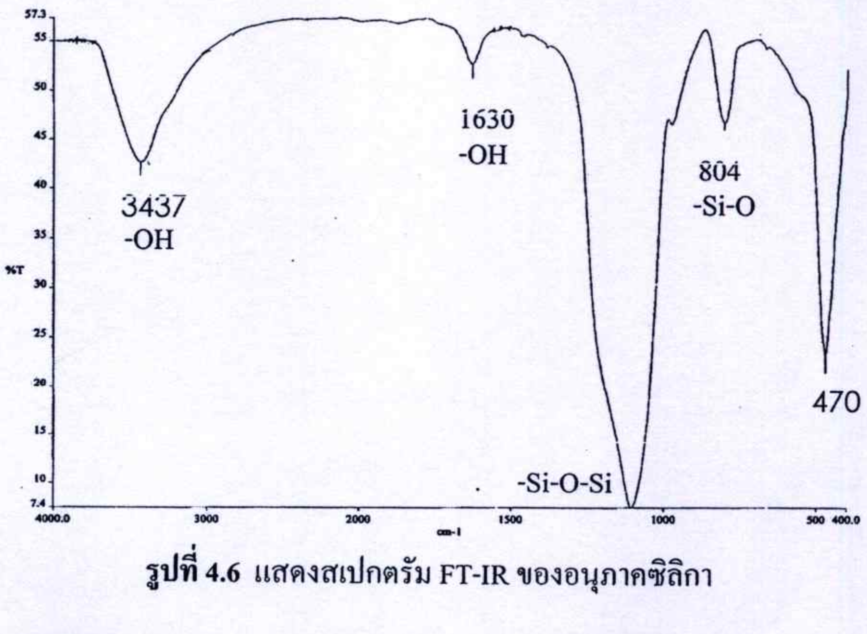
ข. แถบ O–H งอในระนาบประมาณ 1630 cm^{-1}

ค. แถบการสั่นของ Si–O–Si อยู่ในระนาบประมาณ 1100 cm^{-1}

ง. แถบการสั่นของ Si–O อยู่ในระนาบประมาณ 804 cm^{-1}

เปรียบเทียบสเปกตรัมของซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าวกับซิลิกาทางการค้า [15,30] มีข้อมูลดังนี้

- เลขคลื่น 3500 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ O-H
- เลขคลื่น 1600 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ O-H
- เลขคลื่น 1100 cm^{-1} เกิดจากการสั่นของ Si-O-Si
- เลขคลื่น 980 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH
- เลขคลื่น 800 cm^{-1} เกิดจากการสั่นของ Si-O



รูปที่ 4.6 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของอนุภาคซิลิกา

ดังนั้น จากผลการศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีในข้อ 4.1.1 ถึง 4.1.5 พบว่าซิลิกาที่เตรียมขึ้นมีคุณลักษณะทางกายโดยทั่วไปของของแข็งยึดเกาะหรือเฟสอยู่กับที่ที่ใช้สำหรับเป็นสารดูดซับในคอลัมน์ SPE คือ มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 40.0-100.0 μm ซึ่งเป็นขนาดที่สารละลายสามารถไหลผ่านได้ด้วยแรงโน้มถ่วง ไม่จำเป็นต้องใช้แรงดันสูงช่วยและลักษณะรูปร่างไม่จำเป็นต้องเป็นทรงกลม ซิลิกาที่เตรียมได้จากแกลบข้าวในงานวิจัยนี้น่าจะมีคุณลักษณะทางกายภาพที่เหมาะจะใช้เป็นของแข็งยึดเกาะให้กับสารออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนได้

4.2 การสังเคราะห์ซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน

4.2.1 การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope

ลักษณะรูปร่างและพื้นผิวอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่ามีลักษณะพื้นผิวไม่เรียบเกิดขึ้นบนพื้นผิวซิลิกา ขนาดอนุภาคไม่สม่ำเสมอและรูปร่างของอนุภาคไม่แน่นอน

รูปที่ 4.7 ลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน โดยผ่านการร่อนด้วยตะแกรงคัดขนาด 200 เมช

4.2.2 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนด้วยเทคนิค Fourier Transforms Infrared Spectrometry

จากสเปกตรัมของอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนได้สเปกตรัมคือ

ก. หมู่ O–H ยืด ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลที่ 3449 cm^{-1}

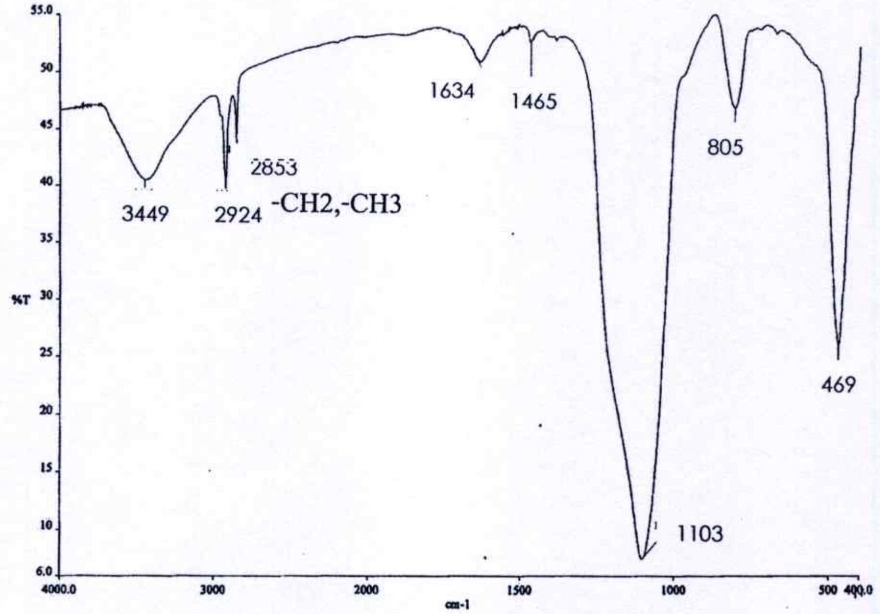
ข. แถบ O–H งอในระนาบประมาณ 1634 cm^{-1}

ค. แถบการสั่นของ Si–O–Si อยู่ในระนาบประมาณ 1103 cm^{-1}

ง. แถบการสั่นแบบงอของหมู่ $-CH_3$ และ $-CH_2$ 1350-1460 cm^{-1}

เปรียบเทียบสเปกตรัมของซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าวกับซิลิกาทางการค้า [50,54] มีข้อมูลดังนี้

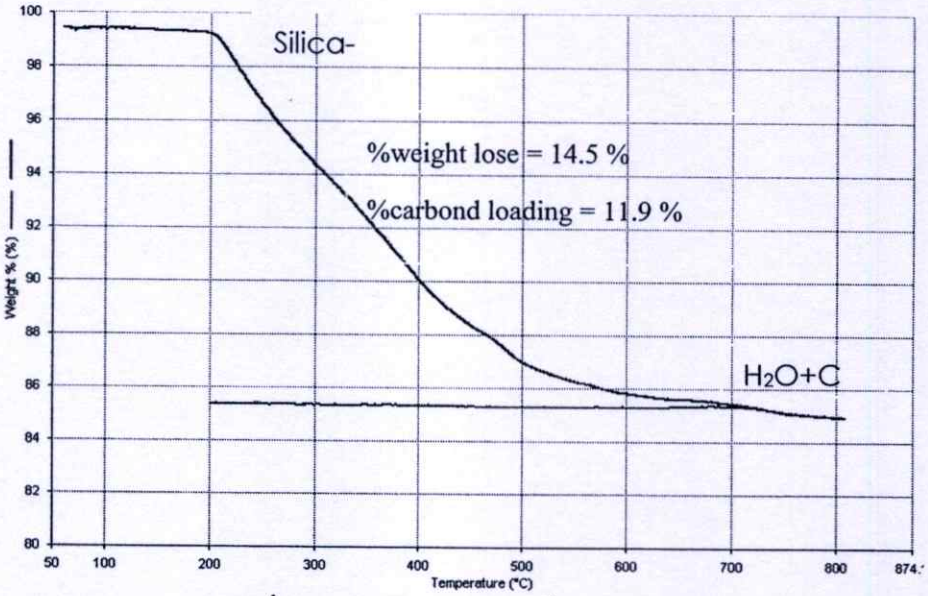
- ที่เลขคลื่น 3500 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น 1600 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น 1100 cm^{-1} เกิดจากการสั่นของ Si-O-Si
- ที่เลขคลื่น 980 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH
- ที่เลขคลื่น 800 cm^{-1} เกิดจากการสั่นของ Si-O



รูปที่ 4.8 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน

สเปกตรัมของซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนได้สเปกตรัมเพิ่มเติมจากสเปกตรัมของซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว (รูปที่ 4.6) คือ มีความเข้มเพิ่มขึ้นที่ช่วงเลขคลื่น 2992-2846 cm^{-1} และที่ช่วงเลขคลื่น 1350-1460 cm^{-1} เป็นผลของการสั่นแบบงอและแบบยืดของหมู่ $-CH_3$ และ $-CH_2$ ของ ODS และมีความเข้มลดลงที่ช่วงเลขคลื่น 3449 และ 1634 cm^{-1} ของหมู่ –OH และช่วงเลขคลื่น 805 cm^{-1} ซึ่งเป็นผลจากการสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH ของหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา แสดงว่าอนุภาคของซิลิกาได้สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน

4.2.3 วิเคราะห์การเปลี่ยนเฟสอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis



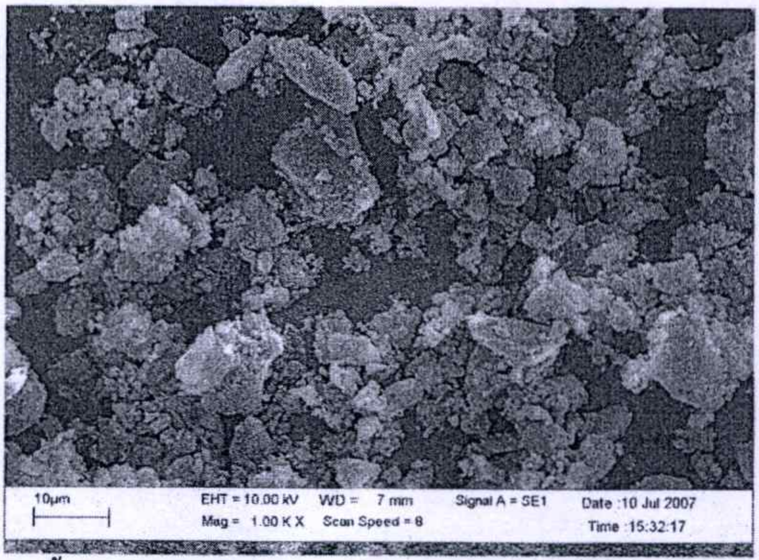
รูปที่ 4.9 กราฟ TG แสดงการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis พบว่าร้อยละน้ำหนักที่สูญหายอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 200–700°C ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าร้อยละ โดยน้ำหนักที่สูญหายมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกราฟของอนุภาคซิลิกาที่ไม่ได้ทำการสร้างพันธะ (รูปที่ 4.5) แสดงว่ามีการสร้างพันธะกับสารออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนบนพื้นผิวซิลิกาขึ้น พบว่าร้อยละน้ำหนักที่สูญหายไป (weight lose) เท่ากับ 14.5 % และ % carbond loading เท่ากับ 11.9 %

4.3 การสังเคราะห์ซิลิกา–ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน

4.3.1 การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลนด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope

อนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลนมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่ามีลักษณะพื้นผิวไม่เรียบ มีขนาดไม่สม่ำเสมอ รูปร่างของอนุภาคไม่แน่นอนเพิ่มมากกว่าซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน



รูปที่ 4.10 ลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน โดยผ่านการร่อนด้วยตะแกรงคัดขนาด 200 เมช

4.3.2 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลนด้วยเทคนิค Fourier Transforms Infrared Spectrometry

จากสเปกตรัมของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลนได้สเปกตรัมมีการดูดกลืนดังนี้

ก. หมู่ O–H ยืด ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลที่ 3449 cm^{-1}

ข. แถบ O–H งอในระนาบประมาณ 1634 cm^{-1}

ค. แถบการสั่นของ Si–O–Si อยู่ในระนาบประมาณ 1103 cm^{-1}

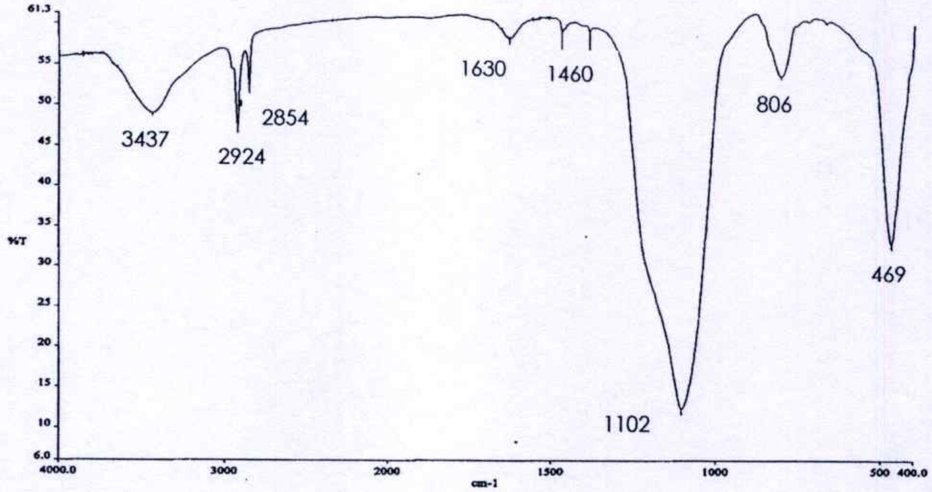
ง. แถบการสั่นแบบยืดของหมู่ $–CH_3$ ที่ 2992-2846 cm^{-1}

จ. แถบการสั่นแบบงอของหมู่ $–CH_3$ และ $–CH_2$ 1350-1460 cm^{-1}

- ที่เลขคลื่น 3500 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น 1600 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น 1100 cm^{-1} เกิดจากการสั่นของ Si-O-Si
- ที่เลขคลื่น 980 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH
- ที่เลขคลื่น 800 cm^{-1} เกิดจากการสั่นของ Si-O

สเปกตรัมของซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลนได้สเปกตรัมเพิ่มเติมจากสเปกตรัมของซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน ดังแสดงในรูปที่ 4.11 คือ พีคที่เลขคลื่น 2992-2846 cm^{-1} และ 1350-1460 cm^{-1} มีความเข้มเพิ่มมากขึ้นเป็นผลของการสั่นแบบยืดของหมู่ $–CH_3$ ของ TMCS และที่ช่วงเลขคลื่น 800 cm^{-1} ซึ่งเกิดจาก

การสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH และช่วงเลขคลื่น 3449 และ 1634 cm^{-1} ของหมู่ –OH ของหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกามีความเข้มลดลง เมื่อเทียบกับสเปกตรัมซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน ดังนั้นจึงสรุปว่าอนุภาคของซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนถูกปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน



รูปที่ 4.11 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน

4.2.3 วิเคราะห์การเปลี่ยนเฟสของอนุภาคซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลนด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis

รูปที่ 4.12 กราฟ TG แสดงซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน

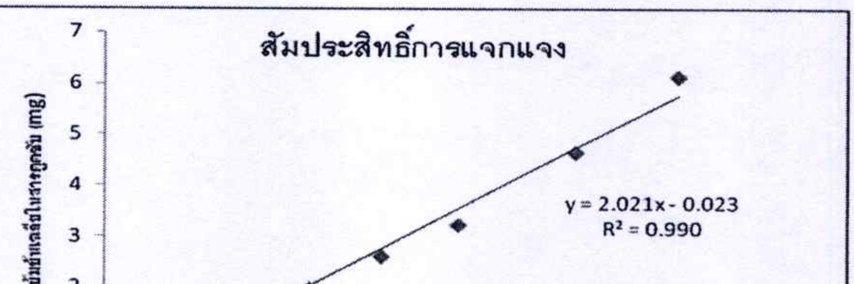
ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis พบว่าร้อยละน้ำหนักที่สูญหายอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 200–700 °C ดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าร้อยละโดยน้ำหนักที่สูญหายมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกราฟของอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะกับออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน (รูปที่ 4.9) พบว่าร้อยละน้ำหนักที่สูญหายไป (weight lose) เท่ากับ 15.8 % และ % carbond loading เท่ากับ 12.9% แสดงว่ามีการสร้างพันธะกับสารไทรเมทิลคลอโรไซเลนบนพื้นผิวซิลิกา-ออคทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนขึ้น โดยมีผลต่างเพิ่มขึ้น คือ มี %weight lose เท่ากับ 1.3% และมี carbon load เพิ่มขึ้น 1.1%

4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพคอลัมน์ SPE-C18

ศึกษาประสิทธิภาพทางโครมาโทกราฟีของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น โดยนำสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์มาผ่านการสกัดด้วยคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น และตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ด้วยเครื่อง HPLC ดังแสดงในการทดลองข้อที่ 3.3.6

เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณพารามิเตอร์ต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก ฌ และ ญ ได้ผลดังนี้ คือ

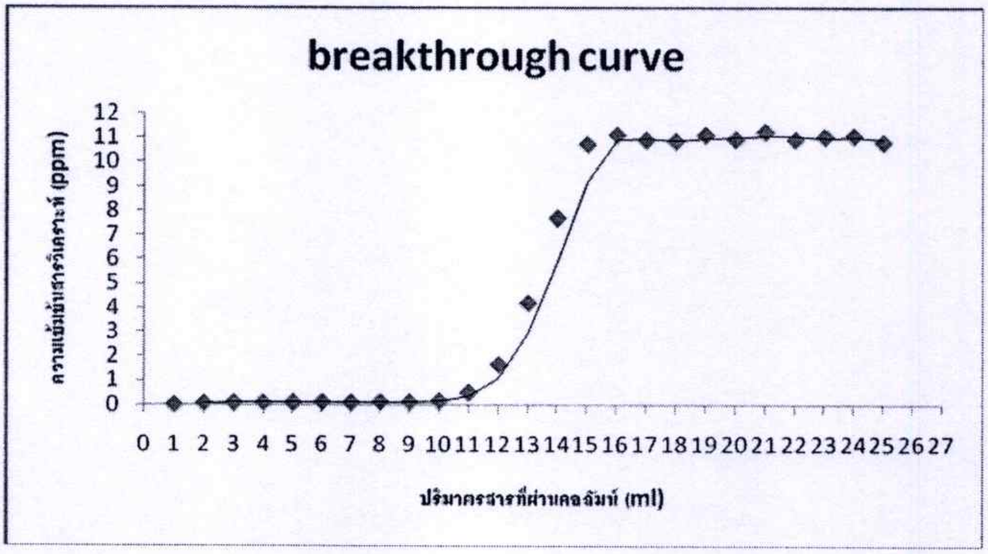
1) ค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution coefficient, K_D) เป็นค่าคงที่ที่บอกถึงสมดุลการกระจายตัวของสารระหว่างเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่ เมื่อนำความเข้มข้นของเททราซัยคลินที่กระจายตัวในสารดูดซับและเฟสเคลื่อนที่แทนด้วย C_s และ C_m ตามลำดับ มาพลอตกราฟได้กราฟที่เรียกว่า ไอโซเทอมการแจกแจง (Distribution isotherms) ดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ไอโซเทอมการแจกแจงของเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์

ความชันของกราฟรูปที่ 4.13 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจงของสารมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ ถ้าความชันมีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่า สารที่ต้องการแยกมีการกระจายตัวอยู่ในเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่สม่ำเสมอตลอดการแยกจากคอลัมน์ จากผลการทดลองค่า K_D เท่ากับ 2.02 แสดงว่าสารดูดซับยึดจับของสารได้มากว่าในเฟสเคลื่อนที่ และกราฟในรูปที่ 4.13 เป็นเส้นตรง แสดงว่า เททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์มีการกระจายตัวอยู่ในซิลิกา-C18 และเฟสเคลื่อนที่อย่างคงที่

2) ค่า Breakthrough (V_B) เป็นการหาจุดที่เกิดการอิ่มตัวของสารดูดซับในการทดลอง ใช้สารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 10.00 ppm ปริมาตร 25.00 mL ทำการทดลองกับสารดูดหนัก 0.5000 g ดังแสดงในข้อที่ 3.3.6.2 ได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 4.14 และได้ผลการทดลองดังแสดงในภาคผนวก ญ. เมื่อพลอตกราฟระหว่างปริมาตรสารที่ผ่านคอลัมน์โดยเก็บทุกๆ 1.00 mL กับความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้



รูปที่ 4.14 Breakthrough curve ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์

จากกราฟสามารถหาค่า V_B พบว่าที่ปริมาตร 11.20 mL เป็นจุดต่ำสุดที่สารดูดซับเริ่มไม่สามารถดูดซับสารได้ 100.0% แสดงว่า สารมาตรฐานจะไม่สามารถถูกดูดซับกับสารดูดซับได้ทั้งหมด มีบางส่วนของเนื้อสารเริ่มหลุดออกจากคอลัมน์ และจุดที่สารดูดซับหมดสภาพในการดูดซับ (Exhaustion,V_E) ไม่สามารถดูดซับได้อีก มีค่าตั้งแต่ 15.00 mL แสดงว่าเป็นปริมาตรสูงสุดที่สารดูดซับสามารถทำการดูดซับสารมาตรฐานได้

3) ค่าแฟกเตอร์ความจุ (Capacity factor, k′) เป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าสารที่ต้องการถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า k′ คือ เฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเฟสอยู่กับที่มีคุณสมบัติในการหน่วงเหนี่ยวสารวิเคราะห์ได้ดีก็จะมีค่า k′ ที่สูง ปกติค่า k′ จะอยู่

ในช่วง $1 \leq k' \leq 10$ จากการทดลองพบว่า ค่า k′ ที่คำนวณได้ดังแสดงในภาคผนวก ญ. เท่ากับ 4.78 ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (k' = 1-10) แสดงว่า สารที่ต้องการถูกหน่วงเหนี่ยวหรือรีเทนอยู่ในคอลัมน์ได้ดี

4) จำนวนเพลทตามทฤษฎี (Number of theoretical plates of the column, N) เป็นค่าที่บอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ว่ามีการดูดซับได้ดีเพียงใด ตามหลักการของวิธีโครมาโทกราฟีแล้ว ค่าจำนวนเพลทตามทฤษฎีสำหรับคอลัมน์ SPE-C18 แล้ว จะมีค่า ≤ 20 ซึ่งจากผลการทดลองและคำนวณในภาคผนวก ญ. พบว่าค่า N ที่ได้มีค่าเท่ากับ 8.97 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้

4.5 ผลการทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18

ผลการทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18 ดังแสดงในการทดลองข้อที่ 3.3.7 ได้ผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ของคอลัมน์ SPE-C18 ดังนี้

1) System linearity โดยทำการทดลองดังในข้อที่ 3.3.7.1 ตอน 1 พบว่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์สูงสุดที่คอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นดูดซับได้สูงสุดเท่ากับ 8.00 ppm ในขณะที่คอลัมน์ SPE-C18 สามารถดูดซับได้สูงสุดถึง 15.00 ppm และเมื่อใช้วิธี paired-t-test ในการทดสอบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากคอลัมน์ SPE-C18 ทั้งสองชนิดดังแสดงในภาคผนวก ฎ. พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 0.30 โดยค่า t จากตารางที่ระดับความมั่นใจ 95.0% และที่ระดับขั้นเสรี (n-1; 15-1 = 14) เท่ากับ 2.14 พบว่า ค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าคอลัมน์ SPE-C18 ทั้ง 2 ชนิดให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2) ค่า Method linearity ได้ผลการทดลองโดยใช้สารละลาย spiked sample 3 ตัวอย่าง คือ A, B และ C ดังในการทดลองข้อที่ 3.3.7.1 ตอน 2 พบว่าเมื่อใช้วิธี paired-t-test ทดสอบ ค่าผลที่ได้จากตัวอย่าง A, B และ C ที่ใช้วิธีการสกัดด้วยคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าได้ค่า t เท่ากับ 2.58, -1.32 และ -0.23 ตามลำดับ โดยค่า t จากตารางที่ระดับความมั่นใจ 95.0% และที่ระดับขั้นเสรี (n-1; 6-1 = 5) มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า ค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าคอลัมน์ SPE-C18 ทั้ง 2 ชนิดให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3) ความถูกต้อง (accuracy) ทดสอบโดยใช้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของเททราซัยคลินในช่วง 0.05-8.00 ppm ทำการทดลองดังในข้อที่ 3.3.7.1 ตอน 1 ได้ผลดังแสดงในภาคผนวก ฒ. พบว่า ร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ของคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น เท่ากับ 56.0-97.0% และ 77.0-98.0% ตามลำดับ

4) ความเที่ยง (precision) นำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากข้อที่ 3.3.7.2 มาคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ฒ.โดยทำการเปรียบเทียบในลักษณะของความทวนซ้ำได้ (repeatability, n = 7) ในตัวอย่างจำนวน 3 ชุด และความทนซ้ำได้ (reproducibility, n = 3) ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

เททราซัยคลิน 5.00 ppm ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าที่ไม่ได้นำมาใช้ซ้ำและนำมาใช้งานซ้ำดังแสดงในตาราง 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าที่ไม่ได้นำมาใช้ซ้ำ

คอลัมน์ SPE-C18	ตัวอย่างที่	repeatability			reproducibility		
		$\%RSD_{obs}$	$\%RSD_r$	HORRAT	$\%RSD_{obs}$	$\%RSD_R$	HORRAT
ทางการค้า	1	2.97	8.34	0.36	1.86	12.60	0.15
	2	6.86	8.31	0.83			
	3	9.09	8.29	1.10			
ที่เตรียมขึ้น	1	10.01	8.42	1.19	1.99	12.73	0.16
	2	7.19	8.37	0.86			
	3	9.80	8.41	1.16			

ตารางที่ 4.2 ผลร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าที่นำมาใช้งานซ้ำ

คอลัมน์ SPE-C18	ตัวอย่างที่	Repeatability			Reproducibility		
		$\%RSD_{obs}$	$\%RSD_r$	HORRAT	$\%RSD_{obs}$	$\%RSD_R$	HORRAT
ทางการค้า	1	5.21	8.32	0.63	2.73	12.66	0.22
	2	6.82	8.39	0.81			
	3	7.11	8.36	0.85			
ที่เตรียมขึ้น	1	5.84	8.40	0.70	2.80	12.79	0.22
	2	14.96	8.46	1.77			
	3	17.36	8.46	2.05			

พบว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันและนำค่าความเที่ยงที่ได้มาประเมินว่ายอมรับได้หรือไม่ โดยใช้ Horwitz equation ดังแสดงในภาคผนวก ฒ. หาค่า Horrat จากการคำนวณพบว่า มีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (≤ 2) แสดงว่า คอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นมีความเที่ยงที่ยอมรับได้

5) ขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection, LOD) และขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ (Limit of Quantitation, LOQ) นำผลที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.3.7.4 มาคำนวณค่า LOD และ LOQ ดังแสดงในภาคผนวก ฐ. จากตัวอย่างตับหมู 3 ตัวอย่าง A, B และ C เติมสารมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (spiked sample) สรุปผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผล LOQ และ LOQ ของสารเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

คอลัมน์ SPE-C18	ตัวอย่างที่	S_b(ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
ทางการค้า	1	0.19	0.22	0.75
	2	-1.60	0.31	1.03
	3	0.18	0.40	1.34
ที่เตรียมขึ้น	1	0.17	0.02	0.06
	2	0.08	0.13	0.41
	3	0.24	0.67	2.24

6) ปริมาณเททราซัยคลินในตัวอย่างตับหมู A, B และ C โดยทำการทดลองดังในข้อที่ 3.3.8 ได้ผลดังแสดงในภาคผนวก ฏ พบว่าความเข้มข้นเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น ในตัวอย่างตับหมู A, B และ C เท่ากับ 0.68, 0.63 และ 0.63 ppm ตามลำดับ และในคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า เท่ากับ 0.74, 0.69 และ 0.55 ppm ตามลำดับ

ข้อมูลการทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18 สรุปได้ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

พารามิเตอร์		คอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า	คอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น
System linearity	Equation	y = 925.1x	y = 933.7x
	R^2	0.999	0.999
	Range (ppm)	0.05-15.00	0.05-8.00
Method linearity	Equation	$y = 967.3x + 407.0_a$	$y = 832.0x + 714.8_a$
		$y = 886.5x + 661._b$	$y = 895.2x + 725.1_b$
		$y = 940.2x + 413.6_c$	$y = 898.7x + 596.0_c$
	R^2	0.995_a	0.986_a
		0.996_b	0.990_b
		0.999_c	0.994_c
	Range (ppm)	1.00-9.00	1.00-9.00
Accuracy	% Recovery	56-97	77-98
Precision	% RSD	1.86_d	1.99_d
		2.72_e	2.80_e
LOD	(ppm)	0.22_a	0.75_a
		0.31_b	1.03_b
		0.40_c	1.34_c
LOQ	(ppm)	0.02_a	0.06_a
		0.13_b	0.41_b
		0.67_c	2.24
ปริมาณในตัวอย่าง	A (ppm)	0.74	0.68
	B	0.69	0.63
	C	0.55	0.63

หมายเหตุ : a = ตัวอย่างตับหมู A, b = ตัวอย่างตับหมู B, c = ตัวอย่างตับหมู C, d = คอลัมน์ที่ไม่ได้ใช้ซ้ำ, e = คอลัมน์ที่ใช้ซ้ำ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยนี้พบว่า ซิลิกาที่เตรียมขึ้นจากแกลบข้าวเมื่อนำซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าวที่ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 200 เมช มีลักษณะพื้นผิวเรียบ มีความเป็นรูพรุน ขนาดไม่สม่ำเสมอและรูปร่างอนุภาคไม่เป็นทรงกลม เมื่อนำมาสร้างพันธะกับสารออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน (octadecyltrichlorosilane, ODS) และปิดปลายที่ว่องไวของหมู่ที่เหลือ (end capping) ด้วยสารไทรเมทิลคลอโรไซเลน (trimethylchlorosilane, TMCS) แล้วนำไปบรรจุกระบอกฉีดยาขนาด 3.00 mL (50 X 6 mm i.d.) และถูกทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานได้ โดยตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีและค่าทางสถิติ โดยทดลองกับสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์และสารละลายตัวอย่างตับหมู โดยใช้สารละลายกรดเมทานอลิกออกซาลิกเป็นตัวชะขณะทำการสกัดและตรวจวัดปริมาณเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า คอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นมีค่าสัมประสิทธิการแจกแจง (K_D) เท่ากับ 2.02 breakthrough (V_B) เท่ากับ 11.20 mL แฟกเตอร์ความจุ (k') เท่ากับ 4.78 และจำนวนเพลททางทฤษฎี (N) เท่ากับ 8.97 นอกจากนี้ทำการทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า โดยใช้สารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ พบว่า ค่าความเป็นเส้นตรงของระบบ (system linearity) ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ 21 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 0.05-35.00 ppm ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้า พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999 และ 0.999 ตามลำดับ เมื่อใช้ตัวอย่างตับหมูจากแหล่งตัวอย่าง 3 แหล่ง คือ A, B และ C พบว่าค่าความเป็นเส้นตรงของระบบ (method linearity) เท่ากับ 0.986, 0.990 และ 0.994 ตามลำดับ สำหรับคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น และเท่ากับ 0.995, 0.996 และ 0.999 ตามลำดับ สำหรับคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 77.0-98.0% สำหรับคอลัมน์ที่เตรียมขึ้นและ 56.0-97.0% สำหรับคอลัมน์ทางการค้า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ที่แสดงความทวนซ้ำได้ (repeatability) จากการทดลอง 3 วัน ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นเท่ากับ 10.00, 7.91 และ 9.80 ตามลำดับ สำหรับคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าเท่ากับ 2.97, 6.85 และ 9.09 ตามลำดับ เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ที่แสดงความทำซ้ำได้ (reproducibility) ของผลการทดลองรวม 3 วัน ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้าเท่ากับ 1.99 และ 1.89 ตามลำดับ พบว่าความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้และนำมาประเมินความเที่ยงของคอลัมน์ SPE ทางการค้าและที่เตรียมขึ้นโดยใช้วิธี paired-t-test และ Horrat พบว่าไม่มี

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 95% ขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ (LOD) สำหรับคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าที่ทดลองกับตัวอย่างตับหมู 3 แหล่ง เท่ากับ 0.22, 0.31 และ 0.40 ppm ตามลำดับ และของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น เท่ากับ 0.75, 1.03 และ 1.34 ppm ตามลำดับ ขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ (LOQ) ของตัวอย่าง 3 ชุดในคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า เท่ากับ 0.02, 0.13 และ 0.67 ppm ตามลำดับและคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น เท่ากับ 0.06, 0.41 และ 2.24 ppm ตามลำดับ

สรุปได้ว่าจากค่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีและค่าทางสถิติที่ได้จากการทดสอบความใช้ได้ของคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมได้จากงานวิจัย มีค่าพารามิเตอร์และค่าทางสถิติอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้และสามารถนำคอลัมน์ไปประยุกต์ใช้กับงานวิเคราะห์ตัวอย่างจริงที่มีช่วงความเข้มข้น 1.00-8.00 ppm

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อๆ ไป คือ ในการผลิตคอลัมน์ SPE-C18 ในเชิงพาณิชย์ ควรมีการปรับปรุงซิลิกาให้มีพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น มีความคงตัว ไม่แตกหักได้ง่าย ซึ่งจะทำให้คอลัมน์มีประสิทธิภาพสูงมากยิ่งขึ้น อีกทั้งกระบวนการสร้างพันธะกับสารออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน ซึ่งอนุภาคที่ผ่านการสร้างพันธะในกระบวนการผลิตจะมีสีขุ่นกว่าคอลัมน์ทางการค้า

เอกสารอ้างอิง

[1] Anne E. Egger. **"The Silicates."** [Online]. Available http://www.visionlearning. Com/library/module_viewer.php?mid=140&1=&c3=.2006

[2] Chang Raymond, " **Chemistry** " 6th ed. Boston, MA : WCB/McGraw-Hill.c1998.

[3] Michel Prassas. **"Silica Glass from Aerogels."** [Online]. Available: http://www.solgel.com/articles/april01/aerogl.htm.2006

[4] D. Jedsadapattarakul., **"Production of high purity silica from rice husk as a solid support for HPLC and GC".** Thesis for degree of master of science in chemistry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, 2004.

[5] L.R. Snyder, J.J Kirkland and J.L. Glajch, **"Practical HPLC Method Development.**" 2nd ed. New York : John Wiley & Sons Inc., 1997.

[6] J.J. Pesek and M.T. Matyska, **"Solid Phase Extraction."** New Tork : Simson (Ed.) Inc., 2000.

[7] Thurman and Mills, **"Solid phase extraction : principle and practice."** 10th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1998.

[8] Nigel J.K. Simpson, "**Solid Phase Extraction.**" 10th ed. Marcel Dekker, 2000.

[9] H.H. Bauer, G.D. Christian and J.E. O'Reilly, **"Instrumental Analysis",** Allyn and Bacon, 1978

[10] A.A.M. Stolker, **"Current trends and development in sample preration."** [Online] Available: http://www.euroresidue.nl/ER_IV/Key%20lectures/Stolker%20148-158.pdf

[11] Bulletin 910 "Guide to Solid Phase Extraction" [Online] Available: http://www. Sigma-Aldrich.com

[12] Vertical, **"SPE Intoduction"** [Online] Available: http://www.vertichrom.com

[13] Charlton Scientific Ltd, **"Introduction to Solid Phase Extraction"** [Online] Available: http://www.charltonsci.co.uk

[14] Prof. Dr. A. Seubert, Priv.-Doz. Dr. W. Frenel, Dr. H. Schafer, G. Bogenschutz and J. Schafer, **"sample preparation technical for ion chromatography."** [Online] Available: http://www. metrohm-peak.com/pdf/8_025_5003_sampleprep.pdf

[15] M.A. Ramos, M.H. Gil, E. Schacht, G. Matthys, W. Mondelaers and M.M. Figueiredo, **"Physical and chemical characterisation of some silicas and silica derivatives",** Powder Technology, Vol. 99, pp. 79-85, 1998.

[16] Collin R. Anderson, Heidi S. Rupp and Wen-Hsin Wu, **"Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography."** Journal of Chromatography A, 1075 (2005) 23–32.

[17] David A. Williams, Thomas L. Lemke, **"Principles of medicinal chemistry."** 5th ed., Lippincotl Williams & Wilkins, 2002

[18] Goodman LS and Gilman A,. **"Tetracyclines. In : Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics."** New York: Pergamon Press, (1990) 1117-1125.

[19] Hisao Oka, Yuko Ito and Hiroshi Matsumoto, **"Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods"** Journal of Chromatography A, 882 (2000) 109–133

[20] Jiantao Li, Ligang Chen, Xiao Wang, Haiyan Jin, Lan Ding, Kun Zhang and Hanqi Zhang, **"Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography"**, Talanta 75 (2008) 1245–1252

[21] Tao Jing, Xiao Dan Gao, Peng Wang, Yan Wang, Yan Fei Lin, Xu Chen zong, Yi Kai Zhou and Su Rong Mei, **"Preparation of high selective molecularly imprinted polymers for tetracycline by precipitation polymerization",** Chinese Chemical Letters 18 (2007) 1535–1538

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

[23] Eugen S. Andreiadis, **"Breakthrough Curves : Determination of Specific Parameter"** Chemical Engineering Department, Polytechnic University of Bucharest, 2004.

[24] AOAC Official Method 995.09 : Chlortetracycline, Oxytetracycline and Tetracycline in Edible Animal Tissues, Liquid Chromatographic Method. AOAC Internation, 2000.

[25] อมรรัศมี จิณรักษ์ **"การเตรียมคอลัมน์ SILICA-ODS จากแกลบข้าวโดยวิธีไมเซลล์สำหรับเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง"** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ,2550

[26] Kenvin D. Wyndgam, John E. Ogara and Thomas H. Walter. **"Characterization and Evaluation of C_{18} HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/inorganic Particles"** Anal. Chem., Vol. 75, pp.6181-6788, 2003.

[27] Y. Sudo, **"End-capping of octadecylsilylated silica gels by high-temperature silylation"** J. Chromatogr.A, Vol.737, pp.139-147, 1996.

[28] Neli D. Danielson and J.J. Kirkland, **"Synthesis and characterization of 2-μm Wide-Pore Silica Microspheres as Column Packings for the Reversed-Phase Liquid Chromatography of Peptides and Proteins"** Anal. Chem., Vol.59, pp.2501-2506, 1987.

[29] Mustafa Tabakci and Mustafa Yilmaz, **"Sorption characteristics of Cu(II) ions onto silica gel-immobilized calix[4]arene polymer in aqueous solutions: Batch and column studies"** J. Hazardous Materials, Vol.151, pp.331–338, 2008.

[30] RPW Scott, **"The Structure of Silica Gel"** " [Online] Available: http://www.chromatographyonline.org/HPLC/Stationary-Phases/Silica-Gel/Structure/rs44.html.2006

[31] K. Jones, **"Optimization procedure for the silanisation of silicas for reversed-phase High Performance Liquid Chromatography"**, J. Chromatogr., vol.392, pp. 1-10, 1987.

[32] คณิตา ตังคณานุรักษ์, **"เทคนิคการแยกสารเคมี"** โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2540.

[33] SKoog D.A.., West, D/M., Holler, and Crouch, **"Fundamental of Analytical Chemisty"** 8^{th} ed., Australia : Thomson/Brooks/Cole, 2004.

[34] ชุติมา ศรีวิบูลย์, **"การวิเคราะห์โดยเครื่องมือโครมาโทกราฟี"** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2540.

[35] Adelaide University, **"Chromatographic Resolution"** [Online] Available: http://www.chemistry.adelaide.edu.au/.../reaolution1.htm.

[36] Daniel C.Harris, **"Quantitative chemical analysis"** 6^{th} ed., New York : W.H.Freeman, pp.548-679, 2003.

[37] ปิยมาภรณ์ จารุวงศ์, **“การดูดซับสารอินทรีย์จากน้ำโดยใช้แร่ดินมอนต์มอริลโลไนต์”**, วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2545

[38] Mea A. Weinberg and Michael Bral, **“Tetracycline and its Analogues : A therapeutic paradigm in periodontal diseases”** [Online] Available: http://crobm.iadrjournals.org/cgi/content/abstract/9/3/322

[39] D. Dietz, Ph.D., **“Toxicology and Carcinogenesis Studies of Tetracyclines Hydrochloride.”** National Institutes of Health, 1989.

[40] Alex Gringaus, **“Introduction to medicinal chemistry.”** 10th ed., Wiley-VCH, 1997.

[41] Uwe D. Neve and Patrick D. McDonal, **“Topics of solid-phase extraction”** [Online] Available: http://www.water.com

[42] E. Bascetin, H. Haznedaroglu and A.Y. Erkol, **“The adsorption behavior of cesium on silica gel.”** Applied Radiation and Isotopes 59, (2003) 5–9

[43] กมลชัย ตรงวานิชนาม, **“การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์”** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ครั้งที่ 2, 2543.

[44] J. David Sunseri, William T. Cooper and John G. Dorsey, **“Reducing residual silanol interactions in reversed-phase liquid chromatography : Thermal treatment of silica before derivatization.”** Journal of Chromatography A, 1011 (2003) 23–29

[45] I. Rodr´ıguez, M.P. Llompart and R. Cela, **“Solid-phase extraction of phenols”** Journal of Chromatography A, 885 (2000) 291–304

[46] Rick W. Fedeniuk and Phyllis J. Shand, **“Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices”** Journal of Chromatography A, 812 (1998) 3–15

[47] G. Stubbings, J.A. Tarbin and G. Shearer, **“On-line metal chelate affinity chromatography clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal tissues”** Journal of Chromatography B, 679 (1996) 137-145

[48] Sorelis Nieto Zambrano, **“Tetracycline (TC) adsorption from aqueous solutions”,** Thesis for degree of master of science in chemistry, University of Puerto Rico Mayaguez Campus, 2006.

[49] Frank J. Schencka and Patrick S. Callery, **"Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk"** Journal of Chromatography A, 812 (1998) 99–109

[50] Dr.weber, **"SPE Modes of Operation"** " [Online] Available: http://www.teknolab.no/pdf/IST_SPE_modes_of_operation.pdf

[51] **"Crystalline Silica Primer"** [Online] Available: http://www. minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/silica/780292.pdf

[52] Mustafa Tabakci and Mustafa Yilmaz, **"Sorption characteristics of Cu(II) ions onto silica gel-immobilized calix[4]arene polymer in aqueous solutions: Batch and column studies"** Journal of Hazardous Materials 151 (2008) 331–338

[53] Chopra, **"Mode of action of the tetracyclines and the nature of bacterial resistance to them. In : The tetracyclines."** Berlin : Springer-Verlag, (1985) 317-322.

[54] อรุณฉาย อุนาศรี**"การศึกษาการเตรียมหลอดตรวจวัดปริมาณคลอรีนอิสระตกค้าง"** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,2550

[55] ยุพดี หนูสาย **"การพัฒนาและการทดลองความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟินิลเอฟพริน โดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกัน ในยาเม็ดลดไข้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะ,"** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,2550

[56] Adapted from H.M. McNair and E.J. Bonelli, **"Basic Gas Chromatography"** Palo Alto,CA : Varian Instrume, 1968.

[57] จิระเดช ฮายุกต์ และ วิทยา เทพไพฑูรย์, **"การแยกของผสมเอทานอล-น้ำโดยกระบวนการดูดซับ"** [Online] Available: http://www.eppo.go.th/encon/abstract/index.html

[58] Khomsorn Lomthaisong, **"Introduction to Biochemical techniques"** [Online] Available: http://202.28.94.202/biochem/lecture_page/Introduction%20to%20Biochemical%20techniques.pdf

ภาคผนวก ก.

การคำนวณปริมาณหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

จากงานวิจัย [31] ซิลิกาที่ผ่านการให้ความร้อนที่ช่วงอุณหภูมิ 120-400°C จะมีหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา 4.6 หมู่ต่อตารางนาโนเมตร ดังนั้นจึงกำหนดหมู่ไซลานอลที่ใช้ในการสร้างพันธะบนพื้นผิวซิลิกาเท่ากับ 4.6 หมู่ต่อตารางนาโนเมตร ซึ่งซิลิกาที่ได้จากแกลบข้าวมีพื้นที่ผิว 386.43 m^2/g

คำนวณปริมาณหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

พื้นที่ผิว 1 ตารางนาโนเมตร มีหมู่ไซลานอล (-OH) เท่ากับ 4.6 หมู่

ถ้าพื้นที่ผิว 386.43×10^{18} ตารางนาโนเมตร มีหมู่ไซลานอล (-OH) เท่ากับ $\frac{386.43 \times 10^{18} \times 4.6}{1}$ หมู่

$\therefore$ พื้นที่ผิว 386.43×10^{18} ตารางนาโนเมตร มีหมู่ไซลานอล (-OH) เท่ากับ 1777.57×10^{18} หมู่

คำนวณจำนวนโมลของหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

จำนวนโมลของหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ $\frac{\text{(-OH บนผิวซิลิกา) หมู่}}{6.02 \times 10^{23}}$

จำนวนโมลของหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ $\frac{1777.57 \times 10^{18} \text{ หมู่}}{6.02 \times 10^{23}}$

$\therefore$ จำนวนโมลของหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ 295.27×10^{-5} โมล

ดังนั้น จำนวนโมลของหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกามี 295.27×10^{-5} โมล

ภาคผนวก ข.

การคำนวณปริมาณออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน (Octadecyltrichlorosilane, ODS) ในการสร้างพันธะกับไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

จากการนำซิลิกาไปสร้างพันธะกับ ODS หาจำนวนหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกาที่ถูกสร้างพันธะด้วย ODS ได้ ซึ่งจำนวนหมู่ไซลานอลที่คำนวณได้ ในภาคผนวก ก. เท่ากับ 295.28×10^{-5} โมลต่อตารางเมตร พื้นที่ผิวซิลิกา 386.43 m^2/g

คำนวณปริมาณ ODS กับหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

ปฏิกิริยาที่เกิดระหว่าง ODS กับหมู่ไซลานอลบนซิลิกา 1 กรัม คือ 1:3 ดังนั้นปริมาณของ ODS สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณ ODS (กรัม) เท่ากับ} \quad \frac{(\text{จำนวนโมลของหมู่-OH บนผิวซิลิกา} \times F.W._{ODS})}{3}$$

$$\text{ปริมาณ ODS (กรัม) เท่ากับ} \quad \frac{(295.2787 \times 10^{-5} \text{ โมล} \times 387.94 \text{ กรัมต่อโมล})}{3}$$

$\therefore$ ปริมาณ ODS (กรัม) เท่ากับ 38183.48×10^{-5} กรัม

คำนวณจำนวนโมล ODS กับหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

$$\text{จำนวนโมลของ ODS บนพื้นผิวซิลิกา (-OH)} \quad \text{เท่ากับ} \quad \frac{\text{มวล ODSบนผิวซิลิกา (กรัม)}}{\text{มวลโมเลกุล ODS (กรัมต่อโมล)}}$$

$$\text{จำนวนโมลของ ODS บนพื้นผิวซิลิกา (-OH)} \quad \text{เท่ากับ} \quad \frac{0.3818 \text{ กรัม}}{387.94}$$

$\therefore$ จำนวนโมลของ ODS บนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ 9.84×10^{-4} โมล

ดังนั้น ปริมาณ ODS (100%) ที่ใช้ในการสร้างพันธะกับซิลิกามีเท่ากับ 38183.48×10^{-5} กรัม หรือ 9.84×10^{-4} โมล ต่อซิลิกา 1.0000 กรัม

ภาคผนวก ค.

การคำนวณปริมาณไทรเมทิลคลอโรไซเลน (Trimethylchlorosilane, TMCS) ในการสร้างพันธะกับไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

คำนวณปริมาณ TMCS กับหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

ปฏิกิริยาที่เกิดระหว่าง TMCS กับหมู่ไซลานอลบนซิลิกา 1.0000 กรัม คือ 1:1 ดังนั้น ปริมาณของ TMCS สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณ TMCS (กรัม) เท่ากับ} \quad \frac{(\text{จำนวนโมลของหมู่-OH บนผิวซิลิกา} \times F.W._{TMCS})}{1}$$

$$\text{ปริมาณ TMCS (กรัม) เท่ากับ} \quad \frac{(295.28 \times 10^{-5} \text{ โมล} \times 108.64 \text{ กรัมต่อโมล})}{1}$$

$$\text{ปริมาณ TMCS (กรัม) เท่ากับ} \quad (295.28 \times 10^{-5} \times 108.64)$$

∴ ปริมาณ TMCS (กรัม) เท่ากับ 32079.08×10^{-5} กรัม

คำนวณจำนวนโมล TMCS กับหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา

$$\text{จำนวนโมลของ TMCS บนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ} \quad \frac{\text{มวล TMCS บนผิวซิลิกา (กรัม)}}{\text{มวลโมเลกุล TMCS (กรัมต่อโมล)}}$$

$$\text{จำนวนโมลของ TMCS บนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ} \quad \frac{32079.08 \times 10^{-5} \text{ โมล}}{108.64}$$

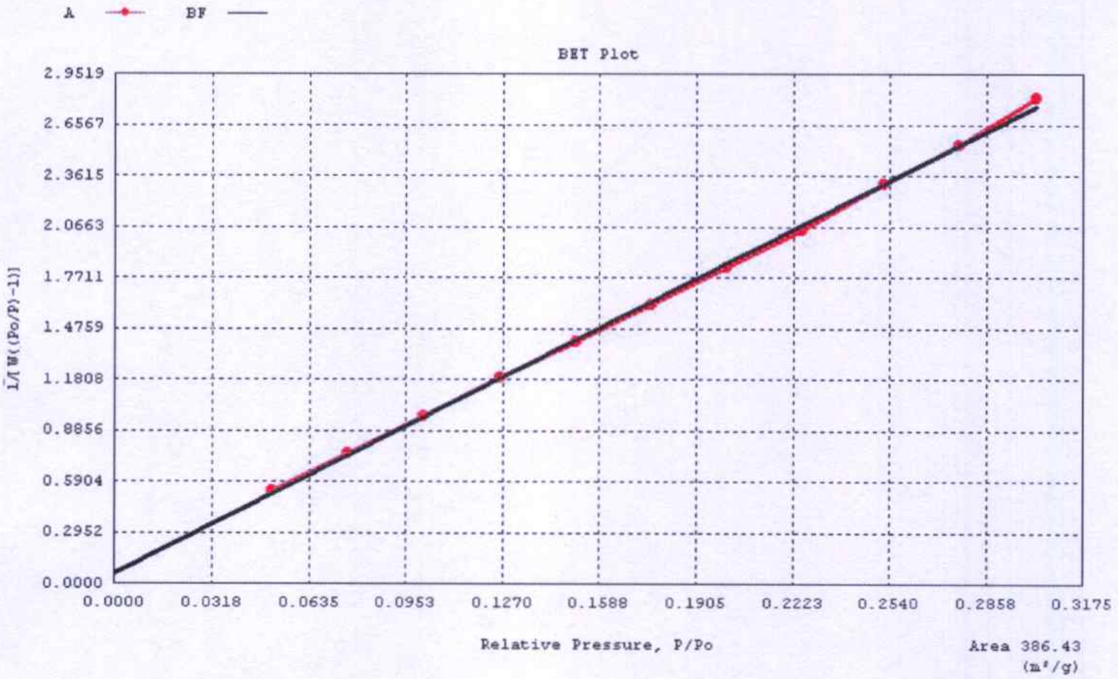
∴ จำนวนโมลของ TMCS บนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ 295.28×10^{-5} โมล

ดังนั้นปริมาณ TMCS (100%) ที่ใช้ในการสร้างพันธะกับซิลิกามีเท่ากับ 32079.08×10^{-5} กรัม หรือ 295.28×10^{-5} โมล ต่อซิลิกา 1.0000 กรัม

ภาคผนวก ง.

วิเคราะห์หาปริมาณพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของ อนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว ด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer

Sample ID :	SiO_2				
Description	Ad 20, De 20, BET 11				
Comments					
Sample weight	0.0324 g				
Adsorbate	NITROGEN	**Outgas temp**	350.0 °C	**Operator**	Off
Cross-Sec Area	16.2 A_2/molecule	**Outgas temp**	10.0 hrs	**Analysis Time**	838.6 min
NonIdeality	6.580E-05	**P/Po Toler**	0	**End of Run**	09/15/2006
05:37					
Molecular Wt	28.0134 g/mol	**Equil Time**	3	**File Name**	490914_1 RAW
Station #	1	**Bath Temp.**	77.40		



รูปที่ ง.1 Bet plot ของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องด้วยเครื่อง Surface area Analyzer

ภาคผนวก จ.

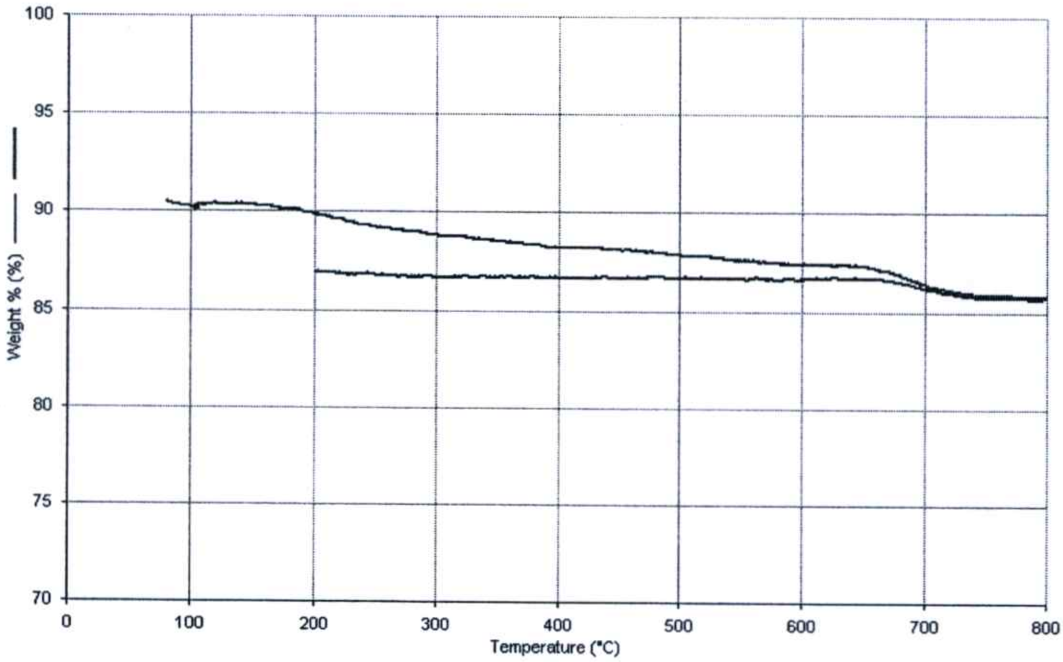
วิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาด้วยเทคนิค Light Scattering Analysis

ตารางที่ จ.1 การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมจากแกลบข้าว

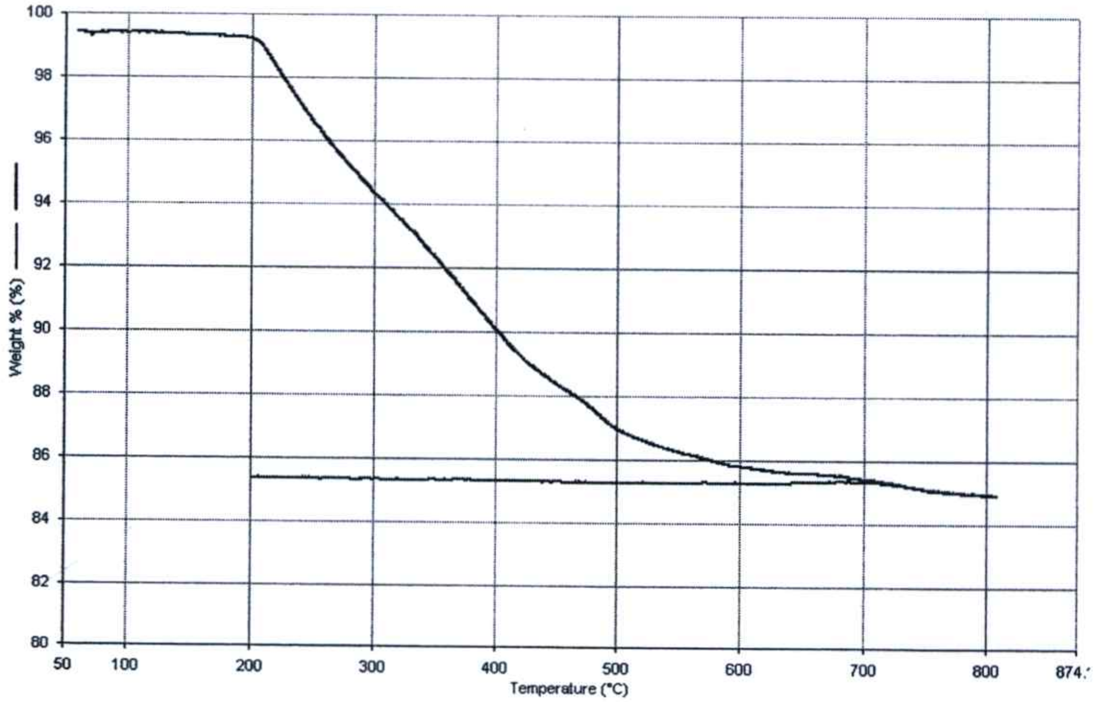
Size (Lo) (μm)	Result In (%)	Size (Hi) (μm)	Result Below (%)
0.05	0.00	1.32	0.00
1.32	0.00	1.60	0.00
1.60	0.04	1.95	0.05
1.95	0.21	2.38	0.25
2.38	0.56	2.90	0.81
2.90	1.16	3.53	1.97
3.53	2.07	4.30	4.04
4.30	3.28	5.24	7.31
5.24	4.71	6.39	12.03
6.39	6.24	7.78	18.27
7.78	7.53	9.48	25.80
9.48	8.51	11.55	34.31
11.55	9.05	14.08	43.36
14.08	9.15	17.15	52.51
17.15	8.93	20.90	61.45
2.90	8.47	25.46	69.92
25.46	7.83	31.01	77.75
31.01	6.91	37.79	84.66
37.79	5.67	46.03	90.33
46.03	4.21	56.09	94.54
56.09	2.72	66.33	97.27
68.33	1.49	83.26	98.75
83.26	0.65	101.44	99.40
101.44	0.21	123.59	99.61
123.59	0.06	150.57	99.67
150.57	0.06	183.44	99.73
183.44	0.09	223.51	99.82
223.51	0.09	272.31	99.91
272.31	0.07	331.77	99.98
331.77	0.02	404.21	100.00
404.21	0.00	492.47	100.00
492.47	0.00	600.00	100.00

ภาคผนวก ฉ.

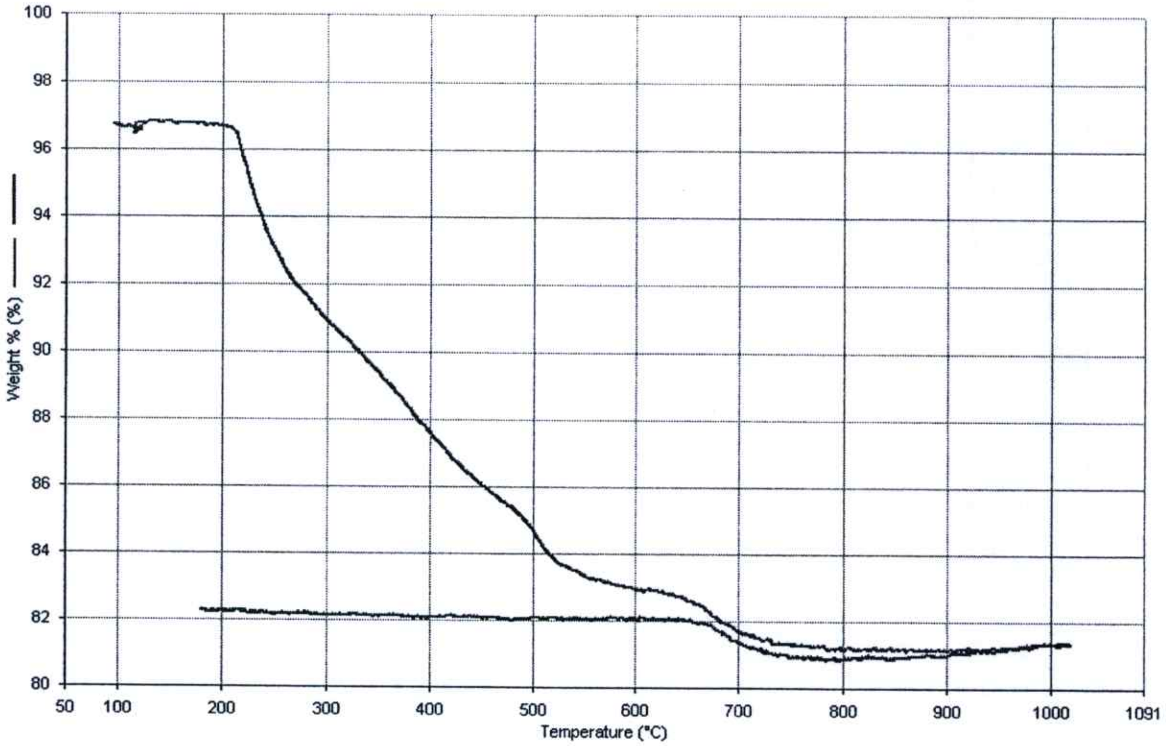
วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเฟสด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis



รูปที่ ฉ.1 กราฟการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกาโดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis



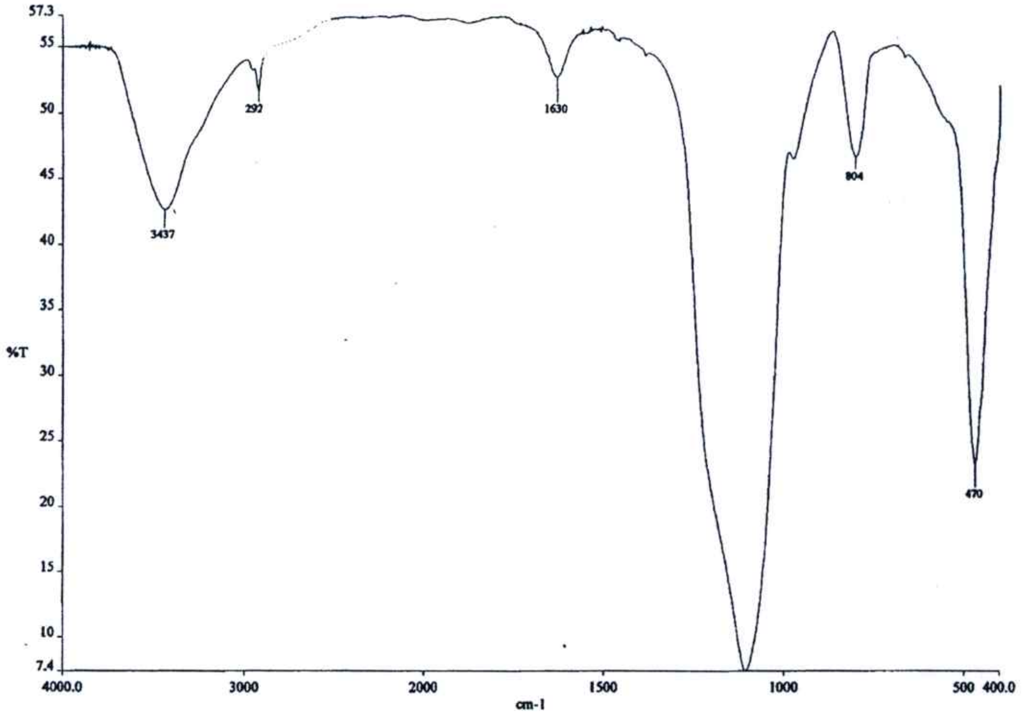
รูปที่ ฉ.2 กราฟการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกา–ออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนโดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis



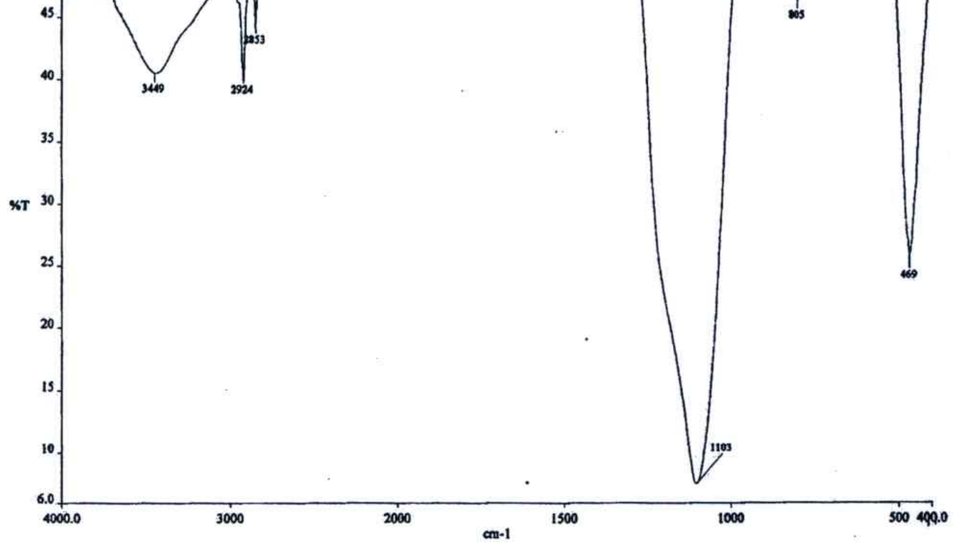
รูปที่ ฉ.3 กราฟการเปลี่ยนแปลงเฟสของซิลิกา–ออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทยเมทิลคลอโรไซเลนโดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermal Gravimetric Analysis

ภาคผนวก ช.

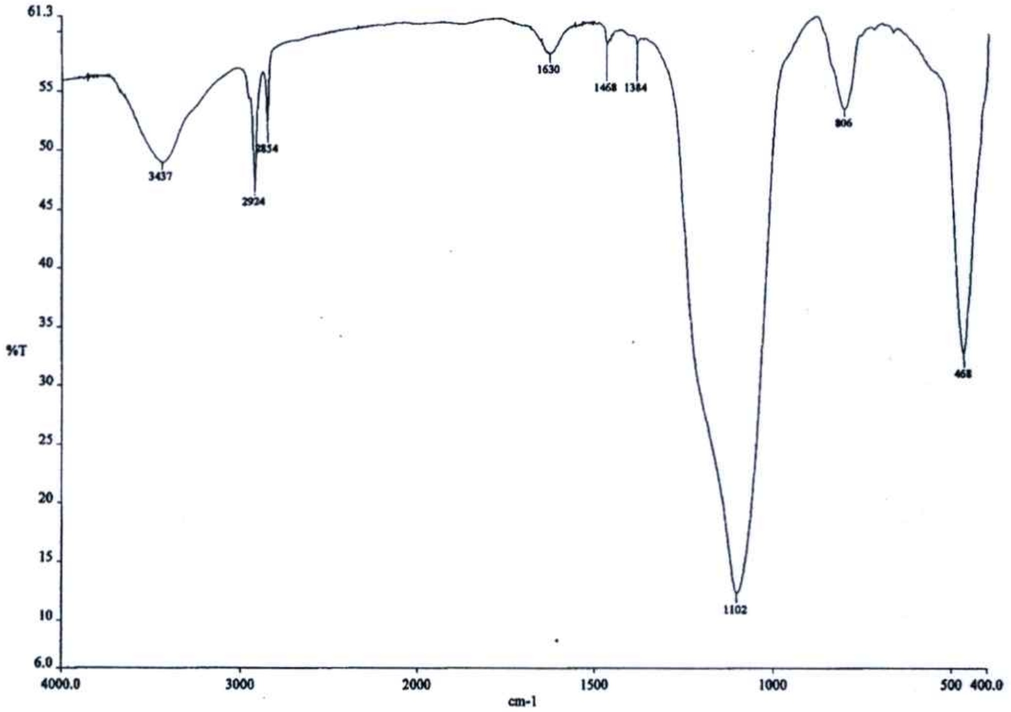
วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier Transforms Infrared Spectrometry



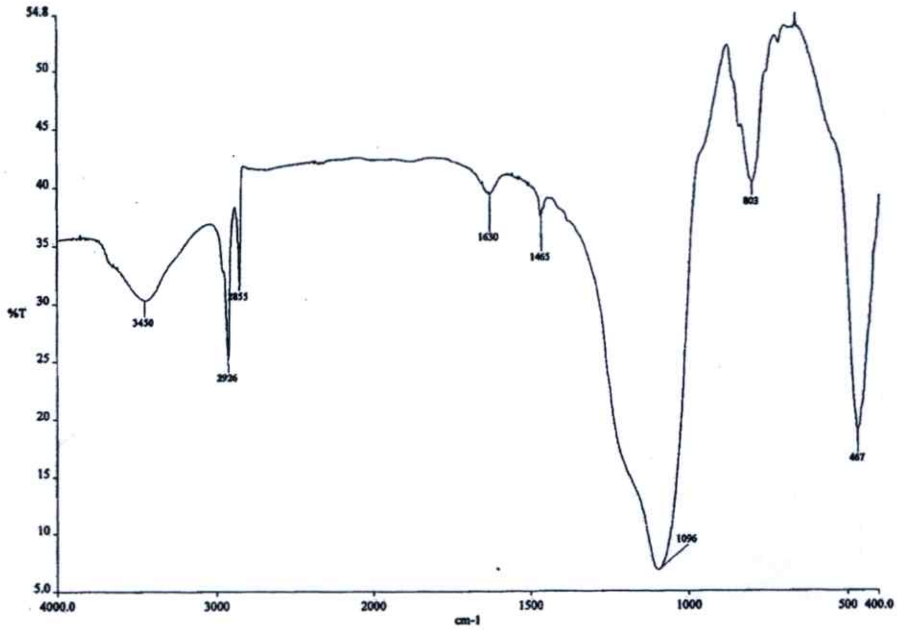
รูปที่ ข.1 สเปกตรัม FT-IR ของซิลิกาที่ได้จากแกลบข้าว



รูปที่ ข.2 สเปกตรัม FT-IR ของซิลิกา–ออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลน



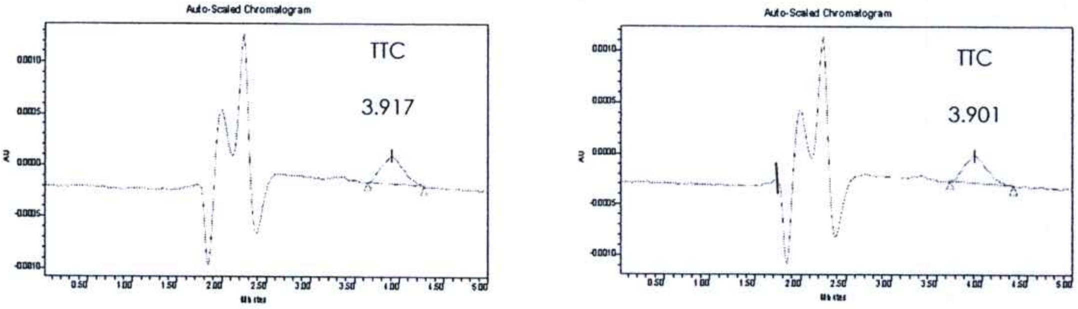
รูปที่ ข.3 สเปกตรัม FT-IR ของ ซิลิกา-ออกทะเดคซิลไทรคลอโรไซเลนที่ปิดปลายด้วยไทรเมทิลคลอโรไซเลน



รูปที่ ข.4 สเปกตรัม FT-IR ของซิลิกา C18 ทางการค้า

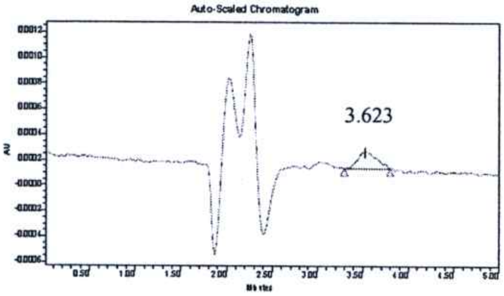
ภาคผนวก ซ.

ผลโครมาโทรแกรมของสารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวแบบสมรรถณะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

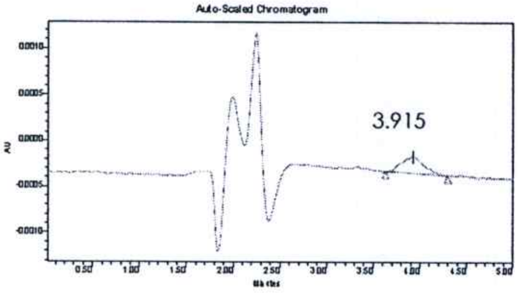


(ก) (ข)

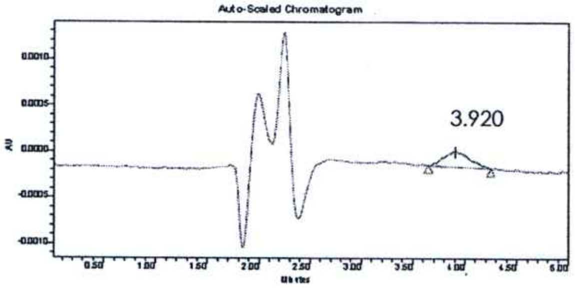
รูปที่ ซ.1 ผลโครมาโทรแกรมของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.00 ppm ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18: (ก) ทางการค้า (ข) ที่เตรียมขึ้น



(ก)

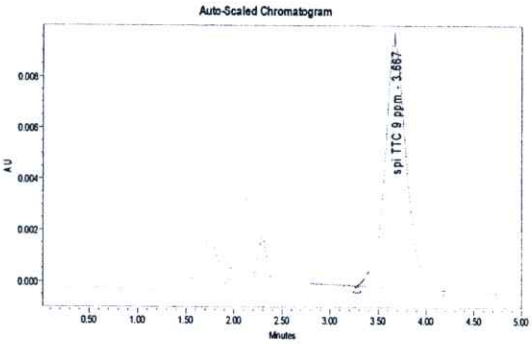


(ข)

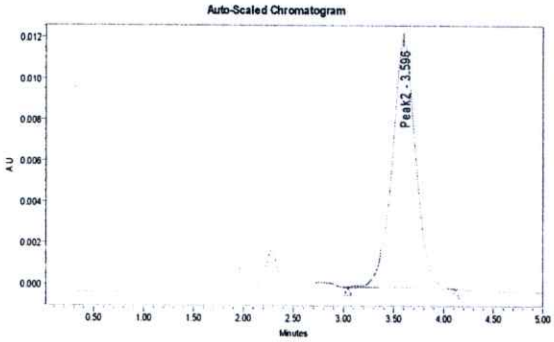


(ค)

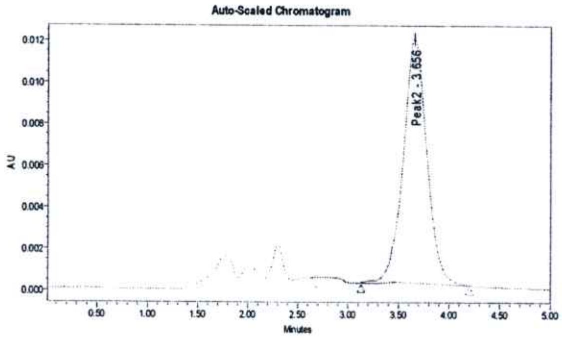
รูปที่ ซ.2 โครมาโทรแกรมตัวอย่างตับหมูที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น: (ก) ตัวอย่างตับหมูแหล่งที่ 1 (ข) ตัวอย่างตับหมูแหล่งที่ 2 (ค) ตัวอย่างตับหมูแหล่งที่ 3



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ ซ.3 โครมาโทรแกรมของตับหมูที่เติมสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (spiked sample) ความเข้มข้น 9.00 ppm ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น: (ก) ตัวอย่างตับหมูแหล่งที่ 1 (ข) ตัวอย่างตับหมูแหล่งที่ 2 (ค) ตัวอย่างตับหมูแหล่งที่ 3

ภาคผนวก ฌ.

สัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution Coefficient)

การคำนวณค่าค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจงของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์

ตารางที่ ฌ .1 แสดงข้อมูลการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจงของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์

ความเข้มข้น (ppm) เริ่มต้น	พื้นที่ใต้พีค(x_i)			
	ครั้งที่			ค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$)
	1	2	3	
0.50	103	189	156	149.33
0.70	154	198	203	185.00
0.90	245	302	310	285.67
1.00	277	293	379	316.33
3.00	1029	1066	900	998.33
4.00	1380	1210	1456	1348.67
5.00	1587	1824	1770	1727.00
7.00	2210	2453	2231	2298.00
9.00	2771	2717	2895	2794.33

จากข้อมูลขั้นต้นนำมาหาอัตราส่วนการกระจายตัวระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ในสารดูดสารหรือเฟสอยู่กับที่กับความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่จากสูตร

$$K_D = \frac{[C]_S}{[C]_M}$$

เมื่อ K_D = ค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution coefficient)

C_S = ความเข้มข้นในเฟสอยู่กับที่

C_M = ความเข้มข้นในเฟสเคลื่อนที่

โดยหาความเข้มข้นในเฟสอยู่กับที่ได้จากสมการเส้นตรงสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (ภาคผนวก ฎ.1) y = 974.8x

ความเข้มข้น (mg) ในสารดูดซับ	ความเข้มข้น (mg) ในสารละลาย	ค่าสัมประสิทธิการแจกแจง (K_D)
0.0355	0.0153	2.26
0.0510	0.0190	2.68
0.0607	0.0293	2.07
0.0675	0.0325	2.08
0.1976	0.1024	1.92
0.2616	0.1384	1.89
0.3228	0.1772	1.82
0.4643	0.2357	1.96
0.6133	0.2867	2.13

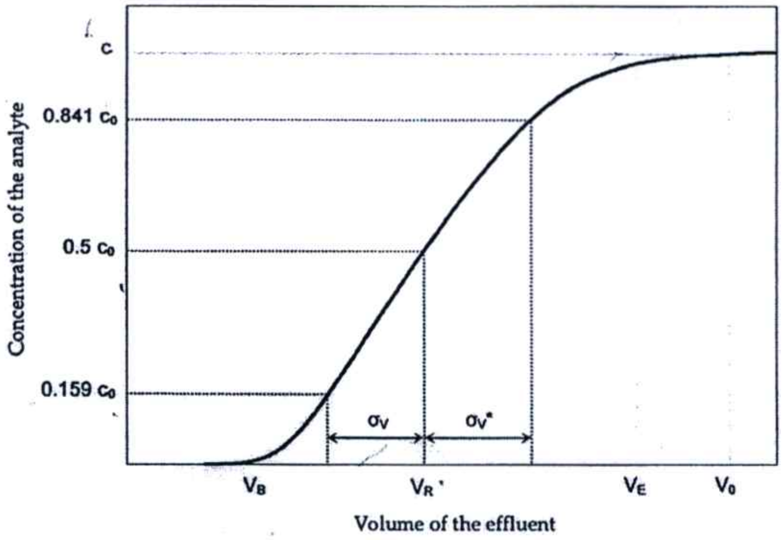
จะเห็นได้ว่าสัดส่วนของความเข้มข้นของสารละลายในสารดูดซับมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ แสดงว่าสารละลายถูกดูดซับในสารดูดซับมากกว่าละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นในสารดูดซับและเฟสเคลื่อนที่ดังแสดงในรูปที่ 4.14

ภาคผนวก ญ.

ค่า Breakthrough, แฟกเตอร์ความจุ (Capacity factor, k′) และจำนวนเพลทตามทฤษฎี (Number of theoretical plates of the column, N)

การคำนวณค่า Breakthrough ของสารมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์

กราฟ Breakthrough สามารถแสดงโดยพล็อตระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซึ่งเป็นฟังก์ชั่นกับปริมาณการดูดซับระหว่างเฟสของแข็งและเฟสของเหลวกับปริมาตรสารละลายที่ผ่านสารดูดซับดังแสดงในรูปที่ ญ.1 [23]



รูปที่ ญ.1 แสดงลักษณะของกราฟ Breakthrough

จากกราฟสามารถหาปริมาณค่า Breakthrough (Breakthrough volume, V_B) ซึ่งจะสัมพันธ์กันกับความเข้มข้น

$$V_B = 0.05C_o$$

และ

$$V_R = 0.5C_o$$

เมื่อ C_o = ความเข้มข้นของสารวิเคราะห์สูงสุดที่ตรวจวัดได้

V_R = ปริมาตรคงอยู่ของสารวิเคราะห์ (Retention volume) ที่ครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นสารวิเคราะห์สูงสุดที่ตรวจวัดได้

โดยข้อมูลการศึกษาค่า Breakthrough ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10.00 ppm ที่สารดูดซับสามารถดูดซับได้ แสดงดังในตารางที่ ญ .1

ตารางที่ ญ .1 แสดงข้อมูลศึกษาค่า Breakthrough ของสารมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์

ปริมาตรที่ (mL)	ค่าพื้นที่ใต้พีค (xi) ครั้งที่			ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ความเข้มข้น (ppm) ที่ตรวจวัดได้
	1	2	3		
1.0	0	0	0	0	0.00
2.0	70	42	55	56	0.06
3.0	68	40	67	58	0.06
4.0	75	68	64	69	0.07
5.0	89	68	75	77	0.08
6.0	94	77	82	84	0.09
7.0	94	75	66	78	0.08
8.0	93	63	92	82	0.09
9.0	121	54	130	102	0.10
10.0	148	161	157	155	0.16
11.0	155	986	318	486	0.50
12.0	226	2493	2107	1608	1.65
13.0	2104	4930	5271	4101	4.21
14.0	6319	7817	8320	7485	7.68
15.0	10468	10583	10334	10462	10.73
16.0	11177	10800	10508	10828	11.11
17.0	11094	10411	10392	10632	10.91
18.0	10868	10590	10282	10580	10.85
19.0.	11628	10235	10643	10835	11.12
20.0	11121	10375	10460	10652	10.93
21.0	11876	10343	10652	10957	11.24
22.0	11876	10018	10044	10646	10.92
23.0	11573	10574	10111	10752	11.03
24.0	11222	10665	10484	10790	11.07
25.0	11266	10152	10190	10536	10.81

จะได้ C_o = 10.97 ppm

ดังนั้น $0.5C_o$ = 5.48 ppm

$0.05C_o$ = 0.54 ppm

จากข้อมูลขั้นต้น พบว่าจุดอิ่มตัวของสารดูดซับและปริมาตรคงอยู่ คือ 11.2 และ 13.8 mL ตามลำดับ และจากกราฟ breakthrough สามารถนำมาหาแฟกเตอร์ความจุ (Capacity factor, k′) ได้จากสมการ

$$V_R = V_M(1 + k')$$

และจำนวนเพลทตามทฤษฎี (Number of theoretical plates of the column, N) ได้จากสมการ

$$N = \frac{V_R(V_R - \sigma_V)}{\sigma_V^2}$$

เมื่อ V_M = ปริมาตรคงอยู่ในสารดูดซับ เท่ากับ 0.95 mL

σ_V = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 1.55

จากนั้นแทนค่าที่ได้ในสมการขั้นต้น

จะได้ $k' = 4.78$

$N = 8.97$

ดังนั้น แฟกเตอร์ความจุของสารดูดซับและเพลทตามทฤษฎีมีค่าเท่ากับ 13.53 และ 8.97 ตามลำดับ

ภาคผนวก ฎ.

การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง (System Linearity)

ฎ.1 การคำนวณค่า System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ทำการผ่านคอลัมน์ SPE-C18

ตารางที่ ฎ.1 แสดงผลการศึกษา System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ทำการผ่านคอลัมน์ SPE-C18

ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	ค่าพื้นที่ใต้พีค(xi)						
	จำนวนครั้ง						ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
0.00	0	0	0	0	0	0	0
0.05	0	73	60	55	71	65	54.00
0.10	110	102	100	99	111	125	107.83
0.15	165	150	155	170	162	157	159.83
0.20	210	227	226	230	228	207	221.33
0.25	249	235	271	265	270	244	255.67
0.50	494	478	438	511	484	477	480.33
1.00	1050	972	1222	1066	993	1123	1071.00
2.00	1789	1867	1995	1789	1748	1937	1854.17
3.00	2505	2695	2773	2687	2461	2940	2676.83
4.00	3384	3432	3522	3493	3725	3812	3561.33
5.00	4942	5011	4347	4932	5021	5298	4925.17
10.00	9114	9904	8978	10374	9991	11284	9940.83

จากข้อมูลขั้นต้นได้สมการเส้นตรง คือ $y = 981.0x - 37.10$

จากนั้นพิสูจน์ว่า slop เท่ากับ 1 หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ slop (b) จาก

$$CI_{slop} = b \pm t_{(n-2)}S_b$$

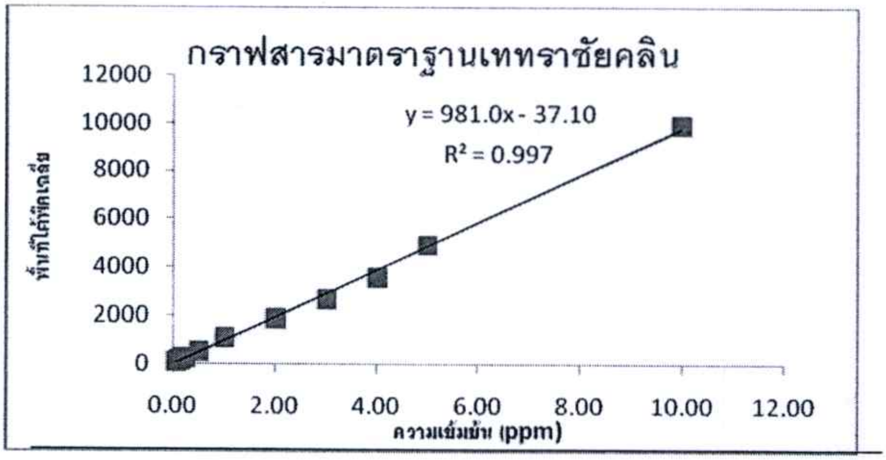
$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

S_b คือ standard deviation ของ slop

และ

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\left[\sum (y_i - \bar{y})^2\right]}{(n-2)}}$$

$S_{y/x}$ คือ standard deviation ของ regression line



รูปที่ ฎ.1 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 อันดับที่ 1

จะได้ $S_{y/x}$ = 2999.52

S_b = 105118.77

โดยค่า t จากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับขั้นความเสรี (degree of freedom; d.f (n-2); 13-2 = 11) ที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่า = 2.23

CI ของ slop = 981.0 ± 2.23 x 105118.77

= 981.0 ± 234414.86 (ตั้งแต่ -233433.86 ถึง 235395.86)

ดังนั้น slop มีช่วงความเชื่อมั่น ตั้งแต่ -233433.86 ถึง 235395.86

จากนั้นพิสูจน์ว่า intercept ผ่าน origin (x =0, y = 0) หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ intercept (a) จาก

$$CI_a = a \pm t_{(n-2)} S_a$$

$$S_a = S_{y/x}\sqrt{\frac{\left[\sum(y_i - \bar{y})^2\right]}{n(n-2)}}$$

S_a คือ standard deviation ของ intercept

	x_i	x_i^2	y_i	$(x_i - \overline{X})$	$(y_i - \overline{Y})$	$(x_i - \overline{X})^2$	$(y_i - \overline{Y})^2$
	0	0	0	-2.19	-2109.03	4.79	4447998.17
	0.05	0.00	54.00	-2.14	-2055.03	4.57	4223139.17
	0.10	0.01	107.83	-2.09	-2001.19	4.36	4004779.20
	0.15	0.02	159.83	-2.04	-1949.19	4.15	3799358.98
	0.20	0.04	221.33	-1.99	-1887.69	3.95	3563390.32
	0.25	0.06	255.67	-1.94	-1853.36	3.75	3434947.41
	0.50	0.25	480.33	-1.69	-1628.69	2.85	2652645.59
	1.00	1.00	1071.00	-1.19	-1038.03	1.41	1077501.67
	2.00	4.00	1854.17	-0.19	-254.86	0.04	64954.19
	3.00	9.00	2676.83	0.81	567.81	0.66	322403.15
	4.00	16.00	3561.33	1.81	1452.31	3.29	2109191.43
	5.00	25.00	4925.17	2.81	2816.14	7.91	7930638.24
	10.00	100.00	9940.83	7.81	7831.81	61.04	61337178.26
ผลรวม	26.25	155.39				102.75	94520127.60
ผลเฉลี่ย	2.19		2109.03				

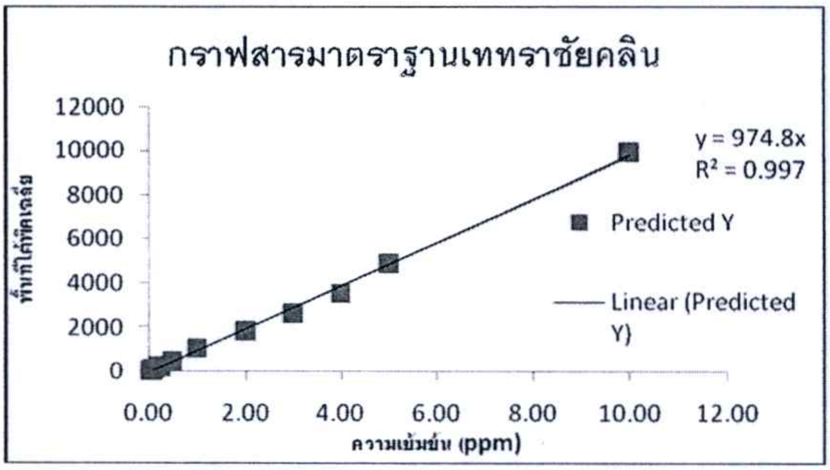
จะได้ S_a = 1505.88

CI ของ intercept = 37.10 ± 2.23 x 1505.88

= 37.10 ± 3358.11 (ตั้งแต่ -3321.01 ถึง 3395.21)

ดังนั้น intercept มีช่วงความเชื่อมั่น ตั้งแต่ -3321.01 ถึง 3395.21

จะเห็นได้ว่า intercept ไม่แตกต่างจาก 0 และ slop ไม่แตกต่างจาก 1 เพราะฉะนั้น ค่าจุดตัดแกน y จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 974.8x

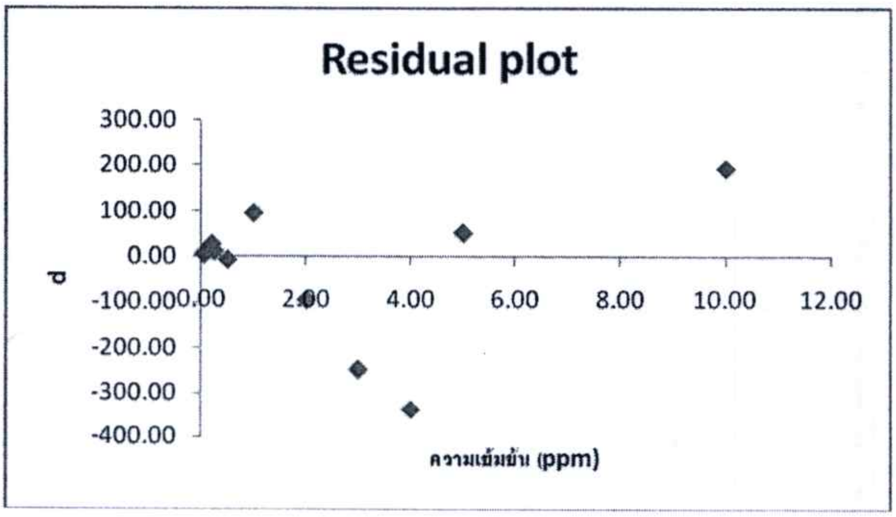


รูปที่ ฎ.2 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 อันดับที่ 2

ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

เมื่อ	i	=	1,…,n
	y_i	=	ค่าที่ได้จากการทดลอง
	$\hat{y}_i$	=	ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง (Regression line; y = 974.8x)



รูปที่ ฎ.3 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ไม่ได้ผ่านคอลัมน์ SPE-C18

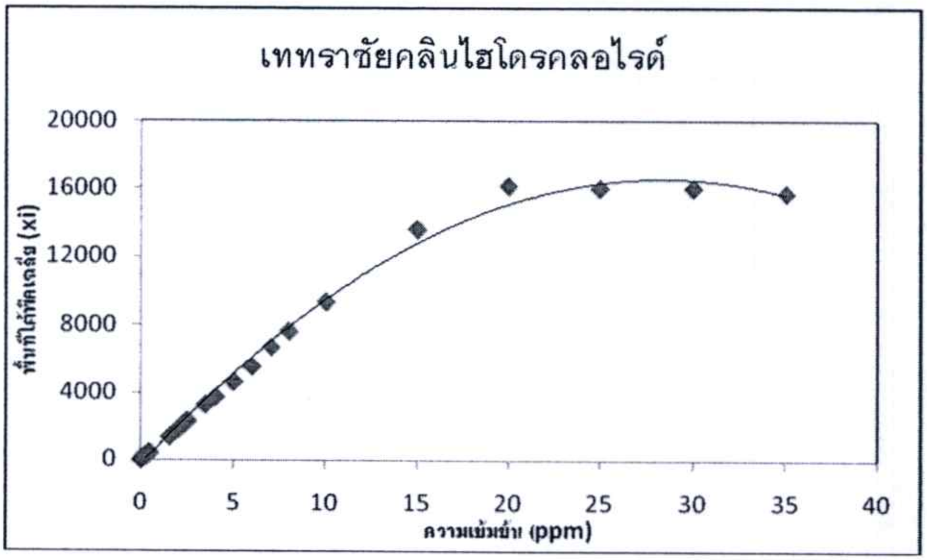
x_i	y_i	$\hat{y}_i$	$y_i-\hat{y}_i$
0.05	54.00	48.74	5.26
0.10	107.83	97.48	10.35
0.15	159.83	146.22	13.61
0.20	221.33	194.96	26.37
0.25	255.67	243.70	11.97
0.50	480.33	487.40	-7.07
1.00	1071.00	974.80	96.20
2.00	1854.17	1949.60	-95.43
3.00	2676.83	2924.40	-247.57
4.00	3561.33	3899.20	-337.87
5.00	4925.17	4874.00	51.17
10.00	9940.83	9748.00	192.83

จากรูปที่ ฎ.3 พบว่า residual (d_i) มีการกระจายตัวแบบปกติ หมายความว่า กราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 0.05-10.00 ppm

ฎ.2 การคำนวณค่า System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า

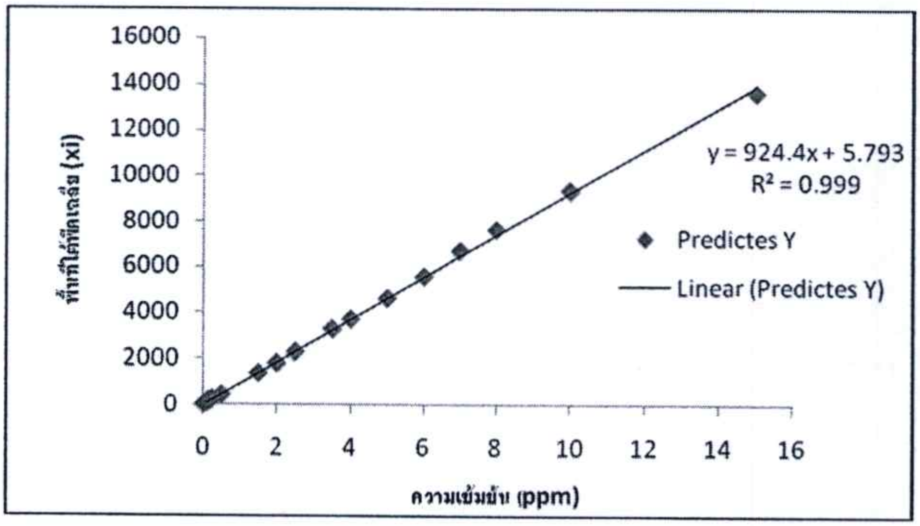
ตารางที่ ฎ.2 แสดงผลการศึกษา System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า

ความเข้มข้นเททราซัยคลิน (ppm)	ค่าความสูงของพีค						
	ครั้งที่						เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
0.01	0	0	0	0	0	0	0
0.05	45	47	57	46	34	47	49.67
0.10	85	81	92	90	98	87	86.00
0.15	125	150	132	143	146	137	135.67
0.20	181	168	167	163	170	168	172.00
0.25	235	224	232	228	234	228	230.33
0.50	389	476	363	303	371	380	409.33
1.50	1328	1298	1429	1210	1358	1379	1351.67
2.00	1788	1815	1771	1637	1895	1794	1791.33
2.50	2217	2391	2205	2485	2459	2437	2271.00
3.50	3306	3262	3255	3059	3133	3382	3274.33
4.00	3778	3572	3794	3790	3750	3608	3714.67
5.00	4492	4687	4669	4638	4439	4794	4616.00
6.00	5675	5239	5791	5639	4838	5733	5568.33
7.00	6667	6593	6773	6703	6836	6503	6677.67
8.00	7862	7748	7250	7938	7639	7738	7620.00
10.00	9610	8585	9800	9802	9038	9294	9331.67
15.00	13663	13497	13690	14750	13903	14495	13616.67
20.00	16688	15482	16356	16093	15493	14493	16175.33
25.00	16069	15595	16435	16038	15649	15398	16033.00
30.00	16356	15575	16120	16493	16393	15463	16017.00
35.00	16063	15816	15248	16742	16234	16333	15709.00



รูปที่ ฎ.4 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับ 1

จากข้อมูลขั้นต้น พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.05 ถึง 15.00 ppm



รูปที่ ฎ.5 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับ 2

จากข้อมูลขั้นต้นได้สมการเส้นตรง คือ $y = 924.4x + 5.793$

จากนั้นพิสูจน์ว่า slop เท่ากับ 1 หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ slop (b) จาก

$$CI_{slop} = b \pm t_{(n-2)} S_b$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

S_b คือ standard deviation ของ slop

และ

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\left[\sum (y_i - \bar{y})^2\right]}{(n-2)}}$$

$S_{y/x}$ คือ standard deviation ของ regression line

จะได้ $S_{y/x}$ = 3969.69

S_b = 58.38

โดยค่า t จากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับขั้นความเสรี (degree of freedom; d.f (n-2); 19-2 = 17) ที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่า = 2.12

CI ของ slop = 924.4 ± 2.12 x 58.38

= 924.4 ± 123.77 (ตั้งแต่ 800.63 ถึง 1048.17)

ดังนั้น slop มีช่วงความเชื่อมั่น ตั้งแต่ 800.63 ถึง 1048.17

จากนั้นพิสูจน์ว่า intercept ผ่าน origin (x =0, y = 0) หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ intercept (a) จาก

$$CI_a = a \pm t_{(n-2)} S_a$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\left[\sum (y_i - \bar{y})^2\right]}{n(n-2)}}$$

S_a คือ standard deviation ของ intercept

จะได้ S_a = 24.40

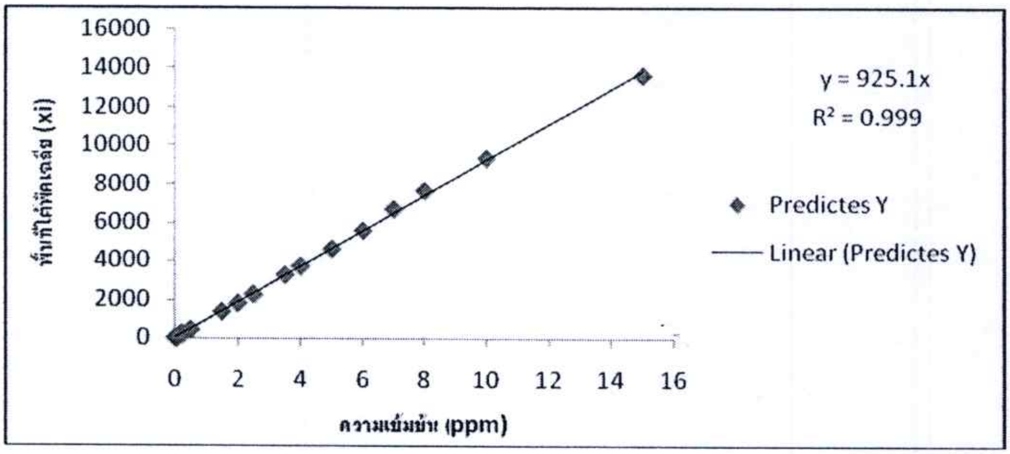
CI ของ intercept = 5.793 ± 2.12 x 24.40

= 5.793 ± 51.73 (ตั้งแต่ -45.94 ถึง 57.52)

ดังนั้น intercept มีช่วงความเชื่อมั่น ตั้งแต่ -45.94 ถึง 57.52

จะเห็นได้ว่า intercept ไม่แตกต่างจาก 0 และ slop แตกต่างจาก 1 เพราะฉะนั้น ค่าจุดตัดแกน y จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 925.1x

	x_i	x_i^2	y_i	$(x_i-\bar{X})$	$(y_i-\bar{Y})$	$(x_i-\bar{X})^2$	$(y_i-\bar{Y})^2$
	0	0	0	-65.76	-3383.00	4324.38	11444689.00
	0.01	0.00	0.00	-3.64	-3383.00	13.27	11444689.00
	0.05	0.00	27.33	-3.60	-3355.67	12.98	11260498.78
	0.10	0.01	86.00	-3.55	-3297.00	12.63	10870209.00
	0.15	0.02	135.67	-3.50	-3247.33	12.27	10545173.78
	0.20	0.04	172.00	-3.45	-3211.00	11.93	10310521.00
	0.25	0.06	230.33	-3.40	-3152.67	11.58	9939307.11
	0.50	0.25	409.33	-3.15	-2973.67	9.94	8842693.44
	1.50	2.25	1351.67	-2.15	-2031.33	4.64	4126315.11
	2.00	4.00	1791.33	-1.65	-1591.67	2.73	2533402.78
	2.50	6.25	2271.00	-1.15	-1112.00	1.33	1236544.00
	3.50	12.25	3274.33	-0.15	-108.67	0.02	11808.44
	4.00	16.00	3714.67	0.35	331.67	0.12	110002.78
	5.00	25.00	4616.00	1.35	1233.00	1.81	1520289.00
	6.00	36.00	5568.33	2.35	2185.33	5.51	4775681.78
	7.00	49.00	6677.667	3.35	3294.67	11.20	10854828.44
	8.00	64.00	7620.00	4.35	4237.00	18.89	17952169.00
	10.00	100.00	9331.67	6.35	5948.67	40.28	35386635.11
	15.00	225.00	13616.67	11.35	10233.67	128.75	104727933.44
ผลรวม	65.76	540.14				4624.27	267893391.00
ผลเฉลี่ย	3.65		3383.00				



รูปที่ ฎ.6 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับ 3

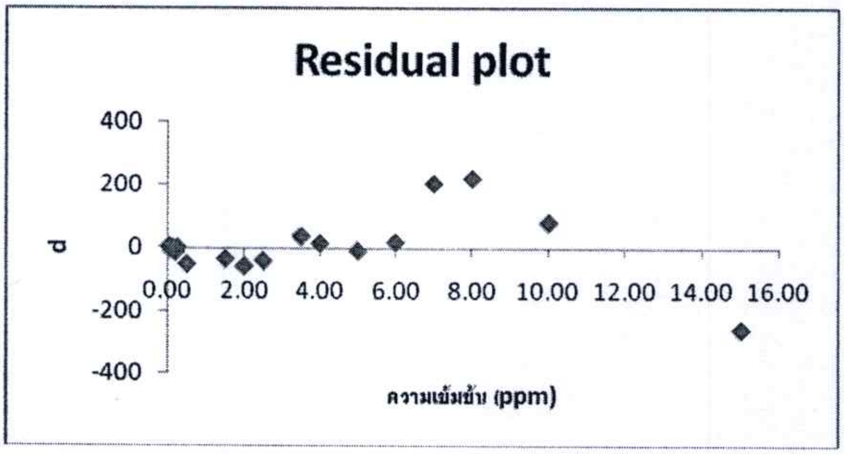
ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

เมื่อ i = 1,…,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง (Regression line; y = 925.1x)



รูปที่ ฎ.7 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า

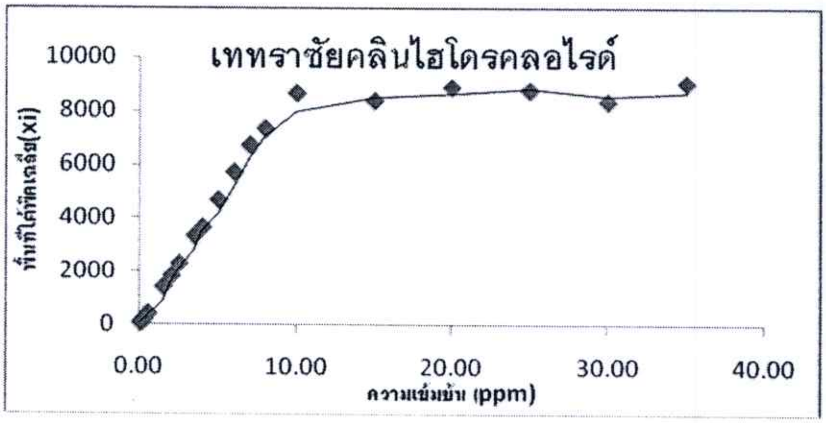
xi	yi	$\hat{Y}_i$	$y_i-\hat{y}_i$
0.01	0	9.25	-9.25
0.05	49.67	46.25	3.41
0.10	86.00	92.51	-6.51
0.15	135.67	138.76	-3.09
0.20	172.00	185.02	-13.02
0.25	230.33	231.27	-0.94
0.50	409.33	462.55	-53.21
1.50	1351.67	1387.65	-35.98
2.00	1791.33	1850.20	-58.86
2.50	2271.00	2312.75	-41.75
3.50	3274.33	3237.85	36.48
4.00	3714.67	3700.40	14.26
5.00	4616.00	4625.50	-9.50
6.00	5568.33	5550.60	17.73
7.00	6677.67	6475.70	201.96
8.00	7620.00	7400.80	219.20
10.00	9331.67	9251.00	80.66
15.00	13616.67	13876.50	-259.83

จากรูปที่ ฎ.7 พบว่า residual (d_i) มีการกระจายตัวแบบปกติ หมายความว่า กราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 0.05-15.00 ppm

ฎ.3 การคำนวณค่า System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น

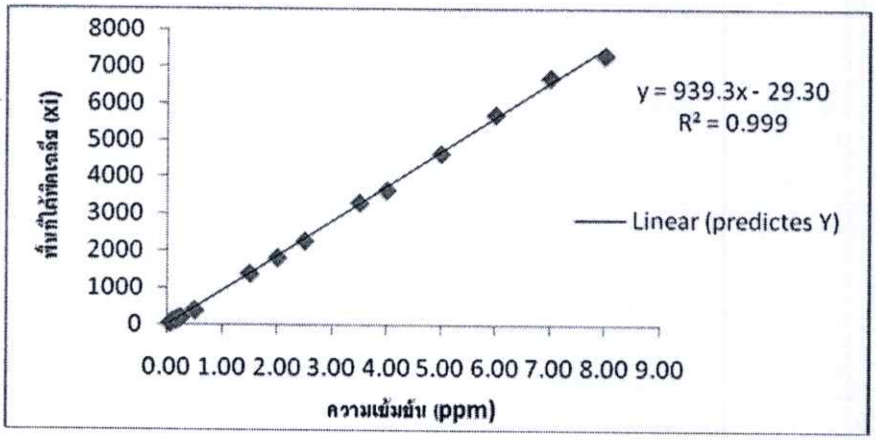
ตารางที่ ฎ.3 แสดงผลการศึกษา System Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น

ความเข้มข้นเททราซัยคลิน (ppm)	ค่าความสูงของพีค						
	ครั้งที่						เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
0.05	55	40	46	63	60	55	47.00
0.10	89	101	92	109	113	90	94.00
0.15	125	130	132	144	151	145	129.00
0.20	161	168	151	161	179	178	160.00
0.25	211	174	182	221	243	228	189.00
0.50	392	376	403	516	492	522	390.33
1.50	1415	1440	1329	1463	1286	1422	1394.67
2.00	1788	1915	1771	1830	1845	1777	1824.67
2.50	2217	2391	2205	2432	2390	2503	2271.00
3.50	3306	3262	3355	3481	3253	3432	3307.67
4.00	3578	3472	3894	4039	3838	3774	3648.00
5.00	4992	4987	3969	5113	4893	5108	4649.33
6.00	5675	5839	5591	5930	6047	6127	5701.67
7.00	6567	6793	6773	6583	6638	6739	6711.00
8.00	7362	7348	7250	8371	8103	8093	7320.00
10.00	8610	8585	8800	9382	7783	8744	8665.00
15.00	8923	7497	8690	7948	8395	8037	8370.00
20.00	8830	8482	9356	9846	7857	7950	8889.33
25.00	9279	8595	8435	9875	9204	8846	8769.67
30.00	7356	9575	8120	8953	9057	8853	8350.33
35.00	9063	8816	9248	8475	7484	9457	9042.33



รูปที่ ฎ.8 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับ 1

จากข้อมูลขั้นต้น พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.05 ถึง 8.00 ppm



รูปที่ ฎ.9 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับ 2

จากข้อมูลขั้นต้นได้สมการเส้นตรง คือ y = 939.3x – 29.30

จากนั้นพิสูจน์ว่า slop เท่ากับ 1 หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ slop (b) จาก

$$CI_{slop} = b \pm t_{(n-2)} S_b$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

S_b คือ standard deviation ของ slop

และ $$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\left[\sum (y_i - \bar{y})^2\right]}{(n-2)}}$$

$S_{y/x}$ คือ standard deviation ของ regression line

	x_i	x_i^2	y_i	$(x_i - \overline{X})$	$(y_i - \overline{Y})$	$(x_i - \overline{X})^2$	$(y_i - \overline{Y})^2$
	0.05	0.00	47.00	-2.67	-2475.49	7.11	6128045.00
	0.10	0.01	94.00	-2.62	-2428.49	6.84	5897558.00
	0.15	0.02	129.00	-2.57	-2393.49	6.58	5728789.00
	0.20	0.04	160.00	-2.52	-2362.49	6.33	5581354.00
	0.25	0.06	189.00	-2.47	-2333.49	6.08	5445170.00
	0.50	0.25	390.33	-2.22	-2132.16	4.91	4546087.00
	1.50	2.25	1394.67	-1.22	-1127.82	1.48	1271983.00
	2.00	4.00	1824.67	-0.72	-697.82	0.51	486955.90
	2.50	6.25	2271.00	-0.22	-251.49	0.04	63246.66
	3.50	12.25	3307.67	0.78	785.18	0.61	616504.10
	4.00	16.00	3648.00	1.28	1125.51	1.64	1266775.00
	5.00	25.00	4649.33	2.28	2126.84	5.21	4523467.00
	6.00	36.00	5701.67	3.28	3179.18	10.78	10107171.00
	7.00	49.00	6711.00	4.28	4188.51	18.34	17543625.00
	8.00	64.00	7320.00	5.28	4797.51	27.91	23016113.00
ผลรวม	40.75	215.13				104.43	92222846.00
ผลเฉลี่ย	2.72		2522.49				

จะได้ $S_{y/x}$ = 2653.65

S_b = 250.96

โดยค่า t จากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับขั้นความเสรี (degree of freedom; d.f (n-2); 15-2 = 13) ที่ระดับความมั่นใจ 95.0% มีค่า = 2.14

CI ของ slop = 939.3 ± 2.14 x 250.96

= 939.3 ± 537.5 (ตั้งแต่ 401.8 ถึง 1476.35)

ดังนั้น slop มีช่วงความเชื่อมั่น ตั้งแต่ 401.8 ถึง 1476.35

จากนั้นพิสูจน์ว่า intercept ผ่าน origin (x =0, y = 0) หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ intercept (a) จาก

$$CI_a = a \pm t_{(n-2)} S_a$$

$$S_a = S_{y/x}\sqrt{\frac{\left[\sum (y_i - \bar{y})^2\right]}{n(n-2)}}$$

S_a คือ standard deviation ของ intercept

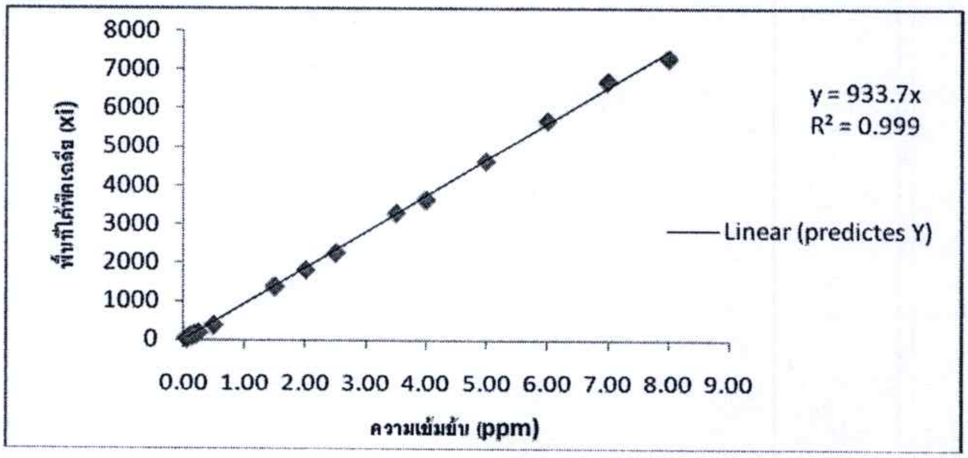
จะได้ S_a = 920.22

CI ของ intercept = – 29.30 ± 2.14 x 920.22

= – 29.30 ± 1969.27 (ตั้งแต่ -1998.57 ถึง 1939.97)

ดังนั้น intercept มีช่วงความเชื่อมั่น ตั้งแต่ -1998.57 ถึง 1939.97

จะเห็นได้ว่า intercept ไม่แตกต่างจาก 0 และ slop แตกต่างจาก 1 เพราะฉะนั้น ค่าจุดตัดแกน y จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 933.7x



รูปที่ ฎ.10 แสดงกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับ 3

ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

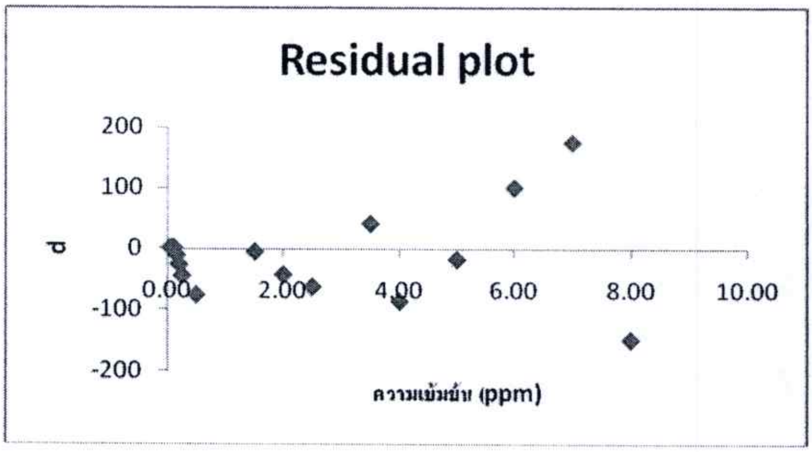
$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

เมื่อ i = 1,…,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง (Regression line; y = 933.7x)

xi	yi	ŷi	yi-ŷi
0.05	47.00	46.68	0.31
0.10	94.00	93.37	0.63
0.15	129.00	140.05	-11.05
0.20	160.00	186.74	-26.74
0.25	189.00	233.42	-44.42
0.50	390.33	466.85	-76.51
1.50	1394.67	1400.55	-5.88
2.00	1824.67	1867.40	-42.73
2.50	2271.00	2334.25	-63.25
3.50	3307.67	3267.95	39.71
4.00	3648.00	3734.80	-86.80
5.00	4649.33	4668.50	-19.16
6.00	5701.67	5602.20	99.46
7.00	6711.00	6535.90	175.10
8.00	7320.00	7469.60	-149.60



รูปที่ ฎ.11 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น

จากรูปที่ ฎ.11 พบว่า residual (d_i) มีการกระจายตัวแบบปกติ หมายความว่า กราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 0.05-8.00 ppm

ฎ.4 เปรียบเทียบค่าทางสถิติของ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่าง SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น โดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ จากสูตร

$$t_{cal} = \bar{x}_d \times \frac{\sqrt{n}}{S_d}$$

	ความเข้มข้นเริ่มต้น (ppm)	ความเข้มข้นที่ชะได้เฉลี่ย (ppm)		ผลต่าง x_d
		คอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า	คอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น	
	0.05	0.03	0.04	-0.0202
	0.10	0.09	0.09	-0.0082
	0.15	0.14	0.13	0.0068
	0.20	0.18	0.16	0.0123
	0.25	0.24	0.19	0.0424
	0.50	0.42	0.40	0.0195
	1.50	1.39	1.43	-0.0441
	2.00	1.84	1.87	-0.0342
	2.50	2.33	2.33	0.0000
	3.50	3.36	3.39	-0.0342
	4.00	3.81	3.74	0.0684
	5.00	4.74	4.77	-0.0342
	6.00	5.71	5.85	-0.1368
	7.00	6.85	6.88	-0.0342
	8.00	7.88	7.51	0.3078
ค่าเฉลี่ย				0.0074
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				0.0952

จากสูตรจะได้ค่า t_{cal} = 0.301 โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี (n-1; 15-1 = 14) ที่ระดับความมั่นใจ 95.0% มีค่าเท่ากับ 2.14 พบว่า ค่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ภาคผนวก ฎ

การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง (Method Linearity)

ฎ.1 การคำนวณค่า Method Linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติม (spiked) ด้วยสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า

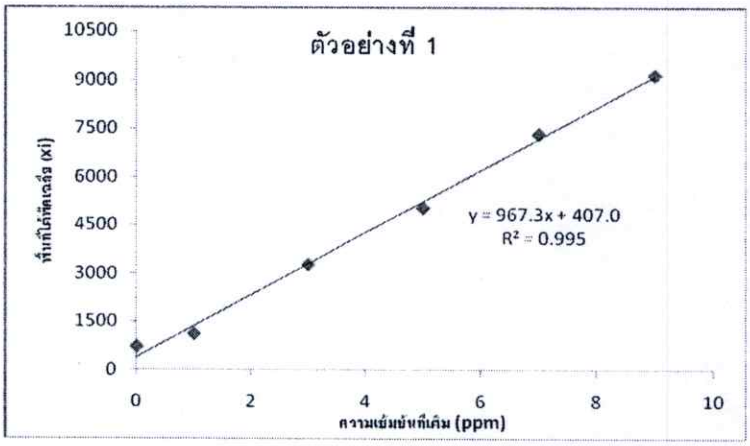
ตารางที่ ฎ.1 แสดงผลการศึกษา Method Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	ค่าความสูงของพีค							
		ครั้งที่							ค่าเฉลี่ย
		1	2	3	4	5	6	7	
1	0.00	742	885	727	627	540	533	997	721.57
	1.00	1358	1365	1092	813	1080	1066	994	1109.71
	3.00	3374	3580	3261	3275	3100	3065	3278	3276.14
	5.00	5586	5161	5667	5112	4899	4055	4767	5035.28
	7.00	7400	7777	7211	7114	6934	7182	7737	7336.42
	9.00	9338	9815	9149	9052	8872	9120	8675	9145.85
2	0.00	359	956	748	385	694	840	748	675.71
	1.00	846	1152	1141	1325	664	1804	3397	1475.57
	3.00	3677	2908	3189	3208	3554	3792	3118	3349.42
	5.00	5986	5316	6007	5312	4144	5141	5252	5308.28
	7.00	7012	7411	5907	5257	6903	7264	6259	6573.28
	9.00	8829	9228	8224	7574	9220	9581	8576	8747.42
3	0.00	244	492	587	784	489	369	796	537.28
	1.00	1270	1239	1077	1268	1319	1719	1116	1286.86
	3.00	3213	2875	4137	3146	3048	3149	2149	3102.42
	5.00	4830	4582	5117	6172	4464	5475	5437	5153.85
	7.00	7905	8055	6628	7448	5508	6448	7176	7024.00
	9.00	9764	9914	8487	9307	7367	8307	9035	8883.00

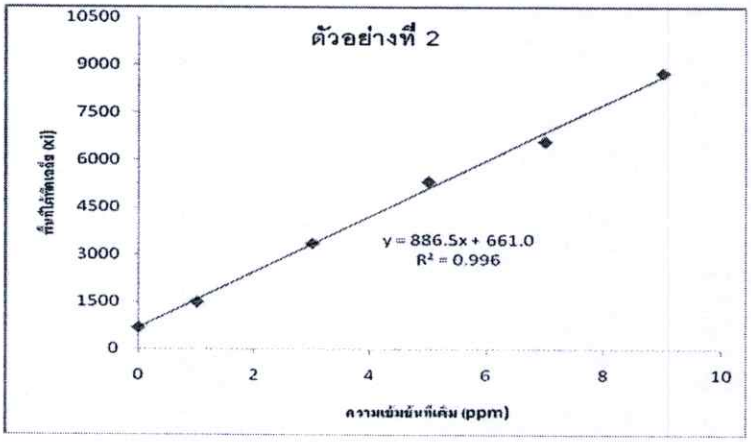
จากข้อมูลขั้นต้นได้สมการเส้นตรงในตัวอย่างตับหมู A คือ $y = 967.3x + 407.0$

ตัวอย่างตับหมู B คือ $y = 886.5x + 661.0$

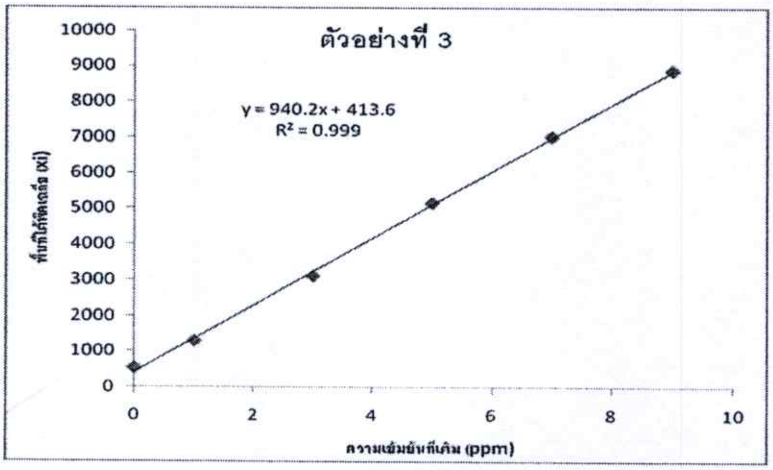
ตัวอย่างตับหมู C คือ $y = 940.2x + 413.6$



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ ฎ.1 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับที่ 1 : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C

ตัวอย่างที่	x_i	x_i^2	y_i	$(x_i-\overline{X})$	$(y_i-\overline{Y})$	$(x_i-\overline{X})^2$	$(y_i-\overline{Y})^2$
1	0.00	0.00	721.57	-4.17	-3715.93	17.36	13808125.00
	1.00	1.00	1109.71	-3.17	-3327.79	10.03	11074158.00
	3.00	9.00	3276.14	-1.17	-1161.36	1.36	1348750.00
	5.00	25.00	5035.28	0.83	597.78	0.69	357347.80
	7.00	49.00	7336.42	2.83	2898.92	8.03	8403787.00
	9.00	81.00	9145.85	4.83	4708.35	23.36	22168627.00
ผลรวม	25.00	165.00				60.83	57160795.00
ผลเฉลี่ย	4.17		4437.50				
2	0.00	0.00	675.71	-4.17	-4415.09	17.36	19492982.00
	1.00	1.00	1475.57	-3.17	-3615.23	10.03	13069878.00
	3.00	9.00	3349.42	-1.17	-1741.37	1.36	3032374.00
	5.00	25.00	5308.28	0.83	217.48	0.69	47300.04
	7.00	49.00	6573.28	2.83	1482.48	8.03	2197764.00
	9.00	81.00	8747.42	4.83	3656.62	23.36	13370933.00
ผลรวม	25.00	165.00				60.83	51211230.00
ผลเฉลี่ย	4.17		5090.80				
3	0.00	0.00	537.28	-4.17	-4552.74	17.36	20727468.00
	1.00	1.00	1286.85	-3.17	-3803.17	10.03	14464113.00
	3.00	9.00	3102.42	-1.17	-1987.60	1.36	3950554.00
	5.00	25.00	5153.85	0.83	63.82	0.69	4074.08
	7.00	49.00	7024.00	2.83	1933.97	8.03	3740245.00
	9.00	81.00	8883.00	4.83	3792.97	23.36	14386632.00
ผลรวม	25.00	165.00				60.83	57273086.00
ผลเฉลี่ย	4.17		5090.03				

จากนั้นพิสูจน์ว่า slop เท่ากับ 1 หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ slop (b) จาก

$$CI_{slop} = b \pm t_{(n-2)}S_b$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

S_b คือ standard deviation ของ slop

และ

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\left[\sum (y_i - \bar{y})^2\right]}{(n-2)}}$$

$S_{y/x}$ คือ standard deviation ของ regression line

ตัวอย่างที่	$S_{y/x}$	S_b	S_a
1	3780.23	484.67	154616.70
2	3578.10	458.75	146349.00
3	3783.94	485.14	154768.50

โดยค่า t จากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับขั้นความเสรี (degree of freedom; d.f (n-2); 6-2 = 4) ที่ระดับความมั่นใจ 95.0% มีค่า = 2.78

เพราะฉะนั้น CI ของ slop ตัวอย่างตับหมู A = 967.3 ± 2.78 x 484.6724

= 967.3 ± 1347.38 (ตั้งแต่ -380.08 ถึง 2314.68)

CI ของ slop ตัวอย่างตับหมู B = 886.5 ± 2.78 x 458.756

= 886.5 ± 1275.35 (ตั้งแต่ -388.85 ถึง 2161.85)

CI ของ slop ตัวอย่างตับหมู C = 940.2 ± 2.78 x 485.1483

= 940.2 ± 1348.71 (ตั้งแต่ -408.52 ถึง 2288.91)

และพิสูจน์ว่า intercept ผ่าน origin (x =0, y = 0) หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ intercept (a) จาก

$$CI_a = a \pm t_{(n-2)} S_a$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\left[\sum (y_i - \bar{y})^2\right]}{n(n-2)}}$$

S_a คือ standard deviation ของ intercept

CI ของ intercept ตัวอย่างตับหมู A = 407.0 ± 2.78 x 154616.7

= 407.0 ± 429834.4 (ตั้งแต่ -429834.4 ถึง 430241.4)

CI ของ intercept ตัวอย่างตับหมู B = 661.0 ± 2.78 x 146349

= 661.0 ± 406850.2 (ตั้งแต่ -406850.2 ถึง 407511.2)

CI ของ intercept ตัวอย่างตับหมู C = 413.6 ± 2.78 x 154768.5

= 413.6 ± 430256.4 (ตั้งแต่ -430256.4 ถึง430670)

จะเห็นได้ว่า intercept ไม่แตกต่างจาก 0 และ slop ไม่แตกต่างจาก 1 เพราะฉะนั้น ค่าจุดตัดแกน y จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง

จะได้สมการเส้นตรงตัวอย่างตับหมู A คือ y = 1029x

ตัวอย่างตับหมู B คือ y = 986.7x

ตัวอย่างตับหมู C คือ y = 1002x

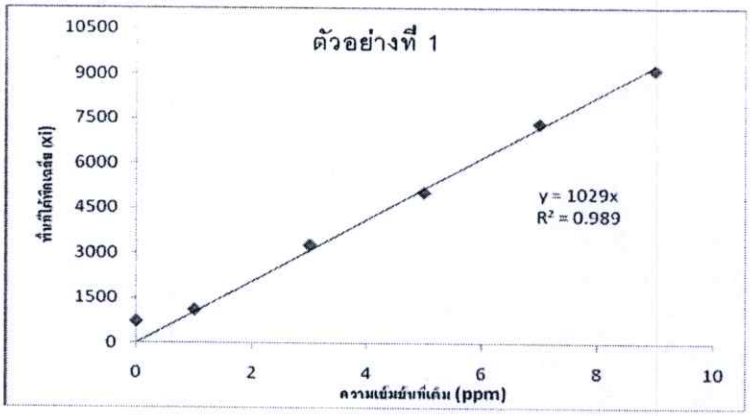
ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

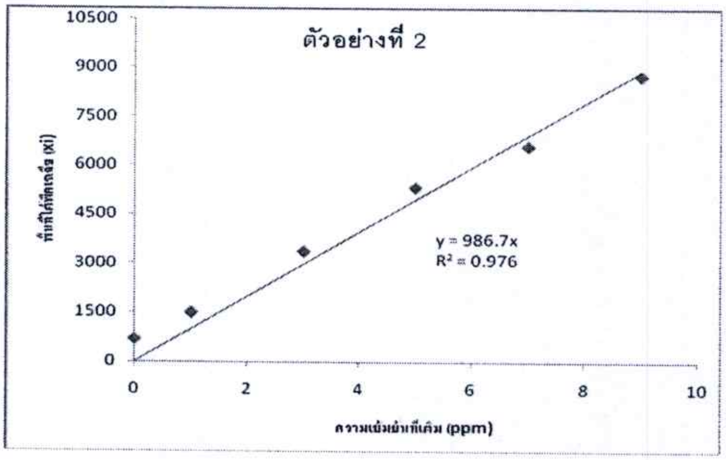
เมื่อ i = 1,…,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

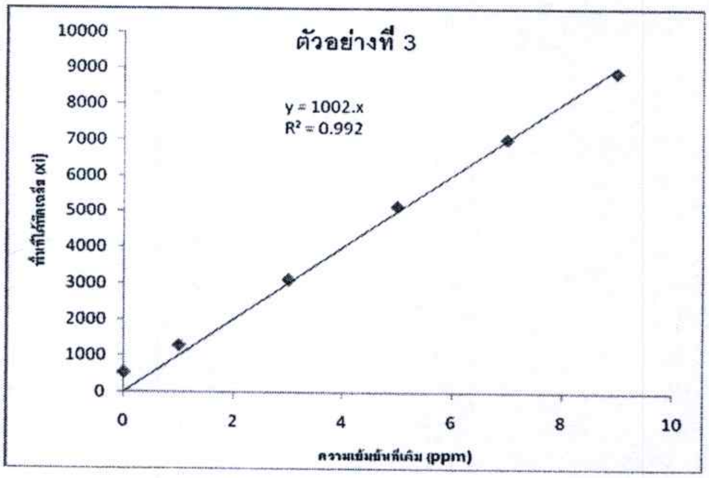
$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง (Regression line; y = 974.8x)



(ก)



(ข)

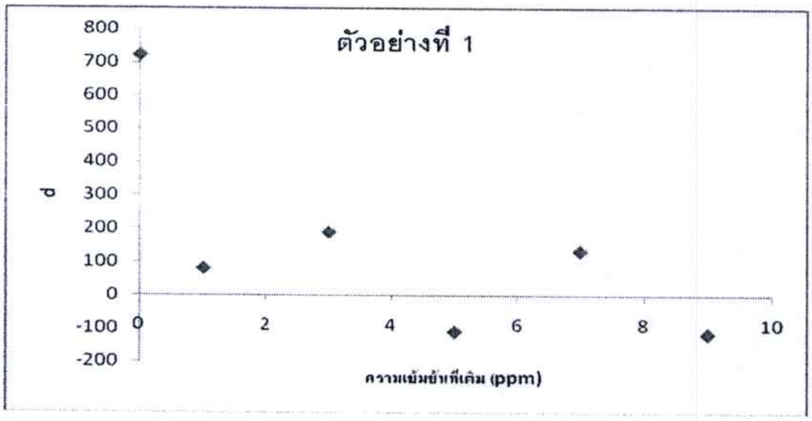


(ค)

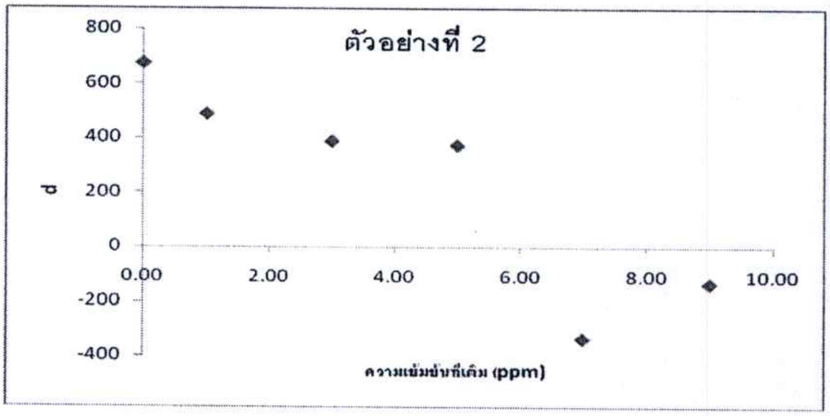
รูปที่ ฎ.2 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า อันดับที่ 2 : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C

ตัวอย่างที่	x_i	y_i	$\hat{y}_i$	$y_i-\hat{y}_i$
1	0.00	721.57	0.00	721.57
	1.00	1109.71	1029.00	80.71
	3.00	3276.14	3087.00	189.14
	5.00	5035.28	5145.00	-109.71
	7.00	7336.42	7203.00	133.42
	9.00	9145.85	9261.00	-115.14
2	0.00	675.71	0.00	675.71
	1.00	1475.57	986.70	488.87
	3.00	3349.42	2960.10	389.32
	5.00	5308.28	4933.50	374.78
	7.00	6573.28	6906.90	-333.61
	9.00	8747.42	8880.30	-132.87
3	0.00	537.28	0.00	537.28
	1.00	1286.85	1002.00	284.85
	3.00	3102.42	3006.00	96.42
	5.00	5153.85	5010.00	143.85
	7.00	7024.00	7014.00	10.00
	9.00	8883.00	9018.00	-135.00

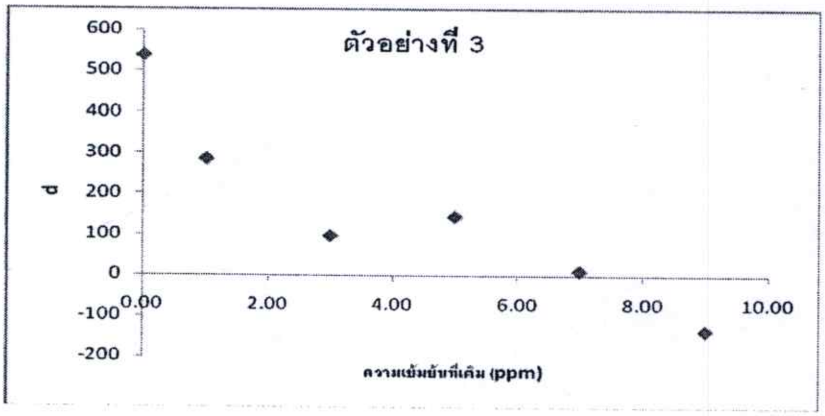
จากรูปที่ ฎ.3 พบว่า residual (d_i) มีการกระจายตัวแบบปกติ หมายความว่า กราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 1.00-9.00 ppm



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ ฎ.3 แสดง Residual plot สารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า: (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C

ฏ.2 การคำนวณค่า Method Linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติม (spiked sample) ด้วยสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น

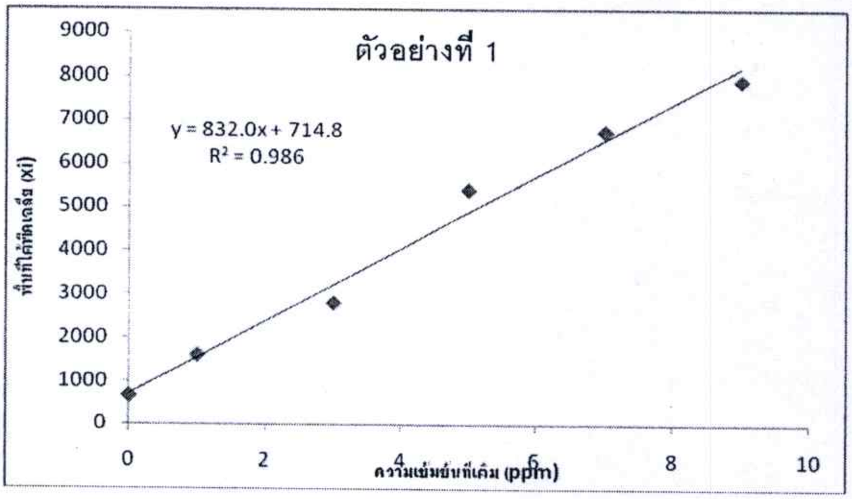
ตารางที่ ฏ.2 แสดงผลการศึกษา Method Linearity ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	ค่าความสูงของพีค							
		ครั้งที่							
		1	2	3	4	5	6	7	ค่าเฉลี่ย
1	0.00	694	628	573	894	653	516	726	669.14
	1.00	1239	1256	1759	1615	1758	1767	1821	1602.14
	3.00	2953	2155	2568	2727	3356	3121	2705	2797.85
	5.00	3996	5051	6111	5367	5653	6017	5567	5394.57
	7.00	7316	7160	6457	6907	7365	7313	4555	6724.71
	9.00	8208	8052	7349	7799	8257	8205	7447	7902.42
2	0.00	244	586	705	560	661	686	896	619.71
	1.00	1431	1486	1375	1457	1487	1332	1403	1424.42
	3.00	3543	3633	3867	3509	3622	3257	3437	3552.57
	5.00	5729	5947	4944	4588	5589	5689	5421	5415.28
	7.00	7830	7108	7065	6709	7710	7810	7542	7396.28
	9.00	8960	8912	8568	7899	8037	8094	7789	8322.71
3	0.00	545	918	689	467	378	443	863	614.71
	1.00	1360	1095	1390	1100	1390	1427	1953	1387.85
	3.00	3492	3626	3023	2895	3383	2733	2834	3140.85
	5.00	5594	5305	5049	5157	4893	5701	5733	5347.42
	7.00	7987	7168	6622	6892	7039	7283	7193	7169.14
	9.00	9209	8390	7844	8036	8363	8372	8476	8384.28

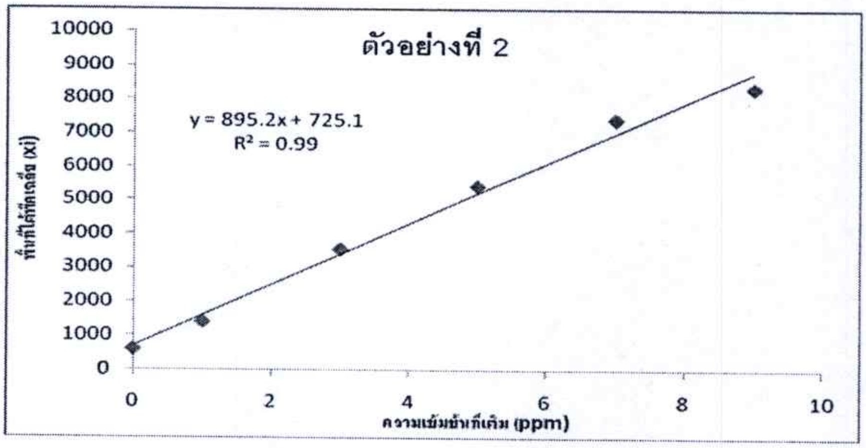
จากข้อมูลขั้นต้นได้สมการเส้นตรงในตัวอย่างตับหมู A คือ $y = 832.0x + 714.8$

ตัวอย่างตับหมู B คือ $y = 895.2x + 725.1$

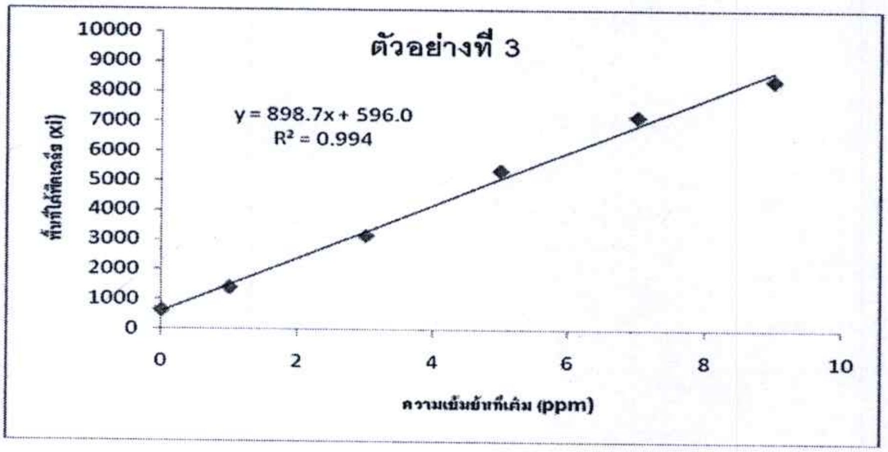
ตัวอย่างตับหมู C คือ $y = 898.7x + 596.0$



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ ฎ.4 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับที่ 1 : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C

ตัวอย่างที่	x_i	x_i^2	y_i	$(x_i-\overline{X})$	$(y_i-\overline{Y})$	$(x_i-\overline{X})^2$	$(y_i-\overline{Y})^2$
1	0.00	0.00	669.14	-4.17	-3512.67	17.36	12338827.00
	1.00	1.00	1602.14	-3.17	-2579.67	10.03	6654680.00
	3.00	9.00	2797.85	-1.17	-1383.95	1.36	1915324.00
	5.00	25.00	5394.57	0.83	1212.76	0.69	1470791.00
	7.00	49.00	6724.71	2.83	2542.90	8.03	6466365.00
	9.00	81.00	7902.42	4.83	3720.61	23.36	13843006.00
ผลรวม	25.00	165.00				60.83	42688994.00
ผลเฉลี่ย	4.17		4181.81				
2	0.00	0.00	619.71	-4.17	-3835.45	17.36	14710695.00
	1.00	1.00	1424.42	-3.17	-3030.74	10.03	9185373.00
	3.00	9.00	3552.57	-1.17	-902.59	1.36	814678.20
	5.00	25.00	5415.28	0.83	960.11	0.69	921828.60
	7.00	49.00	7396.28	2.83	2941.11	8.03	8650181.00
	9.00	81.00	8322.71	4.83	3867.54	23.36	14957925.00
ผลรวม	25.00	165.00				60.83	49240681.00
ผลเฉลี่ย	4.17		4455.16				
3	0.00	0.00	614.714	-4.17	-3726.00	17.36	13883076.00
	1.00	1.00	1387.85	-3.17	-2952.86	10.03	8719365.00
	3.00	9.00	3140.85	-1.17	-1199.86	1.36	1439657.00
	5.00	25.00	5347.42	0.83	1006.71	0.69	1013474.00
	7.00	49.00	7169.14	2.83	2828.42	8.03	8000008.00
	9.00	81.00	8384.28	4.83	4043.57	23.36	16350470.00
ผลรวม	25.00	165.00				60.83	49406050.00
ผลเฉลี่ย	4.17		4340.71				

จากนั้นพิสูจน์ว่า slop เท่ากับ 1 หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ slop (b) จาก

$$CI_{slop} = b \pm t_{(n-2)} S_b$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

S_b คือ standard deviation ของ slop

และ
$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\left[\sum(y_i - \bar{y})^2\right]}{(n-2)}}$$

$S_{y/x}$ คือ standard deviation ของ regression line

ตัวอย่างที่	$S_{y/x}$	S_b	S_a
1	3266.84	418.84	17427709.00
2	3508.58	449.84	20102424.00
3	3514.47	450.59	20169936.00

โดยค่า t จากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับขั้นความเสรี (degree of freedom; d.f (n-2); 6-2 = 4) ที่ระดับความมั่นใจ 95.0% มีค่า = 2.78

เพราะฉะนั้น CI ของ slop ตัวอย่างตับหมู A = 832.0 ± 2.78 x 418.8487
= 832.0 ± 1164.399 (ตั้งแต่ -332.3993 ถึง 1996.399)

CI ของ slop ตัวอย่างตับหมู B = 895.2 ± 2.78 x 449.8433
= 895.2 ±1250.564 (ตั้งแต่ -355.3643 ถึง 2145.764)

CI ของ slop ตัวอย่างตับหมู C = 898.7 ± 2.78 x 450.598
= 898.7 ± 1252.662 (ตั้งแต่ -353.9625 ถึง 2151.362)

และพิสูจน์ว่า intercept ผ่าน origin (x =0, y = 0) หรือไม่ โดยหา confidence interval (CI) ของ intercept (a) จาก

$$CI_a = a \pm t_{(n-2)} S_a$$

$$S_a = S_{y/x}\sqrt{\frac{\left[\sum(y_i - \bar{y})^2\right]}{n(n-2)}}$$

S_a คือ standard deviation ของ intercept

CI ของ intercept ตัวอย่างตับหมู A	=	714.8 ± 2.78 x 17427709
	=	714.8 ± 48449030 (ตั้งแต่ -48448315 ถึง 48449745)
CI ของ intercept ตัวอย่างตับหมู B	=	725.1 ± 2.78 x 20102424
	=	725.1 ± 55884738 (ตั้งแต่ -55884013 ถึง 55885463)
CI ของ intercept ตัวอย่างตับหมู C	=	596.0 ± 2.78 x 20169936
	=	596.0 ± 56072421 (ตั้งแต่ -56071825 ถึง 56073017)

จะเห็นได้ว่า intercept ไม่แตกต่างจาก 0 และ slop ไม่แตกต่างจาก 1 เพราะฉะนั้น ค่าจุดตัดแกน y จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง

จะได้สมการเส้นตรงตัวอย่างตับหมู A คือ y = 940.3x

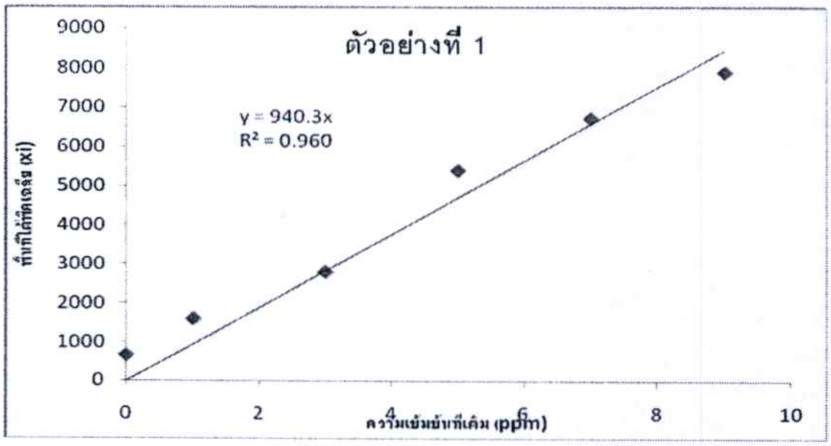
ตัวอย่างตับหมู B คือ y = 1005.x

ตัวอย่างตับหมู C คือ y = 989.0x

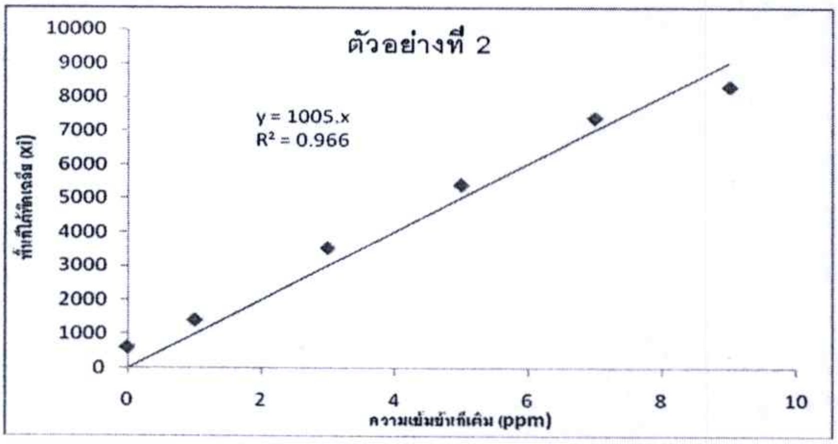
ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

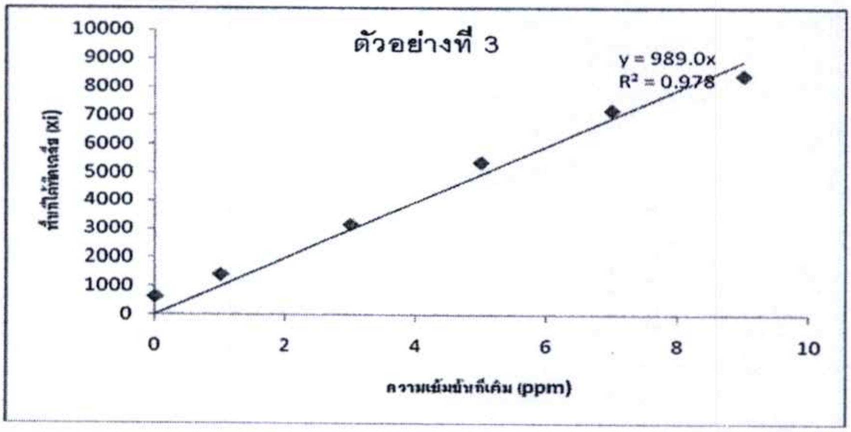
เมื่อ	i	=	1,…,n
	y_i	=	ค่าที่ได้จากการทดลอง
	$\hat{y}_i$	=	ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง (Regression line; y = 974.8x)



(ก)



(ข)

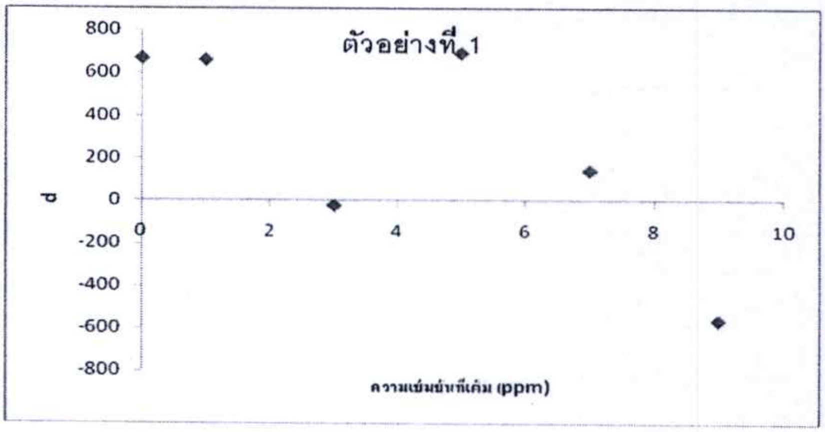


(ค)

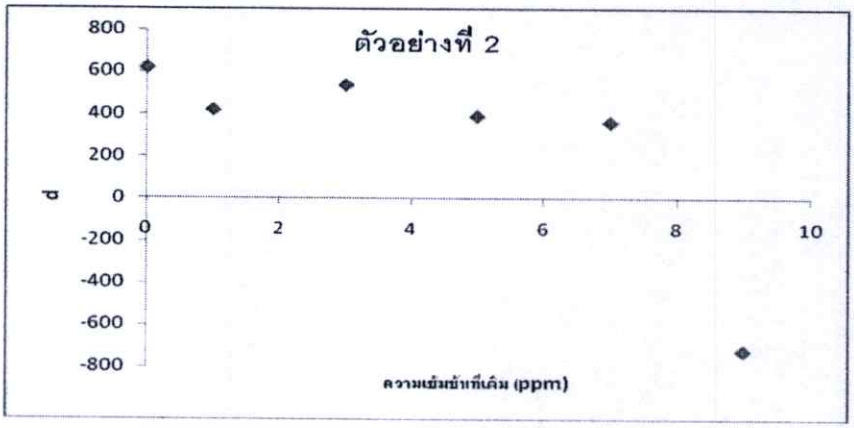
รูปที่ ฎ.5 แสดงกราฟสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น อันดับที่ 2 : (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C

ตัวอย่างที่	x_i	y_i	$\hat{y}_i$	yi-ŷi
1	0.00	669.14	0.00	669.14
	1.00	1602.14	940.30	661.84
	3.00	2797.85	2820.90	-23.04
	5.00	5394.57	4701.50	693.07
	7.00	6724.71	6582.10	142.61
	9.00	7902.42	8462.70	-560.27
2	0.00	619.71	0.00	619.71
	1.00	1424.42	1005.00	419.42
	3.00	3552.57	3015.00	537.57
	5.00	5415.28	5025.00	390.28
	7.00	7396.28	7035.00	361.28
	9.00	8322.71	9045.00	-722.28
3	0.00	614.71	0.00	614.71
	1.00	1387.85	989.00	398.85
	3.00	3140.85	2967.00	173.85
	5.00	5347.42	4945.00	402.42
	7.00	7169.14	6923.00	246.14
	9.00	8384.28	9063.00	-678.71

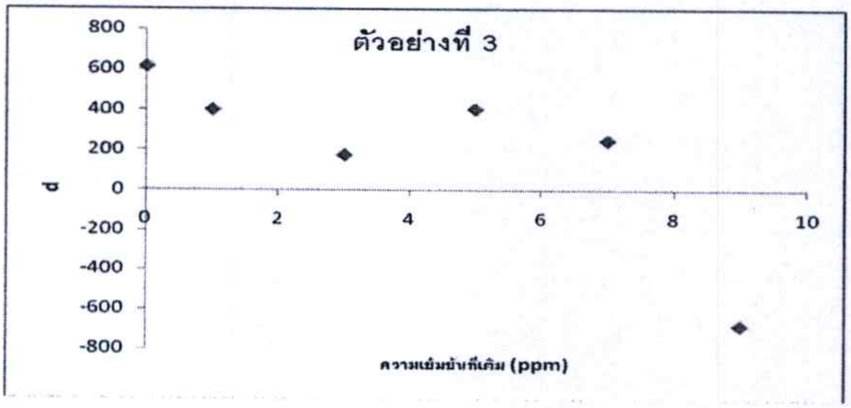
จากรูปที่ ฏ.6 พบว่า residual (d_i) มีการกระจายตัวแบบปกติ หมายความว่า กราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 1.00-9.00 ppm



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ ฎ.6 แสดง Residual plot สารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมในตัวอย่างและผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น: (ก).ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C

ฏ.3 เปรียบเทียบค่าทางสถิติของ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่าง SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น โดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ จากสูตร

$$t_{cal} = \bar{x}_d \times \frac{\sqrt{n}}{S_d}$$

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นเริ่มต้น (ppm)	ความเข้มข้นที่ชะได้เฉลี่ย (ppm)		ผลต่าง x_d	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		คอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้า	คอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น			
1	0.00	0.74	0.69	0.0537	0.26	0.24
	1.00	1.14	1.64	-0.5051		
	3.00	3.36	2.87	0.4906		
	5.00	5.17	5.53	-0.3685		
	7.00	7.53	6.90	0.6275		
	9.00	9.38	8.11	1.2755		
2	0.00	0.69	0.64	0.0574	-0.10	0.19
	1.00	1.51	1.46	0.0524		
	3.00	3.44	3.64	-0.2083		
	5.00	5.45	5.56	-0.1097		
	7.00	6.74	7.59	-0.8442		
	9.00	8.97	8.54	0.4356		
3	0.00	0.55	0.63	-0.0794	-0.01	0.10
	1.00	1.32	1.42	-0.1036		
	3.00	3.18	3.22	-0.0394		
	5.00	5.29	5.49	-0.1985		
	7.00	7.21	7.35	-0.1488		
	9.00	9.11	8.60	0.5116		

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี (n-1; 6-1 = 5) ที่ระดับความมั่นใจ 95.0% มีค่าเท่ากับ 2.57 จะได้ t_{cal} ของตัวอย่างตับหมู A, 2 และ 3 เท่ากับ 2.58, -1.33 และ -0.24 ตามลำดับ พบว่า ค่า t_{cal} ในตัวอย่างตับหมู B และ 3 มีค่าน้อยกว่า t_{crit} ส่วนตัวอย่างตับหมู A มีค่ามากกว่า t_{crit} เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ภาคผนวก ฐ.

การคำนวณค่า LOD และ estimated LOQ

การคำนวณค่า LOD และ estimates LOQ ของเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ในตัวอย่างตับหมู

สามารถหาได้จากข้อมูลการทำ Method Linearity โดย LOD และ LOQ หาได้จากสูตร

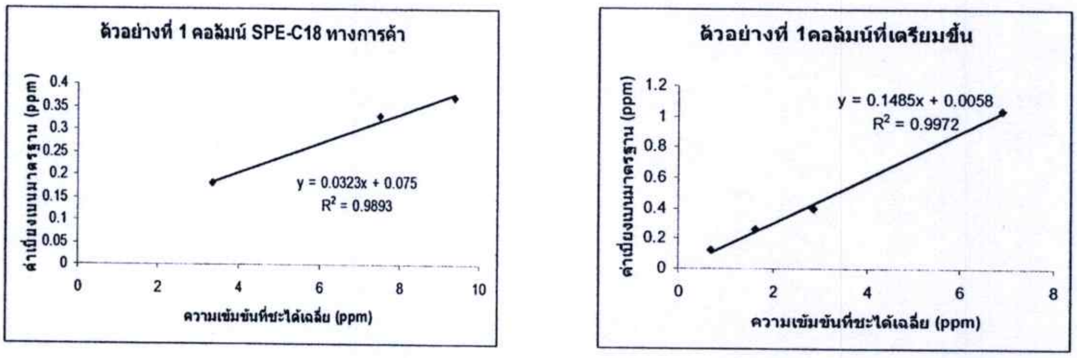
$$LOD = 3S_B$$

$$LOQ = 10S_B$$

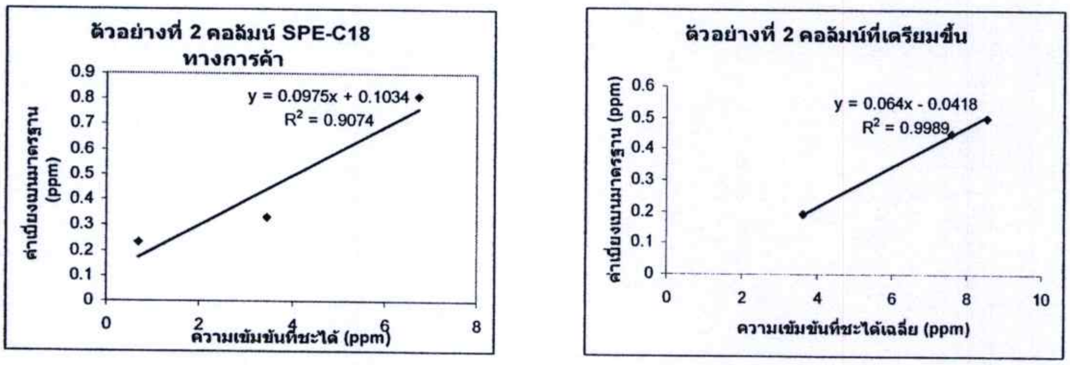
ตารางที่ ฐ .1 แสดงผลการศึกษาค่า LOQ และ LOQ ของสารเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	คอลัมน์ SPE-C18			
		ทางการค้า		ที่เตรียมขึ้น	
		ความเข้มข้นเฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)
1	0.00	0.74	0.18	0.69	0.12
	1.00	1.14	0.20	1.64	0.26
	3.00	3.36	0.18	2.87	0.40
	5.00	5.17	0.56	5.53	0.73
	7.00	7.53	0.33	6.90	1.04
	9.00	9.38	0.37	8.11	0.39
2	0.00	0.69	0.23	0.64	0.20
	1.00	1.51	0.95	1.46	0.06
	3.00	3.44	0.33	3.64	0.19
	5.00	5.45	0.64	5.56	0.49
	7.00	6.74	0.81	7.59	0.45
	9.00	8.97	0.27	8.54	0.50
3	0.00	0.55	0.21	0.63	0.22
	1.00	1.32	0.22	1.42	0.29
	3.00	3.18	0.60	3.22	0.36
	5.00	5.29	0.61	5.49	0.34
	7.00	7.21	0.92	7.35	0.43
	9.00	9.11	0.92	8.60	0.44

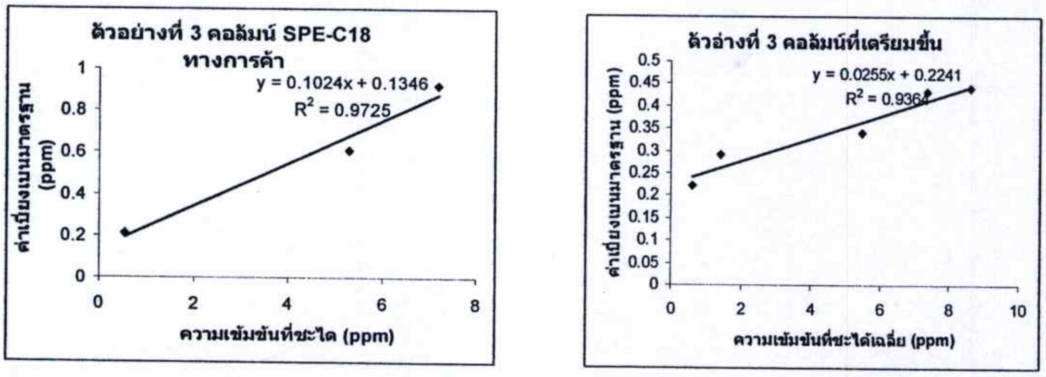
นำข้อมูลที่ได้มาพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นที่ชะได้เฉลี่ย (แกน x) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แกน y) สร้างสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยจุดตัดแกน $y = a = S_b$



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ ฐ.1 แสดงความสัมพันธ์ของ spiked sample blank กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่าน SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น: (ก). ตัวอย่างตับหมู A (ข) ตัวอย่างตับหมู B (ค) ตัวอย่างตับหมู C

สมการเส้นตรงเมื่อผ่าน SPE-C18 ทางการค้า	ตัวอย่างตับหมู A คือ y = 0.0323x + 0.075
	ตัวอย่างตับหมู B คือ y = 0.0975x + 0.1034
	ตัวอย่างตับหมู C คือ y = 0.1024x + 0.134
เมื่อผ่าน SPE-C18 ที่เตรียมขึ้น	ตัวอย่างตับหมู A คือ y = 0.1485x + 0.0058
	ตัวอย่างตับหมู B คือ y = 0.064x – 0.0418
	ตัวอย่างตับหมู C คือ y = 0.0255x + 0.2241

เมื่อแทนค่าลงในสมการ LOD และ LOQ จะได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 4.3

ภาคผนวก ฒ.

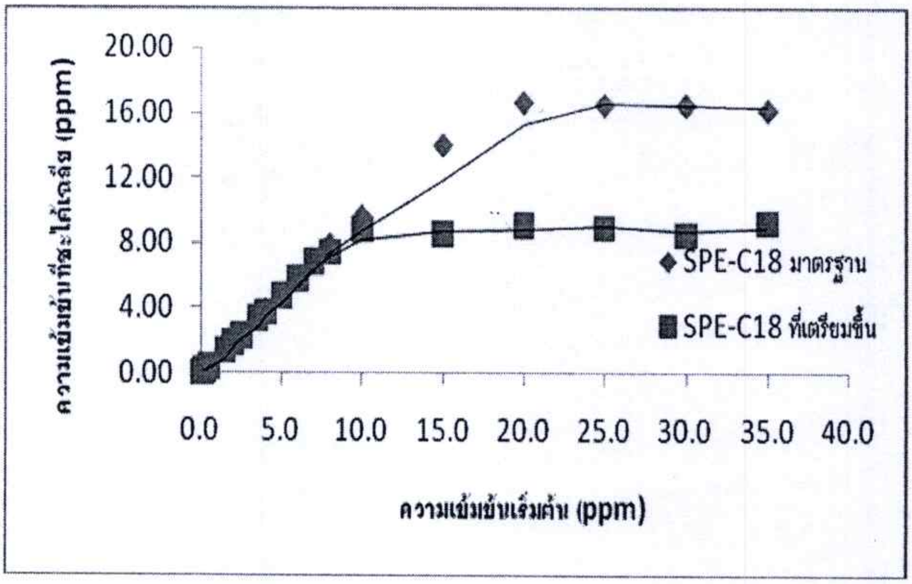
การคำนวณค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ฆ .1 การคำนวณค่าความถูกต้องของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18

นำข้อมูลการ system linearity คำนวณหาร้อยละการคืนกลับของคอลัมน์ SPE-C18 ดังแสดงในตารางที่ ฆ.1

ตารางที่ ฆ.1 แสดงค่าการศึกษาผลค่าความถูกต้องที่ได้ของสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

ความเข้มข้นเริ่มต้น (ppm)	คอลัมน์ SPE-C18					
	ทางการค้า			ที่เตรียมขึ้น		
	ความเข้มข้นที่ชะได้เฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละค่าคืนกลับ	ความเข้มข้นที่ชะได้เฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละค่าคืนกลับ
0.05	0.03	0.02	56.07	0.05	0.01	96.43
0.10	0.09	0.01	88.22	0.10	0.01	96.43
0.15	0.14	0.01	92.78	0.13	0.01	88.22
0.20	0.18	0.01	88.22	0.16	0.01	82.06
0.25	0.24	0.01	94.51	0.19	0.03	77.55
0.50	0.42	0.06	83.98	0.40	0.07	80.08
1.50	1.39	0.08	92.44	1.43	0.07	95.38
2.00	1.84	0.09	91.88	1.87	0.06	93.59
2.50	2.33	0.13	93.18	2.33	0.12	93.18
3.50	3.36	0.12	95.97	3.39	0.10	96.94
4.00	3.81	0.10	95.26	3.74	0.21	93.55
5.00	4.74	0.14	94.71	4.77	0.45	95.39
6.00	5.71	0.38	95.20	5.85	0.21	97.48
7.00	6.85	0.12	97.86	6.88	0.10	98.34
8.00	7.82	0.25	97.71	7.51	0.50	93.86
10.00	9.57	0.49	95.73	8.89	0.53	88.89
15.00	13.97	0.52	93.12	8.59	0.54	57.24
20.00	16.59	0.81	82.97	9.12	0.80	45.59
25.00	16.45	0.39	65.79	9.00	0.54	35.98
30.00	16.43	0.45	54.77	8.57	0.81	28.55
35.00	16.16	0.52	46.04	9.28	0.73	26.50



รูปที่ ฒ.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่เตรียมขึ้นและทางการค้า

การคำนวณค่าความถูกต้อง หาได้จากการคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) จากสูตร

$$\%Recovery = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \qquad (1)$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample)

C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง (unspiked sample)

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

ซึ่งเกณฑ์การยอมรับค่าความถูกต้องของความเข้มข้นสารวิเคราะห์ตามมาตรฐาน AOAC แสดงดังในตารางที่ ฒ.2

ตารางที่ ฆ .2 แสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความถูกต้อง (The AOAC manual for the Peer-Verified Methods Program, 193)

Concentration of the analyst	Mean Recovery %
10-100%	98-102
≥ 1% (10,000 ppm)	97-103
≥ 0,1% (1,000 ppm)	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	80-115
1 ppb	40-120

พบว่าร้อยละการคืนกลับของ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้นในช่วงความเข้มข้น 0.05-8.00 ppm อยู่ในช่วง 56.07-97.86% และ 77.55-98.34% ตามลำดับ และอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ฒ .2 การคำนวณค่าความถูกต้องของสารละลายเททราซัยคลินในตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18

ข้อมูล method linearity คำนวณหาร้อยละการคืนกลับของคอลัมน์ SPE-C18 ดังแสดงในตารางที่ ฏ.3

ตารางที่ ฒ.3 แสดงค่าการศึกษาผลที่ได้ของสารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่เติมใน ตัวอย่างผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นที่เติม (ppm)	คอลัมน์ SPE-C18					
		ทางการค้า			ผลิตเอง		
		ความเข้มข้นที่ชะได้เฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละค่าคืนกลับ	ความเข้มข้นที่ชะได้เฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละค่าคืนกลับ
1	0.00	0.74	0.18	0.00	0.69	0.12	0.00
	1.00	1.14	0.20	39.82	1.64	0.26	95.71
	3.00	3.36	0.18	87.35	2.87	0.40	72.79
	5.00	5.17	0.56	88.50	5.53	0.73	96.95
	7.00	7.53	0.33	96.94	6.90	1.04	88.74
	9.00	9.38	0.37	96.02	8.11	0.39	82.45
2	0.00	0.69	0.23	0.00	0.64	0.20	0.00
	1.00	1.51	0.95	82.05	1.46	0.06	77.48
	3.00	3.44	0.33	91.43	3.64	0.19	98.60
	5.00	5.45	0.64	95.05	5.56	0.49	97.38
	7.00	6.74	0.81	86.43	7.59	0.45	98.59
	9.00	8.97	0.27	92.00	8.54	0.50	87.24
3	0.00	0.55	0.21	0.00	0.63	0.22	0.00
	1.00	1.32	0.22	76.89	1.42	0.29	73.73
	3.00	3.18	0.60	87.72	3.22	0.36	84.52
	5.00	5.29	0.61	94.72	5.49	0.34	95.98
	7.00	7.21	0.92	95.06	7.35	0.43	95.26
	9.00	9.11	0.92	95.13	8.60	0.44	87.94

พบว่าร้อยละการคืนกลับในสารตัวอย่างของคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้นอยู่ในช่วง 39.82-96.94% และ 72.79-98.60% ตามลำดับและอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ฒ .3 การคำนวณค่าความเที่ยงของเททราซัยคลินที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่ไม่ได้ใช้ซ้ำ

ตารางที่ ฒ.4 แสดงผลการทดสอบสารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่ไม่ได้นำมาใช้ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 5.00 ppm

คอลัมน์ SPE-C18	วันที่	ค่าพื้นที่ใต้พีค(Ao)							
		ครั้งที่							ค่าเฉลี่ย
		1	2	3	4	5	6	7	
ทางการค้า	1	4610	4585	4800	4483	4858	4785	4602	4674.71
	2	4208	4651	5248	4863	4692	5038	4755	4779.28
	3	5210	4564	5280	4516	5042	4144	5200	4850.85
ที่เตรียมขึ้น	1	4811	4556	4189	4783	3649	4709	4059	4393.71
	2	4572	4990	4907	4306	4243	4164	4688	4552.85
	3	4510	4910	4528	3663	4086	4826	4320	4406.14

คำนวณหาค่าความเที่ยง (%RSD) จากสูตร

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}} \qquad (2)$$

โดยที่ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบหาได้จากสมการ

$$SD = \sqrt{\frac{\left(\sum (x_i - \bar{x})^2\right)}{n-1}} \qquad (3)$$

แทนค่าดังแสดงในตารางที่ ฒ.5

ตารางที่ ฒ.5 แสดงผลที่ได้จากการคำนวณค่าความเที่ยงของคอลัมน์ SPE-C18 ที่ไม่ได้ใช้ซ้ำ

คอลัมน์ SPE-C18	วันที่	ค่าเฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)	$\%RSD_r$	ค่าเฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)	$\%RSD_R$
ทางการค้า	1	4.79	0.14	2.97	4.89	0.09	1.85
	2	4.90	0.33	6.85			
	3	4.97	0.45	9.08			
ที่เตรียมขึ้น	1	4.50	0.45	10.00	4.56	0.09	1.98
	2	4.67	0.33	7.19			
	3	4.52	0.44	9.79			

โดยเกณฑ์การยอมรับของ AOAC แสดงดังในตารางที่ ฒ .6

ตารางที่ ฒ .6 แสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความเที่ยง (The AOAC manual for the Peer-Verified Method Program, 1993)

Concentration of the analyst	% RSD
100%	1.30
10%	1.80
1%	2.60
0.1%	3.70
100.00 ppm	5.20
10.00 ppm	7.40
1.00 ppm	10.50
100.00 ppb	14.90
10.00 ppb	21.10
1.00 ppb	29.80

จากข้อมูลขั้นต้นพบว่าสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5.00 ppm มีค่า %RSD (repeatability) โดยผ่าน SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้นซึ่งไม่ได้นำมาใช้ซ้ำอยู่ในช่วง 3.0-9.0% และ 7.0-10.0% ตามลำดับ และ%RSD (reproducibility) ที่ผ่าน SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมมีค่า 1.86% และ 1.98% ตามลำดับ

ตารางที่ ฒ .7 เกณฑ์การยอมรับค่าความเที่ยงใช้เกณฑ์ AOAC และ Codex ของ EU กำหนดไว้ดังนี้

Reference	ค่า HORRAT ที่ยอมรับ
AOAC	< 2
Codex, EU	≤ 2

การประเมินความเที่ยงโดยใช้ Horwitz eqution

$$RSD_r = 0.66x\, 2^{(1-0.5\log C)} \quad (4)$$

$$RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)} \quad (5)$$

เมื่อ $\%RSD_r$ = ค่า RSD จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการเดียวกันหรือวันเดียวกัน (Repeatability) จัดเป็น Predicted RSD

$\%RSD_R$ = ค่า RSD จากการทดสอบต่างห้องปฏิบัติการเดียวกันหรือต่างวันกัน (Reproducibility) จัดเป็น Predicted RSD

C = Concentration ratio

นำค่า RSD ที่ได้จากคำนวณในสมการที่ 2 มาเทียบกับค่า RSD ที่คำนวณได้ จากสมการที่ 4 และ 5 จะได้ Horwitz' Ratio หรือ Horrat ดังสมการต่อไปนี้

$$Horwitz\text{ 's} - ratio\ /\ Horrat = \frac{Expermental - RSD}{Predicted - RSD} \quad (6)$$

พบว่าค่า HORRAT ที่ได้มีอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่า ความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ฒ .4 การคำนวณค่าความเที่ยงของเททราซัยคลินที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่ใช้ซ้ำ

ตารางที่ ฒ.8 แสดงผลการทดสอบสารละลายเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ที่นำมาใช้ซ้ำที่ระดับความเข้มข้น 5.00 ppm

คอลัมน์ SPE-C18	วันที่	ค่าพื้นที่ใต้พีค(xi)							
		ครั้งที่							
		1	2	3	4	5	6	7	ค่าเฉลี่ย
ทางการค้า	1	4410	4585	4800	5183	4858	4785	4602	4746.14
	2	4561	4731	4558	3927	4387	4898	4429	4498.71
	3	4583	4730	4264	4677	4981	4040	4811	4583.71
ที่เตรียมขึ้น	1	4317	4620	4959	4434	4318	4292	4211	4450.14
	2	4811	4556	3189	4783	3649	4709	4059	4250.85
	3	4735	4462	4528	4886	3196	4664	3156	4232.42

คำนวณหาค่าความเที่ยง (%RSD) จากสูตรที่ 2 จะได้ค่าดังในตารางที่ ฒ.9

ตารางที่ ฒ.9 แสดงผลที่ได้จากการคำนวณค่าความเที่ยงของคอลัมน์ SPE-C18 ที่ใช้ซ้ำ

คอลัมน์ SPE-C18	วันที่	ค่าเฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)	$\%RSD_r$	ค่าเฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)	$\%RSD_R$
ทางการค้า	1	4.86	0.25	5.21	4.72	0.12	2.72
	2	4.61	0.31	6.82			
	3	4.70	0.33	7.11			
ที่เตรียมขึ้น	1	4.56	0.26	5.84	4.56	0.12	2.80
	2	4.36	0.65	14.96			
	3	4.34	0.75	17.35			

โดยเกณฑ์การยอมรับของ AOAC แสดงดังในตารางที่ ฒ .5

จากข้อมูลขั้นต้นพบว่าสารละลายมาตรฐานเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5.00 ppm มีค่า %RSD (repeatability) โดยผ่าน SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้นซึ่งนำมาใช้ซ้ำอยู่ในช่วง 5.2-7.1% และ 5.8-17.3% ตามลำดับ และ%RSD (reproducibility) ที่ผ่าน SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมมีค่า 2.72% และ 2.8% ตามลำดับ

นำค่า RSD ที่ได้จากคำนวณในสมการที่ 2 มาเทียบกับค่า RSD ที่คำนวณได้ จากสมการที่ 4 และ 5 จะได้ Horwitz' Ratio หรือ Horrat ดังตารางที่ ฒ.10

พบว่าค่า HORRAT ที่ได้มีอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่า ความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ภาคผนวก ณ.

ปริมาณสารเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ในตัวอย่างตับหมู

ตารางที่ ณ.1 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ในตัวอย่างตับหมู A, B และ C

คอลัมน์ SPE-C18	ตัวอย่าง	ค่าพื้นที่ใต้พีค (xi) จำนวนครั้งที่ตรวจวัด							ความเข้มข้นที่ชะได้เฉลี่ย (ppm)	ความเข้มข้น (μg/g)
		1	2	3	4	5	6	7		
ทางการค้า	A	742	885	727	627	540	533	997	0.74	2.96
	B	359	956	748	385	694	840	748	0.69	2.76
	C	244	492	587	784	489	369	796	0.55	2.20
ที่เตรียมขึ้น	A	694	628	573	894	653	516	726	0.68	2.76
	B	244	586	705	560	661	686	896	0.63	2.56
	C	545	918	689	467	378	443	863	0.63	2.52

ภาคผนวก ด.

เวลาในการไหลผ่านสารในคอลัมน์ SPE-C18

เปรียบเทียบเวลาในการใช้ผ่านสารละลายของคอลัมน์ SPE-C18 แต่ละชนิด (ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น) แสดงดังในตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 แสดงเวลาการไหลผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

คอลัมน์ SPE-C18 ลำดับที่	เวลาในการผ่านคอลัมน์ SPE-C18 (วินาที)							
	ทางการค้า				ที่เตรียมขึ้น			
	จำนวนครั้ง			เฉลี่ย	จำนวนครั้ง			เฉลี่ย
	1	2	3		1	2	3	
1	7.34	8.41	8.37	8.04	22.13	21.38	22.56	22.02
2	8.16	7.82	7.71	7.90	6.38	8.67	7.21	7.42
3	12.28	13.42	12.14	12.61	7.72	8.35	7.42	7.83
4	12.57	12.42	14.75	13.25	18.69	19.74	18.32	18.92
5	14.66	15.11	14.38	14.72	19.31	18.86	19.82	19.33
6	20.06	22.91	20.83	21.27	7.66	6.69	7.32	7.22
7	10.93	9.23	11.67	10.61	9.58	10.51	11.38	10.49
8	12.1	13.14	13.17	12.80	13.44	14.23	15.34	14.34
9	24.69	23.38	24.71	24.26	16.9	16.81	15.87	16.53
10	13.45	12.68	13.2	13.11	17.25	16.75	16.09	16.70
เฉลี่ย				13.86				14.08

จากข้อมูลพบว่า เวลาในการไหลผ่านคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้นแต่ละคอลัมน์จะอยู่ในช่วง 8.04-24.26 วินาที และ 7.22-22.02 วินาที ตามลำดับ

นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่าง SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น โดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ จากสูตร

$$t_{cal} = \bar{x}_d \times \frac{\sqrt{n}}{S_d}$$

จะได้

ตารางที่ ง.2 เปรียบเทียบค่าจากการทำ Paired-t-test ระหว่างคอลัมน์ SPE-C18 ทางการค้าและที่เตรียมขึ้น

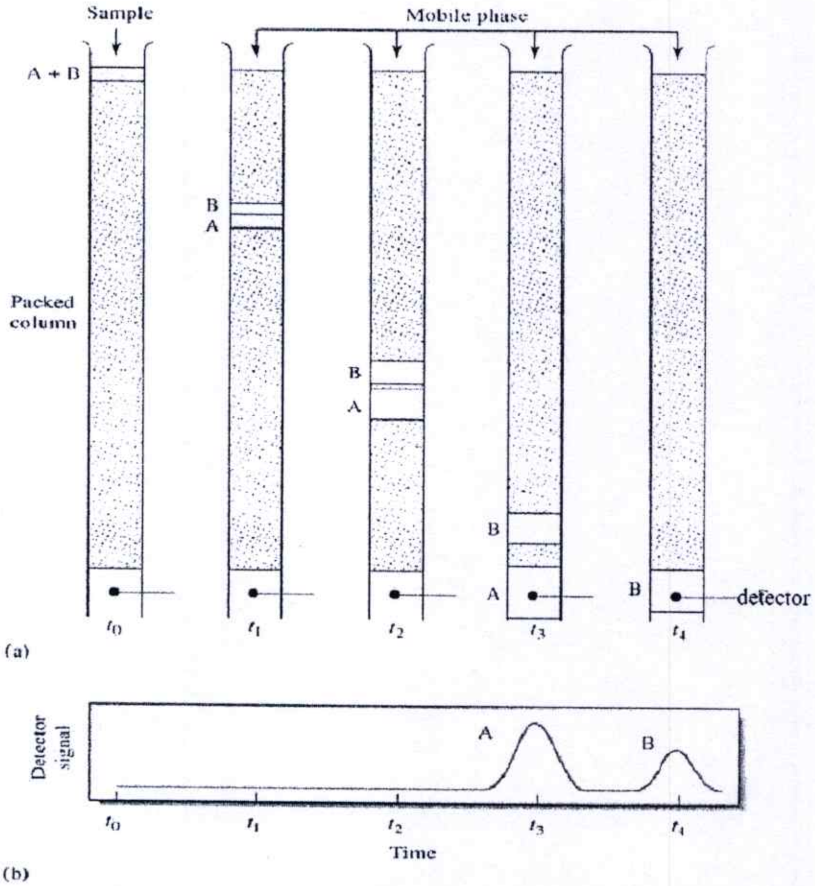
คอลัมน์ SPE-C18 ลำดับที่	เวลาในการผ่านคอลัมน์ SPE-C18 เฉลี่ย (วินาที)		ผลต่าง x_d	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ทางการค้า	ที่เตรียมขึ้น			
1	8.04	22.02	-13.98	-0.22	7.77
2	7.89	7.42	0.48		
3	12.61	7.83	4.78		
4	13.24	18.92	-5.67		
5	14.71	19.33	-4.61		
6	21.26	7.22	14.04		
7	10.61	10.49	0.12		
8	12.80	14.34	-1.53		
9	24.26	16.53	7.73		
10	13.11	16.70	-3.59		

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี (n-1; 10-1 = 9) ที่ระดับความมั่นใจ 95.0% มีค่าเท่ากับ 2.26 จะได้ t_{cal} เท่ากับ -0.090 พบว่า ค่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ภาคผนวก ต.

ทฤษฎีโครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยกสารตัวอย่างซึ่งมีส่วนประกอบหลายๆ ชนิด การแยกสารจะอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารระหว่างสองเฟส โดยเฟสที่เป็นตัวดูดซับเรียกว่า เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) กับเฟสที่เป็นตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่เรียกว่า เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) มีหลักการทำงานคือ โมเลกุลของตัวถูกละลายในสารตัวอย่างจะผ่านเข้าไปในคอลัมน์และนำพาออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ขณะที่สารละลายในสารตัวอย่างผสมผ่านเข้าไปในคอลัมน์จะถูกพาออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ในอัตราเร็วต่างๆ กัน โดยจะเกิดการกระจายตัว (distribute) ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ไปพร้อมๆ กัน เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายและถูกดูดซับต่างกัน จึงทำให้อัตราการเคลื่อนที่แต่ละสารต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ ต.1 มีสาร A กับสาร B ผสมกันอยู่ สาร A ถูกดูดซับที่เฟสที่อยู่กับที่ได้น้อย จึงเคลื่อนที่ได้เร็วและถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสาร B ถูกดูดซับที่เฟสที่อยู่กับที่ได้มากจึงเคลื่อนที่ได้ช้าและถูกแยกออกทีหลัง [32, 33]



รูปที่ ต.1 การแยกสาร A ออกจาก สาร B โดยอาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี [33]

ความแตกต่างระหว่างอัตราการเคลื่อนที่หรือการกระจายตัวของสารจะเกิดจากสมดุลของการกระจายตัวของสารชนิดต่างๆ การที่สารจะกระจายตัวได้ดีกว่าในเฟสใดนั้นขึ้นกับแรงหน่วงของโมเลกุลของสารกับเฟสทั้งสอง ถ้าสารมีแรงหน่วงเหนี่ยวกับเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าก็จะทำให้ถูกแยกออกมาทีหลัง แต่ถ้าสารใดมีแรงหน่วงเหนี่ยวกับเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าก็จะถูกแยกออกมาก่อน กลไกของการหน่วงเหนี่ยวนั้นจะเกิดจากอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารตัวอย่าง เช่น แรงคูลอมบ์ระหว่างไอออน, แรงไดโพล-ไดโพล หรือแรงระหว่างอะตอมที่เป็นกลางกับโมเลกุลของสารในเฟสทั้งสอง คือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของเฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง [45]

1 ปัจจัยที่มีผลต่อการคงไว้ (Factors affecting retention)

เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างอยู่ในคอลัมน์จะเกิดสมดุลของการกระจายระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่ การคงไว้จะถูกควบคุมจากผลของการกระจายระหว่างเฟสทั้งสอง ส่วนประกอบของเฟสที่เคลื่อนที่ ธรรมชาติของเฟสที่อยู่กับที่และอุณหภูมิ สำหรับความดันนั้นตามทฤษฎีแล้วจะมีผลต่อการกระจาย (distribution) ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี สำหรับเทคนิคของเหลว-ของเหลวโครมาโทรกราฟีความดันจะไม่มีผลต่อการกระจาย

ปัจจัยที่มีผลต่อการคงไว้เป็นแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (intermolecular force) ซึ่งเป็นแรงทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) ที่เป็นไปตามกฎของคูลอมบ์ (coulomb law) ได้แก่

1.) แรงคูลอมบ์ระหว่างไอออน (coulombic forces between ions)
2.) แรงไดโพล-ไดโพล (dipole-dipole interaction)
3.) แรงไดโพล-ไดโพลเหนี่ยวนำ (dipole-induce dipole interaction)
4.) แรงระหว่างอะตอมที่เป็นกลางกับโมเลกุล (dispersion forces)
5.) แรงไอออน-ไดโพลเหนี่ยวนำ (ion-induceddipole interaction)
6.) พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonding interactions)

แรงวันเดอร์วาลล์เกิดจากแรงดึงดูดระหว่างนิวเคลียสที่มีประจุบวกของโมเลกุลกับกลุ่มอิเล็กตรอนของโมเลกุลใกล้เคียง ซึ่งแรงนี้อาจเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุล อะตอนหรือไอออนได้ โดยแรงในข้อ 2, 3 และ 4 เป็นแรงวันเดอร์วาลส์ (Van der waals forces)

- แรงไดโพล-ไดโพล (dipole-dipole interaction) เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลแบบมีขั้ว โดยโมเลกุลหนึ่งแสดงอำนาจที่เป็นขั้วไฟฟ้าบวกและอีกด้านแสดงอำนาจไฟฟ้าลบดึงดูดกัน แรงไดโพล-ไดโพลจะมีบทบาทในการจัดเรียงโมเลกุลให้เป็นระเบียบ แต่แรงจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่ม
- แรงไดโพล-ไดโพลเหนี่ยวนำ (dipole-induce dipole interaction) เป็นแรงวันเดอร์วาลล์ในโมเลกุลมีขั้ว ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้โมเลกุลใกล้เคียงมีขั้วชั่วคราว เรียก แรงเดอบาย (Debye force) หรือแรงเหนี่ยวนำ (induction force) ความแรงจะมีมากหรือน้อยขึ้นกับความสามารถในการเกิดขั้ว

ของโมเลกุลที่ถูกเหนี่ยวนำ โดยอิเล็กตรอนบางส่วนจะถูกดึงได้ง่าย ทำให้เกิดการกระจายของอิเล็กตรอนผิดจากเดิม บางส่วนเกิดกลุ่มอิเล็กตรอนหนาแน่น อีกส่วนมีกลุ่มอิเล็กตรอนบาง ทำให้เกิดขั้วบวกและลบขึ้น

- แรงระหว่างอะตอมที่เป็นกลางกับโมเลกุล (dispersion forces) เป็นแรงวันเดอร์วาลล์ของโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว เกิดจากการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนขณะหนึ่งไม่ได้กระจายสม่ำเสมอ ทำให้ด้านหนึ่งมีขั้วไฟฟ้าลบมากกว่าอีกด้าน กลายเป็นโมเลกุลมีขั้วชั่วคราว (induce dipole) และอาจเหนี่ยวนำให้โมเลกุลต่อไปมีขั้วชั่วคราวขึ้นมา โดยถ้าโมเลกุลบวกไปทางทิศใดทิศนั้นจะเกิดโมเลกุลลบขึ้น การเหนี่ยวนำนี้จะเกิดขึ้นต่อกันเรื่อยๆ จนเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล หรือเรียกว่าแรงแผ่กระจาย

แรงแผ่กระจายจะเพิ่มขึ้นตามมวลหรือขนาดของโมเลกุล เนื่องจากโมเลกุลขนาดใหญ่ย่อมมีจำนวนอิเล็กตรอนเพิ่มมากขึ้นด้วย แรงดึงดูดในการเหนี่ยวนำจึงแข็งแรงขึ้น นอกจากจำนวนอิเล็กตรอนแล้ว รูปร่างโมเลกุลยังมีส่วนทำให้การแผ่กระจายมีความแข็งแรงมากแค่ไหน เช่น ถ้าโมเลกุลมีโครงสร้างที่ซับซ้อนอาจทำให้เกิดการบดบังอิเล็กตรอนที่เหนี่ยวนำ ทำให้เกิดแรงดึงดูดน้อยตามด้วย

แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลจะอาศัยหลักที่ว่า ‘like dissolves like’ คือ โมเลกุลมีขั้วจะยึดเหนี่ยวกับโมเลกุลมีขั้ว ส่วนโมเลกุลไม่มีขั้วจะยึดเหนี่ยวกับโมเลกุลไม่มีขั้ว ในเทคนิคโครมาโทกราฟีเฟสอยู่กับที่จะมีด้วยกันสองแบบ คือ ชนิดมีขั้วและชนิดที่ไม่มีขั้ว

เฟสอยู่กับที่ชนิดไม่มีขั้ว แรงยึดเหนี่ยวระหว่างเฟสอยู่กับที่ชนิดไม่มีขั้วเป็นแรงแผ่กระจาย โมเลกุลสารที่ไม่มีขั้วจะยึดติดกับเฟสอยู่กับที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ช้ากับสารที่มีขั้ว

เฟสอยู่กับที่ชนิดมีขั้ว โมเลกุลสารมีขั้วจะเกิดแรงสัมพรรคภาพกับเฟสอยู่กับที่ เป็นแรงไดโพล-ไดโพล จึงทำให้โมเลกุลสารที่มีขั้วเคลื่อนที่ช้ากับสารที่ไม่มีขั้ว

ประเภทของเฟสอยู่กับที่ที่นำมาบรรจุในคอลัมน์มีด้วยกันสองชนิด

ก. ของแข็งที่ใช้เป็นตัวดูดซับ (absorbents) ของแข็งที่นำมาใช้ต้องไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ มีพื้นที่ผิวสูง ซึ่งการดูดซับจะเกิดขึ้นที่พื้นผิวของตัวดูดซับ ถ้าตัวดูดซับมีขั้ว สารตัวอย่างที่ไม่มีขั้วจะไม่ถูกดูดซับไว้ ขณะที่สารตัวอย่างที่มีขั้วจะถูกดูดซับไว้บนตัวดูดซับด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งแรงยึดเหนี่ยวจะมากน้อยขึ้นกับสภาพการมีขั้ว ถ้าตัวดูดซับไม่มีขั้วจะเกิดแรงยึดเหนี่ยวแผ่กระจายกับสารตัวอย่างไม่มีขั้ว ทำให้โมเลกุลสารมีขั้วชะออกจากคอลัมน์ก่อน

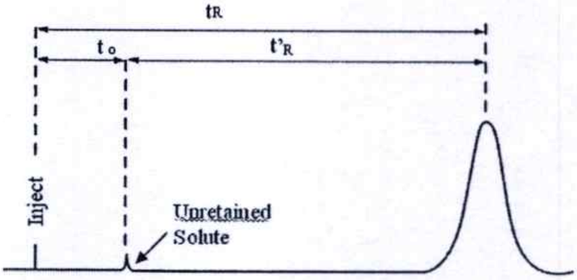
ข. ของเหลวที่เป็นเฟสอยู่กับที่เคลือบบนของแข็ง (solid support) โดยของเหลวที่นำมาเคลือบบนจะต้องไม่ละลายในเฟสอยู่กับที่

2 พารามิเตอร์พื้นฐาน

2.1 แฟคเตอร์ความจุ (capacity factor, k$'$) [34]

แฟคเตอร์ความจุ เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารสามารถหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด หาได้จากเวลาที่สารวิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ (t_R) ให้นิยามได้เป็นค่าเวลาการคงไว้ที่ถูกปรับ (adjust retention time,(t_R-t_0)) หารด้วยเวลาของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (t_0) ดังแสดงในรูปที่ ต.2

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad 2.1$$



รูปที่ ต.2 แสดงโครมาโทแกรมในการคำนวณหาค่าปัจจัยความจุ (capacity factor, k$'$) [34]

ปัจจัยที่ผลต่อค่า k$'$ ได้แก่ องค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่, เฟสอยู่กับที่และอุณหภูมิของการทดลอง โดยทั่วไปค่า k$'$ ควรอยู่ระหว่าง 1 – 10 เพราะเวลาที่ใช้และการแยกสมดุลดี ถ้าค่า k$'$ มากเกิน 10 – 15 แสดงว่าใช้เวลานานและพีกที่ได้กว้างและแยกได้ไม่ดี ตรวจวัดได้ยาก ดังนั้นค่า k$'$ จะบอกให้ทราบถึงเวลาที่สารวิเคราะห์ถูกชะแล้ว สามารบอกลักษณะของพีกกว้างหรือแคบ การตรวจวัดยากหรือง่าย ควรแรงของเฟสเคลื่อนที่

2.2 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity, α)

ค่าจำเพาะเจาะจงเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของเฟสอยู่กับที่ในการดูดซับหรือละลายตัวอย่าง 2 ชนิด ถูกดูดซับได้เท่ากัน ก็จะไม่มีความแตกต่างในการแยกเกิดขึ้น ดังนั้นค่าความจำเพาะเจาะจงจึงเป็นการบอกความแตกต่างของค่ารีเทนชันของพีค 2 พีค ซึ่งทำให้บอกได้ว่าระบบโครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพอย่างไรในการแยกตัวอย่างทั้งสองออกจากกันสมการที่ใช้แสดงค่าความจำเพาะเจาะจง คือ

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} = \frac{V_{R_2} - V_0}{V_{R_1} - V_0} = \frac{k_2'}{k_1'} \qquad 2.2$$

เมื่อ k_1' = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีคแรก

k_2' = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีคที่สอง

t_{R1}' = เวลาที่สารวิเคราะห์พีคแรกผ่านคอลัมน์

t_{R2}' = เวลาที่สารวิเคราะห์พีคที่สองผ่านคอลัมน์

ค่าจำเพาะเจาะจงจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่ พื้นที่ผิวของเฟสอยู่กับที่และอุณหภูมิ ในการแยกสาร ถ้าค่าจำเพาะเจาะจงมีมากกว่า 1 แสดงว่ามีการแยกเกิดขึ้น แต่ถ้ามีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่ามีการซ้อนทับกัน เนื่องจากมีเวลาการคงไว้ที่เท่ากัน ซึ่งค่าจำเพาะเจาะจงที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1.5 – 4.0

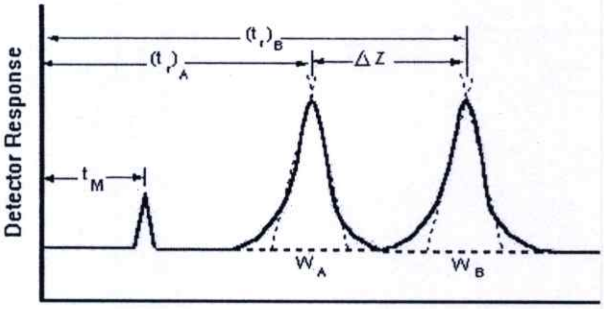
2.3 ความสามารถในการแยก (Resolution, R_S)

เป้าหมายหรือจุดประสงค์ของการแยกสาร โดยกระบวนการทางโครมาโทกราฟี คือสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ เพื่อที่จะหาปริมาณสารแต่ละชนิดและตรวจความบริสุทธิ์ของสาร สิ่งที่บอกให้ทราบว่าการแยกของสารผสมนั้นดีหรือไม่ คือ ค่าความสามารถในการแยก (Resolution; R_S) ซึ่งเป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีคของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาสารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีคทั้งสอง คำนวณได้จากระยะห่างกันระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุดของพีคทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีคทั้งสอง ดังสมการที่ 2.3 และโครมาโทรแกรมการแยกของสาร A และ B ดังแสดงในรูปที่ ต.3

$$R_S = \frac{2\Delta t_R}{W_A + W_B} \qquad 2.3$$

เมื่อ W_A = ความกว้างของพีคแรก

W_B = ความกว้างของพีคที่สอง



รูปที่ ต.3 แสดงโครมาโทแกรมของสาร A และ B [35]

ตามปกติค่าการแยก (R_S) มีค่าเท่ากับ 1.0 ก็เพียงพอสำหรับการแยกทั่วๆ ไป ถ้าสารตัวอย่างไม่เข้มข้นมากนัก แต่ถ้าสารตัวอย่างเข้มข้นมาก ค่า R_S ควรมีค่ามากกว่านี้จึงจะทำให้การวิเคราะห์ทางปริมาณได้ถูกต้อง ถ้าการแยกเท่ากับ 1.5 หมายความว่า พีคแยกออกจากกันได้เท่ากับ 99.7 โดยใช้วิธีแบ่งพื้นที่พีคจากจุดแยกแล้วลากเส้นตั้งฉากกับเส้นฐาน ถ้า R_s ที่มีค่าเท่ากับ 1.0 มีความหมายว่าพีคทั้งสองแยกออกจากกันได้ 98.0% ขณะที่อีก 2.0% คือพื้นที่ส่วนที่รวมกับอีกพีคหนึ่ง แต่สามารถนำไปใช้งานทางด้านวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ถ้าค่าการแยกมีสูงเกินไป แสดงว่าพีคทั้งสองห่างกันมาก ทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองตัวทำละลายโดยไม่จำเป็น ดังนั้นค่าการแยกควรปรับสภาวะให้ได้ค่าที่เหมาะสม

2.4 ประสิทธิภาพคอลัมน์ (column efficiency)

ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะพิจารณาได้จากพีคที่ถูกชะออกมาโดยค่าที่นำมาวัดถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์คือจำนวนเพลทที่อยู่ในคอลัมน์ เรียกว่า เพลททางทฤษฎี (number of theoretical plates, N) และความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ (Height equivalent to a theoretical plate, H หรือ HETP) ซึ่งจำนวนเพลทของคอลัมน์จะบอกถึงประสิทธิภาพคอลัมน์ว่ามีการบรรจุดีเพียงใด สามารถคำนวณได้จาก โครมาโทแกรม

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \qquad 2.4$$

เมื่อ N = จำนวนเพลท (number of theoretical plates)

t_R = เวลาการคงไว้ของสาร

W = ความกว้างของพีค

ในกรณีที่ความกว้างของฐานพีควัดได้ยาก สามารถวัดที่มีความสูงเป็นครึ่งหนึ่งความกว้างของพีค

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}}\right) \qquad 2.5$$

ซึ่งจำนวนเพลทตามทฤษฎีในคอลัมน์แปรผันโดยตรงกับความยาวคอลัมน์ (L) จะได้ความสูงของเพลทตามทฤษฎี (The height of theoretical plate, H) ดังนี้

$$H = \frac{L}{N} \qquad 2.6$$

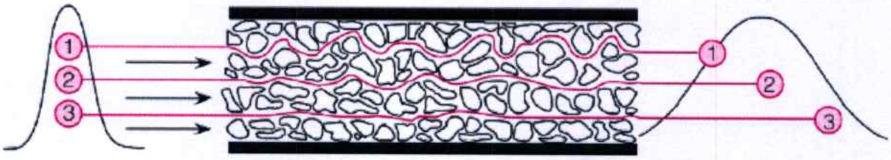
โดยทั่วไปแล้วจำนวนเพลทตามทฤษฎีในคอลัมน์โครมาโทรกราฟี เช่น ชนิดคอลัมน์โครมาโทกราฟของเหลวแบบสมรรถณะสูงจะมีจำนวนเพลทตามทฤษฎีประมาณ 10,000 เพลท แต่ในคอลัมน์ที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction) จะมีจำนวนเพลทตามทฤษฎีน้อยกว่า ปกติแล้วจะมีประมาณ 20 เพลท หรือน้อยกว่านี้ เนื่องจากมีคุณสมบัติการทำงานที่ต่างกัน โดยในคอลัมน์ที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็งจะไม่ได้ทำการแยกสารเพียงตัวเดียวขณะสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ แต่จะทำการดูดซับสารตัวอย่างไว้แล้วจึงแยกสารวิเคราะห์ออกมา

ตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อค่า H การเกิดความกว้างของพีคและเวลาการคงไว้ของสารมีด้วยกัน 3 ปัจจัย คือ

1) การแพร่วน (Eddy diffusion or Multiple path effect)
2) การแพร่ตามความยาวของคอลัมน์ (Longitudinal molecular diffusion)
3) การถ่ายโอนมวล (Mass transfer)

1) การแพร่วน (Eddy diffusion or Multiple path effect)

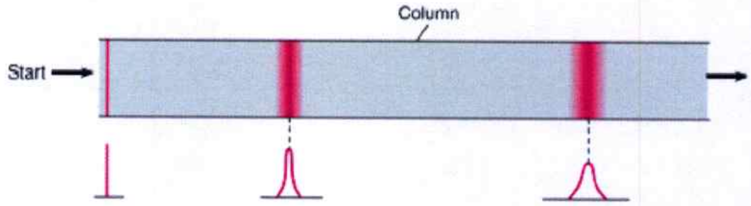
เป็นการเคลื่อนที่ของโมเลกุลไปตามความยาวคอลัมน์ผ่านอนุภาคของเฟสอยู่กับที่จากปลายด้านเข้าถึงปลายด้านออกจากคอลัมน์ได้ระยะทางที่แตกต่างกัน เนื่องจากเคลื่อนที่เข้าไปในบริเวณช่องว่างปริฏมิหรือขนาดและรูปร่างของอนุภาคต่างกัน ทำให้ใช้เวลาในการเคลื่อนที่ออกต่างกันดังแสดงในรูปที่ ฌ.4 จึงมีผลทำให้พีคของโครมาโทแกรมเกิดเป็นแบนกว้าง



รูปที่ ต.4 แสดงการแพร่วนทำให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ในเวลาคงไว้ต่างกัน [37]

2) การแพร่ตามความยาวของคอลัมน์ (Longitudinal molecular diffusion)

เป็นการกระจายของโมเลกุลสารในเฟสเคลื่อนที่จากความเข้มข้นสูงสู่ความเข้มข้นต่ำ ขณะที่โมเลกุลเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์จะเกิดการแพร่มากขึ้น เวลาที่ใช้ชะจะนาน จึงทำให้เกิดการกระจายแบนด์กว้าง (band broadening) ดังแสดงในรูปที่ ต.5



รูปที่ ต.5 การแพร่ตามความยาวของคอลัมน์ [36]

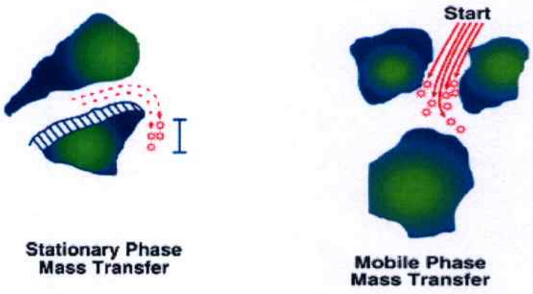
3) การถ่ายโอนมวล (Mass transfer)

การถ่ายโอนมวลจะสัมพันธ์ถึงอัตราการถูกยึดติด (sorption) หรือถูกปล่อยออก (desorption) ของโมเลกุลสารที่อยู่ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่ ทำให้เกิดอัตราการเคลื่อนที่ในเฟสเคลื่อนที่ต่างกัน ซึ่งทำให้โมเลกุลสารที่ต้องการแยกไม่สามารถเกิดภาวะสมดุลการระหว่างสองเฟสได้

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนมวลสามารถแบ่งเป็นการถ่ายโอนมวลที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ (C_s) และเฟสเคลื่อนที่ (C_m)

- พจน์ C_s (C_s term : Stationary phase mass transfer) การเกิดสมดุลของโมเลกุลสารที่แยกระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ เกิดองศาของการไม่สมดุล เมื่อเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงทำให้โมเลกุลสารที่อยู่ในภาวะสมดุลเคลื่อนที่ผ่านออกจากคอลัมน์ได้น้อย และถ้าอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์มีความแน่นมาก โมเลกุลสารจะถูกยึดจับนานเกินไป ทำให้โมเลกุลสารบางส่วนหลุดออกมาเท่านั้น

- พจน์ C_m (C_m term :Mobile phase mass transfer) เกิดเนื่องจากการไหลเฟสเคลื่อนที่ผ่านรอบๆ อนุภาคแตกต่างกัน โดยของเหลวที่อยู่ใกล้อนุภาคของเฟสอยู่กับที่จะไหลได้ช้ากว่าที่อยู่ไกลกว่า หรือเฟสอยู่กับที่เป็นอนุภาคที่มีรูพรุนเฟสเคลื่อนที่เมื่อเข้าไปอยู่ในรูพรุน ถ้าโมเลกุลที่แพร่เข้าไปในรูพรุนได้ลึกก็จะออกจากคอลัมน์ได้ช้า ทำให้โมเลกุลของตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ได้ไม่พร้อมกัน ดังนั้นการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายจึงต่างกัน



รูปที่ ต.6 การถ่ายโอนมวล [34]

2.5 สัมประสิทธิการแจกแจง (distribution coefficient, K_d)

ค่าสัมประสิทธิการแจกแจงเป็นค่าคงที่ แสดงถึงสมดุลการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างเฟสสองเฟส คือ เฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ โดยค่าสัมประสิทธิการแจกแจงจะเป็นอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่ต่อความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ เรียกว่า อัตราส่วนของการกระจาย (distribution ratio, K)

$$K = \frac{[X_{absorbent}]}{[X_{solution}]} \qquad 2.7$$

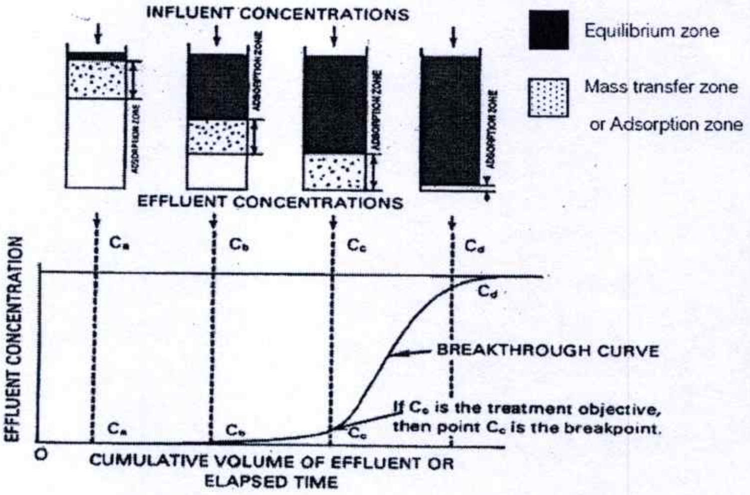
เมื่อ	$X_{absorbent}$	=	ความเข้มข้นของสารที่อยู่ในเฟสที่อยู่กับที่
	$X_{Solution}$	=	ความเข้มข้นของสารที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่
	K	=	ค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution coefficient)

ถ้าตัวถูกละลายมีหลายชนิดจะได้ค่า K ต่างกัน ทำให้เกิดการแยกขึ้น ตัวถูกละลายที่มีค่า K มาก หมายถึง มีความเข้มข้นในเฟสอยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ จะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าตัวถูกละลายที่มีค่า K น้อยกว่า ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจงจะเป็นฟังก์ชันกับแฟกเตอร์ความจุมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัม

2.6 ปริมาตร Breakthrough

ค่า Breakthrough เป็นค่าที่ทำให้ทราบถึงจุดที่ตัวดูดซับไม่สามารถทำการดูดซับสารตัวอย่างหรือเกิดการอิ่มตัว โดยผ่านตัวอย่างสารที่มีความเข้มข้นสม่ำเสมอผ่านคอลัมน์ สารที่จะถูกดูดซับและยึดติดกับตัวดูดซับจนถึงระยะเวลาหนึ่ง ตัวดูดซับจะเกิดการอิ่มตัวจนทำให้เกิดบริเวณที่มีการอิ่มตัวในการดูดซับ เรียกว่า เขตสมดุล (Equilibrium zone) ซึ่งจะเป็นส่วนที่ไม่มีการดูดซับอีกแล้ว ในขณะที่เขตที่ต่อจากเขตที่มีการอิ่มตัวจะยังเกิดการดูดซับอยู่ได้อย่างต่อเนื่อง เขตของการดูดซับนี้เรียกว่า เขตการถ่ายเทมวล (Mass transfer zone , MTZ) ทำให้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในสารละลายลดลง ในขณะที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สารดูดซับจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง บริเวณที่เกิดการดูดซับความเข้มข้นของสารตัวอย่างในสารละลายจะค่อยๆ ลดลง โดยทั่วไปกราฟที่ได้จะมีลักษณะคล้ายตัวเอส (S-Shape) เรียกว่า Breakthrough Curve ดังแสดงในรูปที่ ต.7 [47]

โดยทั่วไปจุดเบรคทรูจะเกิดที่ความเข้มข้นเท่า 0.05 C_o และจุดที่ตัวดูดซับหมดสภาพในการดูดซับ (Exhaustion) คือจุดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.95 C_o



รูปที่ ต.7 Mass transfer zone (MTZ) และ Breakthrough Curve [37]

ประวัติผู้เขียน

นางสาวภัทรวดี จัตตานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 9 มกราคม พ.ศ.2522 ที่จังหวัดสมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีการเกษตร ภาควิชาปฐพี คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2543 และในปีการศึกษา 2546 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี (เคมีวิเคราะห์) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง