

การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรควบคู่กับการใช้วัสดุสังเคราะห์โมโนลิธสำหรับ
การวิเคราะห์สารตัวอย่างอินทรีย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ธันวาคม 2558

การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรควบคู่กับการใช้วัสดุสังเคราะห์โมโนลิธสำหรับ
การวิเคราะห์สารตัวอย่างอินทรีย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ธันวาคม 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรควบคู่กับการใช้วัสดุสังเคราะห์โมโนลิธสำหรับ
การวิเคราะห์สารตัวอย่างอินทรีย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ธันวาคม 2558

ทศพร เฉลิมสุขวิวัฒนาการ. (2558). การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรควบคู่กับ การใช้วัสดุสังเคราะห์โมโนลิธสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างอินทรีย์. ปริญญาโท วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท: รศ.ดร.วิณา เสียงเพราะ, ดร.พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ

งานวิจัยนี้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร ร่วมกับโมโนลิธแคปิลารีคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเสริมของ มนุษย์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการติดตามการตรวจวัดอัตราการกรองของไต (GFR) เพื่อประเมินการทำงานของไต จากการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อตกตะกอนโปรตีน 4 วิธี ได้แก่ การตกตะกอนด้วย สารละลายกรดเปอร์คลอริก การตกตะกอนด้วยสารละลายอะซีโตนไนไตรล์ การตกตะกอนด้วย สารละลายซิงค์ซัลเฟต และการแยกโปรตีนด้วยเมมเบรน พบว่าการตกตะกอนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตเป็นวิธีที่กำจัดโปรตีนออกจากตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกและประหยัด ตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดโปรตีนแล้วสามารถวิเคราะห์โดยการแยกบนคอลัมน์สังเคราะห์โมโนลิธ (methacrylic acid – ethylene dimethacrylate) และเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์อะซีเตทเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5 และเมทานอล ในอัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 4 นาที ผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเสริม 3 ตัวอย่างมีค่าร้อยละการคืนกลับของไอโอเฮกซอลในช่วง 102 ถึง 104 เปอร์เซ็นต์ กราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.9997 ในการตรวจสอบความเที่ยงในวันเดียวกันและระหว่างวันมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 3.0 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีขั้นตอนที่ง่าย รวดเร็วมีความเที่ยงและความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง และใช้สารตัวอย่างและตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย

DEVELOPMENT OF MICRO-LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD USING SYNTHETIC
MONOLITHIC MATERIAL FOR ANALYSIS OF ORGANIC COMPOUNDS



Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

December 2015

Thotsaphorn Chaloeusuwiwattanakan. (2015). *development of micro-liquid chromatographic method using synthetic monolithic material for analysis of organic compounds*. Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee. Assoc. Prof. Dr. Weena Siangproh, Dr. Patcharin Chaisuwan.

This work developed a micro-liquid chromatographic method with monolithic capillary column for determination of iohexol in human serum, a marker for evaluation of glomerular filtration rate. Four protein removal methods using perchloric acid, acetonitrile, zinc sulfate and centrifuge membrane filter, have been investigated for analysis of serum samples. Zinc sulfate was chosen as a reagent for sample pretreatment due to the complete protein precipitation, simple procedure and low cost. The pretreated sample was analyzed by injecting into a synthetic monolithic column polymerized from methacrylic acid and ethylene dimethacrylate. The mobile phase of 40:60 (v/v) 50 mM acetate buffer pH 5 : methanol was selected as optimized and UV detection at the wavelength of 254 nanometer. Separation time of 4 min was achieved. Calibration curve for iohexol was constructed in concentrations range of 2 to 250 µg/ml (n=3). Good linearity with R^2 of 0.9997 was observed. Intra- and inter-day precisions (%RSD) for peak area and retention time were less than 3%. The method was successfully applied to serum samples (n=3) with percent recoveries from 102 to 104%. The developed method is simple, rapid, precise and accurate with low sample and solvent consumption.

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรควบคู่กับการใช้วัสดุสังเคราะห์โมโนลิธสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างอินทรีย์

ของ

ทศพร เณิมสุวิวัฒนาการ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี โยเหลา)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ที่ปรึกษาหลัก

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีณา เสียงเพระะ)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา เพชรกระจ่าง)

.....ที่ปรึกษาร่วม

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ)

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีณา เสียงเพระะ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วิณา เสียงเพราะ และ ดร.พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ช่วยแก้ไขปัญหาในการทำงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยและการเขียนปริญญาานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัย ได้รับประสบการณ์ ได้เรียนรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอกราบขอบพระคุณ เป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา เพชรกระจ่าง ประธานกรรมการในการสอบ ปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ กรรมการควบคุมการสอบปาก เปล่าปริญญาานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อให้ปริญญาานิพนธ์นี้มีความ สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ให้ความ เมตตา เอาใจใส่และให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และภาควิชา เคมี สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่คอยให้การสนับสนุนทางด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้แนะนำ และ อำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและการทำวิจัย ขอขอบพระคุณโรงพยาบาลรามาริบัติ สำหรับตัวอย่างเซลล์ของมนุษย์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

คุณค่าของปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อครอบครัวของผู้วิจัย ที่ มอบความรัก ความเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุกๆด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในครั้งนี้

ทศพร เฉลิมสุขวิวัฒนาการ

สารบัญ

| บทที่ | | หน้า |
|-------|--|------|
| 1 | บทนำ..... | 1 |
| | ภูมิหลัง..... | 1 |
| | ความมุ่งหมายของการวิจัย..... | 4 |
| | ขอบเขตของโครงการวิจัย..... | 4 |
| | ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 5 |
| 2 | เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 6 |
| | ไอโอเฮกซอล..... | 6 |
| | เทคนิคการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล..... | 7 |
| | เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร..... | 10 |
| | โมนอลิธิคคอลลัมน์..... | 15 |
| | โครงสร้างและคุณสมบัติของวัสดุโมนอลิธิค..... | 15 |
| | ประเภทของโมนอลิธิคคอลลัมน์..... | 16 |
| 3 | วิธีดำเนินการวิจัย..... | 19 |
| | อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... | 19 |
| | การเตรียมสารเคมี..... | |
| | สารผสมสำหรับการเตรียมโมนอลิธิคคอลลัมน์..... | 21 |
| | สารละลายสำหรับการเตรียมเฟสเคลื่อนที่..... | 22 |
| | สารละลายสำหรับการเตรียมตัวอย่างเซรัม..... | 22 |
| | สารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอล..... | 23 |
| | การสร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร..... | 23 |
| | การเตรียมโมนอลิธิคแคปิลารีคอลลัมน์..... | |
| | การปรับสภาพพื้นผิวของแคปิลารีคอลลัมน์..... | 25 |
| | การเตรียมโมนอลิธิคแคปิลารีคอลลัมน์..... | 25 |

สารบัญ (ต่อ)

| บทที่ | | หน้า |
|-------|---|------|
| 3 | (ต่อ) | |
| | การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล | |
| | ชนิดคอลัมน์ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์..... | 26 |
| | ผลของค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่..... | 26 |
| | ชนิด และอัตราส่วนของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่..... | 26 |
| | การเตรียมตัวอย่างเซรัมของมนุษย์..... | 26 |
| | การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์..... | 27 |
| | การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัม..... | 28 |
| | การประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่ม..... | 28 |
| 4 | ผลการทดลอง | |
| | ตอนที่ 1 สร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรและสังเคราะห์โมโนลิธิกแคปิลารีคอลัมน์ | |
| | การสร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร..... | 30 |
| | สังเคราะห์โมโนลิธิกแคปิลารีคอลัมน์..... | 30 |
| | ตอนที่ 2 การศึกษาการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลด้วยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ | |
| | การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล..... | 32 |
| | การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์..... | 41 |
| | ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมและการประยุกต์เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม | |
| | การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมของมนุษย์..... | 46 |
| | เปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างกับวิธี HPLC..... | 47 |
| | วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม..... | 48 |

สารบัญ (ต่อ)

| บทที่ | หน้า |
|----------------------------|------|
| 5 สรุปลงและข้อเสนอแนะ..... | 51 |
| บรรณานุกรม..... | 53 |
| ประวัติย่อผู้วิจัย..... | 59 |



บัญชีตาราง

| ตาราง | หน้า |
|---|------|
| 1 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลโดยใช้เทคนิค HPLC-UV..... | 8 |
| 2 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลโดยใช้เทคนิค HPLC-MS..... | 9 |
| 3 ตัวอย่างงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้เทคนิค μ -LC | 12 |
| 4 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย | 19 |
| 5 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... | 20 |
| 6 เครื่องมือสำหรับการสร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร..... | 24 |
| 7 ความเที่ยงของค่าเวลาคงตัวของกาวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลด้วยวิธีสกัดต่างๆ..... | 40 |
| 8 ความเที่ยงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไอโอเฮกซอลในวันเดียวกัน..... | 43 |
| 9 ความเที่ยงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไอโอเฮกซอลในระหว่างวัน..... | 43 |
| 10 ค่าร้อยละการคืนกลับของไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมมนุษย์..... | 44 |
| 11 ผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมของมนุษย์..... | 46 |
| 12 การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่ม..... | 49 |

บัญชีภาพประกอบ

| ภาพประกอบ | หน้า |
|---|------|
| 1 โครงสร้างของไอโอเฮกซอล..... | 3 |
| 2 ภาพการเปรียบเทียบขนาดของคอลัมน์ในระบบ μ -LC และ HPLC..... | 11 |
| 3 ไดอะแกรมของระบบ μ -LC | 13 |
| 4 ระบบการทำงานของวาล์วแบบ 6-port | 13 |
| 5 คอลัมน์แบบ packed และแบบ open tubular..... | 15 |
| 6 โครงสร้างและรูพรุนของวัสดุโมโนลิธ..... | 16 |
| 7 ปฏิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิริยาการควบแน่นในกระบวนการโซลเจลของ n-alkyltrialkoxysilanes..... | 18 |
| 8 ไตรแกรมของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร..... | 24 |
| 9 ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรที่สร้างขึ้น..... | 30 |
| 10 ภาพตัดขวางของโมโนลิธแคปิลารีคอลัมน์ถ่ายด้วยเทคนิค SEM | 31 |
| 11 โครมาโทแกรมของคอลัมน์ SMA-EDMA, PEDAS-EDMA และ MAA-EDMA | 32 |
| 12 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลด้วยคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด..... | 33 |
| 13 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไอโอเฮกซอลที่ pH 3 ถึง 8 | 34 |
| 14 โครมาโทแกรมเปรียบเทียบชนิด และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ | 35 |
| 15 โครมาโทแกรมเปรียบเทียบชนิดตัวทำละลายสารมาตรฐานไอโอเฮกซอล..... | 36 |
| 16 ภาพโปรตีนที่ตกตะกอนจากการสกัด..... | 37 |
| 17 โครมาโทแกรมของการสกัดตัวอย่างเซรั่ม..... | 38 |
| 18 กราฟมาตรฐานของไอโอเฮกซอลความเข้มข้น 2-250 ppm ทั้ง 3 วัน..... | 41 |
| 19 กราฟระหว่างความเข้มข้นของไอโอเฮกซอลในเซรั่มกับเวลาเพื่อศึกษาอัตราการขับ ออกของไอโอเฮกซอลโดยการทำงานของไต..... | 47 |
| 20 โครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างวิธีที่พัฒนาและวิธี HPLC..... | 48 |
| 21 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานคาเฟอีนและตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ..... | 50 |

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

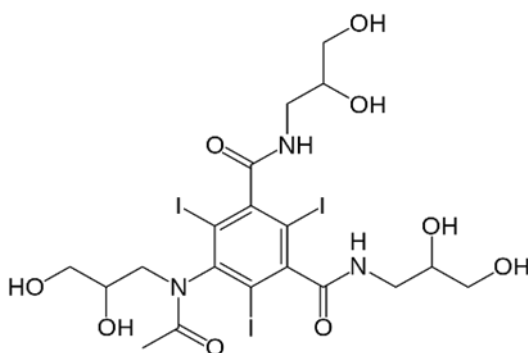
ปัจจุบันปัญหาการเกิดโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย (end-stage kidney disease, ESRD) มีอัตราสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก จำเป็นต้องมีการตรวจคัดกรองผู้ป่วยที่มีภาวะการทำงานของไตลดลง ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นเพื่อชะลอการเกิด ESRD และการเสียชีวิตเนื่องจากโรคหลอดเลือดและหัวใจที่เป็นโรคแทรกซ้อน องค์การ National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) ได้ให้นิยามคำจำกัดความตลอดจนการแบ่งระยะการดำเนินของโรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease, CKD) (Levey AS. 2005: 2089-2100) และได้กำหนดให้ใช้ระดับอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate, GFR) เป็นดัชนีชี้วัดการทำงานของไต ซึ่ง GFR นี้ จัดเป็นดัชนีบ่งชี้การทำงานของไตที่ดีที่สุดและสัมพันธ์กับปริมาณของเนื้อไต และทำให้แพทย์สามารถประเมินระยะการดำเนินของโรค ทำนายแนวโน้มการดำเนินโรคเข้าสู่ภาวะ ESRD และระดับยาที่เหมาะสมแก่การขับออกทางไตได้อย่างถูกต้อง

GFR เป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงปริมาตรของพลาสมาที่ถูกกรองที่โกลเมอรูลัสของหน่วยไต 1 อัน ต่อหน่วยเวลาในกระบวนการสร้างปัสสาวะ (Schwartz GJ. 2007) ซึ่งสามารถวัดค่า GFR ได้ในทางอ้อมโดยวัดการขับสารเคมีไตที่ถูกกรองผ่านโกลเมอรูลัสออกมา โดยไม่มีการดูดกลับ ขับหรือเกิดการสันดาปที่หลอดฝอยไตเลย ปริมาณการขับของสารนั้นจึงเทียบเท่ากับ GFR ได้

GFR ที่ผ่านมามีรายงานจากระดับของเสียที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย เช่น serum creatinine (sCr) แต่พบว่ามีค่าความถูกต้องต่ำ เนื่องจากค่า sCr มีความสัมพันธ์กับมวลกล้ามเนื้อของร่างกาย ซึ่งมีผลกระทบมาจากปัจจัยต่างๆ คือ อายุ น้ำหนัก เพศ หรือเชื้อชาติ ต่อมาได้มีการนำ serum cystatin C (sCysC) มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวัด GFR ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ sCr แล้วพบว่า sCysC เป็นตัวบ่งชี้ที่มีความถูกต้องและมีความไวสูงกว่า sCr (Madero Magdalena. 2006: 610-616) อย่างไรก็ตามมีการวิจัยพบว่า มีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อระดับของ sCysC นอกเหนือจากการทำงานของไต คือ C-reactive protein (CRP) และการสูบบุหรี่ จึงทำให้มีข้อจำกัดในการแปลผลระดับ sCysC เพื่อประเมินการ

ทำงานของไตในบุคคลที่มีภาวะดังกล่าว (Knight EL. 2004: 1416-1421) ในปัจจุบันนี้ยังไม่มี การศึกษาเกี่ยวกับการประเมินความถูกต้องของ sCysC ในกลุ่มคนไทย

การคำนวณหาค่า GFR ยังสามารถทำได้โดยการติดตามอัตราการกำจัดสารใด ๆ ออกจาก พลาสมาภายหลังการฉีดสารนั้นเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งในปัจจุบันการตรวจติดตามอัตราการกำจัดไอ โฮเฮกซอล (iohexol) ออกจากพลาสมา (Schwartz GJ. 2007) เป็นวิธีการหนึ่งที่มีความน่าเชื่อถือใน การนำมาใช้ประเมิน GFR เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสีหรือตัวตรวจติดตามชนิดอื่น ๆ เช่น Ethylene diamine tetra-acetic acid (51Cr-EDTA) และหลีกเลี่ยงปัญหาในเรื่องของเวลาในการขับ ปัสสาวะและการฉีดอินูลิน (inulin) อย่างต่อเนื่อง ซึ่งไอโอเฮกซอลมีชื่อทางการค้าว่า omnipaque เป็น สารที่มีจำหน่ายอยู่ทั่วไป เป็นสารที่ไม่มีประจุ ดูดซึมต่ำและเป็นสารตัวกลางรังสี ซึ่งมีความปลอดภัย ต่อมนุษย์ ไอโอเฮกซอลมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 821.14 และมีครึ่งชีวิตในพลาสมาประมาณ 90 นาที มี การกระจายอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ และจับอยู่กับโปรตีนในพลาสมาต่ำกว่า 2% ไอโอเฮกซอลถูก กำจัดออกจากพลาสมาโดยการกรองผ่านที่โกลเมอรูลัสของไตโดยส่วนใหญ่ และถูกกำจัดออก ภายนอกไตในปริมาณที่น้อยมาก โดยในการประเมินแต่ละครั้งแพทย์จะฉีดไอโอเฮกซอลให้แก่ผู้ป่วย เพียง 10 มิลลิลิตร ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อผู้ป่วยโรคไตที่มีระดับ GFR ต่ำ งานวิจัยส่วนใหญ่ชี้ให้เห็นว่า GFR ที่ได้จากการทำการขับอินูลินและที่ได้จากการทำการขับไอโอเฮกซอลมีความสอดคล้องและ ใกล้เคียงกันมาก (Gaspari F. 1995: 257-263) นอกจากนี้ไอโอเฮกซอลยังมีประสิทธิภาพมากกว่าสาร ตัวกลางรังสีชนิดอื่น ๆ เช่น ไอโอธาลาเมท (iothalamate) ซึ่งเคยถูกศึกษาในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง (Andrew S Levey. 1999: 461-470) จากงานวิจัยพบว่าไอโอธาลาเมทถูกขับออกโดย renal proximal tubular cells เพียงเล็กน้อยและอาจถูกดูดกลับบางส่วน (Bo Odland. 1985: 9-16) ดังนั้นอัตราการ กำจัดไอโอธาลาเมทออกทางไตมีค่าสูงกว่าไอโอเฮกซอลประมาณ 19% (Back SE. 1988: 247-253) ดังนั้น ไอโอเฮกซอลจึงเป็นตัวบ่งชี้ของ GFR ที่ดีกว่าไอโอธาลาเมท



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของไอโอเฮกซอล

โดยทั่วไปสามารถตรวจวัดไอโอเฮกซอลได้ทั้งในพลาสมาหรือเซรัม โดยทำการเจาะเลือดผู้ป่วย 3 ถึง 4 ครั้ง ในช่วงเวลาระหว่าง 2 และ 4 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ แต่วิธีการดังกล่าวพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และใช้ปริมาณตัวอย่าง และสารเคมีมาก ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง จากสาเหตุที่กล่าวมาในเบื้องต้นจึงนำไปสู่การศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมด้วยวิธีที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ใช้ตัวอย่างและสารเคมีน้อย โดยสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องน่าเชื่อถือ

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร (micro-liquid chromatography, μ -LC) เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมและถูกพัฒนามาจากเทคนิค HPLC โดยดัดแปลงเครื่องมือจากระบบ HPLC พื้นฐานให้สามารถรองรับกับคอลัมน์ขนาดเล็กที่เรียกว่าไมโครคอลัมน์ คุณสมบัติเด่นของเทคนิค μ -LC เมื่อเปรียบเทียบกับ HPLC แบบดั้งเดิม คือ ด้วยขนาดคอลัมน์ที่เล็กทำให้ลดการเกิดการขยายของท่อนโชน (band-broadening) และใช้ปริมาณของสารตัวอย่างและสารเคมีน้อยซึ่งประหยัดค่าใช้จ่าย ซึ่งโมโนลิธิคแคปิลารีคอลัมน์ (monolithic capillary column) เป็นคอลัมน์ที่กำลังเป็นที่นิยมนำมาใช้กับเทคนิค μ -LC เนื่องจากมีการต้านทานการไหลต่ำ ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายด้วยต้นทุนต่ำ ปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและคุณสมบัติของพื้นผิวคอลัมน์ได้หลากหลายช่วยให้สามารถครอบคลุมการวิเคราะห์ตัวอย่างที่หลากหลาย (Danilo Corradini, 2011)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรั่ม โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร (μ -LC) โดยสังเคราะห์โมโนลิธิคแคปิลารีคอลัมน์และหาสภาวะที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือ ประหยัด สะดวก และรวดเร็ว

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. สร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรและสังเคราะห์โมโนลิธิคแคปิลารีคอลัมน์
2. พัฒนารูปแบบที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดปริมาณสารประกอบอินทรีย์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร
3. นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ในการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรั่มและคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร ได้แก่
 - ชนิด และองค์ประกอบในการเตรียมโมโนลิธิคแคปิลารีคอลัมน์
 - ชนิด อัตราส่วน และความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)
2. นำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)
3. ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม และวิเคราะห์หาปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างจริงเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน
4. ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์ทางเลือกใหม่ในการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเข้มข้นและการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มโดยเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูง ถูกต้อง แม่นยำ สะดวก ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้น ใช้สารเคมีปริมาณน้อย และมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ

2. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคไตได้อย่างถูกต้อง

3. สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาต่อยอดในการวิเคราะห์สารประเภทอื่นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร ซึ่งจะเป็นโอกาสให้เกิดการพัฒนางานด้านการวิเคราะห์ และเป็นโอกาสให้ผู้สนใจได้นำเทคโนโลยีของตนเองไปใช้จริง



บทที่ 2

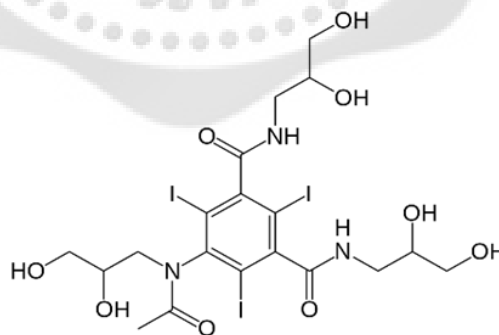
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณไอโอสเกกซอลในตัวอย่างเสริม ด้วยโมโนลิธิคแคปปีลารีคอลลัมน์ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งผู้วิจัยได้ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

1. ไอโอสเกกซอล
2. เทคนิคการวิเคราะห์ไอโอสเกกซอล
3. เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร
4. โมโนลิธิคคอลลัมน์

1. ไอโอสเกกซอล (iohexol)

ไอโอสเกกซอลมีชื่อทางการค้าคือ omnipaque และมีชื่อทางเคมีคือ 1-*N*,3-*N*-bis(2,3-dihydroxypropyl) -5-[*N*-(2 ,3 -dihydroxypropyl) acetamido] -2 ,4 ,6 -triiodobenzene-1 ,3 -dicarboxamide มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบที่ 1 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 821.14 เป็นตัวบ่งชี้ที่นิยมนำมาใช้ในการวัด GFR ในการตรวจคัดกรองโรคไต มีความเป็นพิษต่อร่างกายต่ำ



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของไอโอสเกกซอล

1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

ไอโอเฮกซอลมีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลว 174-180 °C มีจุดเดือด 892 °C สามารถละลายได้ดีในน้ำ มีค่า pKa เท่ากับ 11.35 ดูดกลืนแสงได้ดีที่ 254 นาโนเมตร

1.2 เกสซ์ซจลนศาสตร์

หลังจากการฉีดไอโอเฮกซอลเข้าไปในหลอดเลือด ไอโอเฮกซอลจะมีการกระจายตัวอย่างรวดเร็วไปทั่วช่องว่างระหว่างเซลล์ ไอโอเฮกซอลจะจับอยู่กับโปรตีนในพลาสมา (น้อยกว่า 2%) จากนั้นไอโอเฮกซอลจะถูกกำจัดออกจากพลาสมาโดยการกรองผ่านที่โกลโมลูลัสโดยส่วนใหญ่ มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ถูกกำจัดออกภายนอกไต ซึ่งประมาณ 80-90% ของปริมาณไอโอเฮกซอลที่ฉีดจะถูกขับออกมาภายใน 24 ชั่วโมง และมีความเข้มข้นสูงสุดในปัสสาวะในช่วงแรก

ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของไอโอเฮกซอล จะทำการฉีดไอโอเฮกซอลให้กับอาสาสมัครเพศชายที่มีสุขภาพดีพบว่าครึ่งชีวิตของการกระจายคือ 22 นาที ครึ่งชีวิตของการขับถ่ายคือ 2.1 ชั่วโมง และการสลายตัวมีครึ่งชีวิต 12.6 ชั่วโมง ปริมาณของการกระจายตัวของช่องกลางเป็น 165-270 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยการขับออกจากไต 120 มิลลิลิตรต่อนาที และการขับออกจากร่างกายรวมเฉลี่ย 131 มิลลิลิตรต่อนาที

2. เทคนิคการวิเคราะห์

2.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณของไอโอเฮกซอล

มีการพัฒนาใช้เทคนิคการวิเคราะห์หลายเทคนิคในการวิเคราะห์ปริมาณของไอโอเฮกซอล ได้แก่ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC), colorimetric method (Back SE. 1988: 825-829) , X-ray fluorescent spectrophotometry (Xin G. 2000: 131-133) , capillary electrophoresis (Michael VR. 1996: 173-177) และ inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Braselton WE. 1997: 1429-1435)

2.1.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (HPLC-UV)

วิธี HPLC-UV เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของ ไอโอเฮกซอล เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพการแยกสูง เหมาะกับการวิเคราะห์สารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน เช่น พลาสมาและเซรัม ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ในเซรัมหรือปัสสาวะโดยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะที่

เหมาะสมจะปรากฏพีคของทั้งสองไอโซเมอร์ของไอโอเฮกซอลในเวลาที่แตกต่างกัน การคำนวณการขับออกของไอโอเฮกซอลสามารถเลือกวัดระดับไอโอเฮกซอลในพลาสมาจากไอโซเมอร์เดียวเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณการขับออก ปริมาณของการกระจาย และครึ่งชีวิตการสลายตัวได้

การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลด้วยเทคนิค HPLC มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และใช้คอลัมน์กับเฟสเคลื่อนที่ที่หลากหลาย ซึ่งทำให้มีความแตกต่างกันในเรื่องประสิทธิภาพการวิเคราะห์ ในด้านต่างๆดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลโดยใช้เทคนิค HPLC-UV

| คอลัมน์ | เฟสเคลื่อนที่ | LOD ($\mu\text{g/ml}$) | ช่วงความเข้มข้น ที่วิเคราะห์ ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าเวลา คงตัว (นาที) | อ้างอิง |
|-------------------------|---|-----------------------------|---|----------------------------|-----------------------------------|
| ODS2 Luna column C18 | H ₂ O : MeOH | 2 | 2-100 | 6, 7 | V. Meucci et al. (2004). |
| μ Bondapak C18 | H ₂ O:ACN | 6 | 10-750 | 5, 6 | Rohit S. Soman; et al. (2005). |
| Supelco dicoveryc18 | 0.1%Trifluoroacetic acid H ₂ O:MeOH | 1 | 5-40 | 12.2,12. 5 | Don Farthing; et al. (2005). |
| polymeric PLRP-S C18 | H ₂ O : MeOH | 0.44 | 0.44-657 | | M S. De Baere; et al. (2012). |
| dicoveryc18 | 95% MeOH/5% H ₂ O/0.1%TFA pH 2.2 | 12($\mu\text{g/L}$) | 23.6-755 ($\mu\text{g/L}$) | | Andrew Slack; et al. (2014). |

2. 1. 2 High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) ถูกใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเอกซอล ซึ่งวิธีการนี้มีข้อดีดีกว่าวิธีอื่น ๆ คือ ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ และมีความถูกต้องสูง เนื่องจาก mass spectrometry เป็นเทคนิคการตรวจวัดที่จำเพาะเจาะจงต่อขนาดโมเลกุล และการรบกวนที่อาจเกิดจากสิ่งเจือปนในตัวอย่างที่ จึงให้สัญญาณที่มีความจำเพาะกว่าตัวตรวจวัดอื่น แต่มีค่าใช้จ่ายสูง และต้องการผู้มีความชำนาญสูง

ตาราง 2 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเอกซอลโดยใช้เทคนิค HPLC-MS

| คอลัมน์ | เฟสเคลื่อนที่ | LOD ($\mu\text{g/ml}$) | ช่วงความเข้มข้นที่ วิเคราะห์ ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าเวลาคง ตัว (นาที) | อ้างอิง |
|-------------------------------|--|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------------|
| Zorbax Eclipse XDB-C8 | H ₂ O:MeOH/2mM ammonium acetate | 0.5 | 0.5-1500 | - | Soo-Youn Lee; et al. (2006). |
| Zorbax Eclipse XDB-C18 | 0.1% formic acid in H ₂ O : ACN | 0.02 | 0.02-9.7 | 10.2 | M.C. Denis; et al. (2008). |
| Phenomenex Gemini C18 | 50mM Formate buffer in H ₂ O/CAN | 0.27 ($\mu\text{g/L}$) | 0.27-0.59($\mu\text{g/L}$) | 13 | Francesco B.; et al. (2008). |
| Oasis HLB 5- μm | 0.1% formic acid in H ₂ O/ACN | 2.5 | 2.5-1000 | - | Thomas M; et al. (2009). |

2.1.3 Capillary electrophoresis (CE)

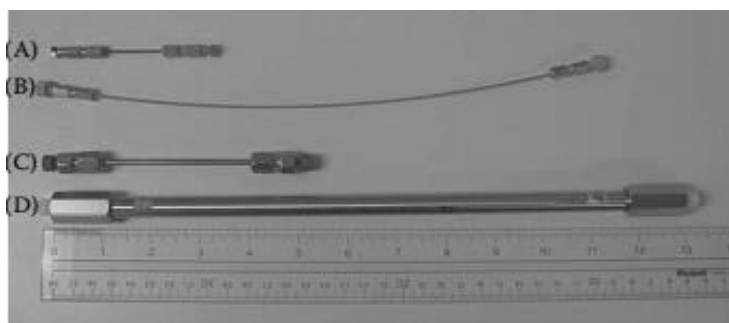
Capillary electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใหม่ที่น่าสนใจในการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในพลาสมา Michael VR และคณะ (Michael VR. 1996: 173-177) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอล พบว่าเป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ได้ถูกต้องเช่นเดียวกับเทคนิค HPLC อีกทั้งเทคนิค CE ยังมีข้อดีคือไม่ต้องใช้คอลัมน์ในการวิเคราะห์ เครื่องและอุปกรณ์มีราคาถูก ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่าเทคนิค HPLC แต่จะต้องใช้ผู้วิเคราะห์ที่มีความชำนาญสูงกว่า

2.1.4 Inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry

Braselton และคณะ (Braselton WE. 1997: 1429-1435) ได้นำเทคนิค inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry มาวัดปริมาณไอโอดีนในโมเลกุลของไอโอเฮกซอล ไอโอดีนจะถูกวัดที่ความยาวคลื่น 178.276 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้ผู้วิจัยต้องมีความชำนาญในเครื่องมือ และมีต้นทุนในการวิเคราะห์สูง

3. เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร (μ -LC)

โครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร (μ - Liquid Chromatography, μ -LC) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิค HPLC ให้มีขนาดเล็กกลง โดยลดขนาดหรือเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ดังแสดงในภาพประกอบที่ 2.2 และปริมาณของสารที่ใช้ในการวิเคราะห์น้อยลง ซึ่งหลักการของเทคนิค μ -LC จะเหมือนกับกับเทคนิค HPLC คือแยกสารประกอบโดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารในสองเฟสที่เรียกว่าเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของสาร ดังนั้นความแตกต่างกันของแรงหน่วงจึงทำให้โมเลกุลของสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ซึ่งบรรจุเฟสคงที่ ในเวลาที่แตกต่างกัน (retention time)



ภาพประกอบ 2 ภาพการเปรียบเทียบขนาดของคอลัมน์ในระบบ μ -LC และ HPLC : (A) คอลัมน์แบบเตรียมเอง PEEK nano-flow μ -LC ขนาด $100\ \mu\text{m i.d.} \times 5\ \text{cm}$, (B) คอลัมน์แบบซื้อ C-18 PEEK capillary μ -LC ขนาด $75\ \mu\text{m i.d.} \times 25\ \text{cm}$, (C) คอลัมน์แบบซื้อ C-8 stainless steel μ -LC ขนาด $1\ \text{mm i.d.} \times 10\ \text{cm}$, (D) คอลัมน์แบบซื้อ reversed-phase stainless steel ขนาด $4.6\ \text{mm i.d.} \times 25\ \text{cm}$ ใช้ระบบ HPLC แบบดั้งเดิม

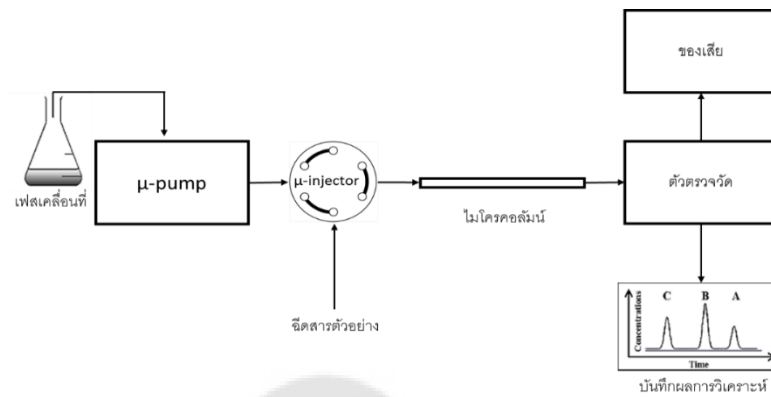
ที่มา : Danilo Corradini. (2011)

μ -LC เป็นเทคนิคที่มีการใช้กันแพร่หลาย ซึ่งเครื่องมือที่นั่นคล้ายกับระบบ HPLC ซึ่งสามารถดัดแปลงมาจากระบบ HPLC แบบดั้งเดิมได้ สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ได้หลากหลาย เช่นเดียวกับ HPLC แต่มีข้อดีที่โดดเด่นกว่าเทคนิค HPLC แบบดั้งเดิม ในด้านการใช้เวลาในการวิเคราะห์ ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและสารละลายน้อยกว่าเดิมมาก มีผู้วิจัยจำนวนไม่น้อยที่นำเทคนิค μ -LC ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ตัวอย่างงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้เทคนิค μ -LC

| ปี | ประเภทตัวอย่าง | คอลัมน์ | ตัวตรวจวัด | อ้างอิง |
|------|--|---|------------|--------------------------------------|
| 2004 | โปรตีน | monolithic poly(BMA-co-EDMA) | UV | Dean Lee; et al. (2004). |
| 2004 | Chiral & amino acid | Ristocetin A bonded to 3.5 μ m silica packed (10 cm \times 1 mm I.D.) | UV | Anna-Maria Piccinini; et al. (2004). |
| 2004 | alpha-bisabolol in human blood | Zorbax SB C18(150 mm \times 0.5 mm i.d., 5 μ m) | ESI-MS | Luigi Perbellini.; et al. (2004). |
| 2007 | ceramide | hypercarb 150 \times 0.53 mm | ELSD | Aur'elie Hazotte.; et al. (2007). |
| 2009 | low- and high-molecular-weight compounds | Monolithic poly(1,2-bis(p-vinylphenyl)ethane (BVPE)) | UV | Andreas Greiderer; et al. (2009). |
| 2014 | PAHs, alkylphenones, โปรตีน | monolithic poly(AOD-co-EDMA) | UV | Qianqian Duan; et al. (2014). |

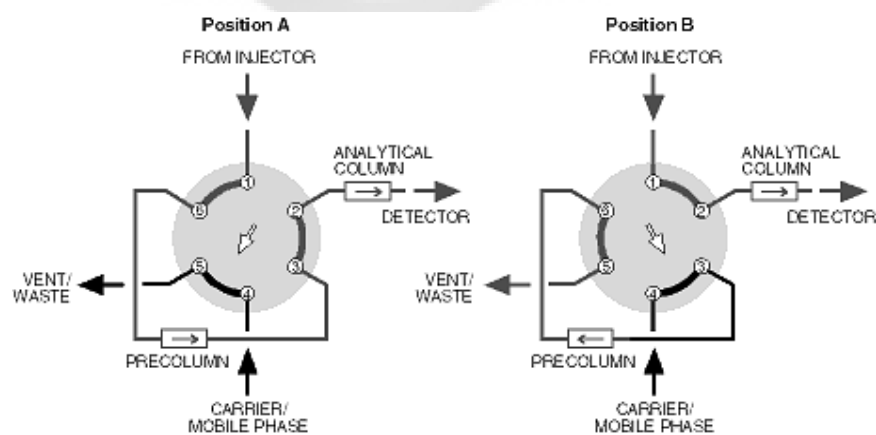
ระบบ μ -LC ประกอบด้วย เฟสเคลื่อนที่, เครื่องสูบ, injector, คอลัมน์, ตัวตรวจวัด และระบบบันทึกผลดังแสดงในภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 ไดอะแกรมของระบบ μ -LC

3.1 ตัวฉีด (injector)

ตัวฉีดทำหน้าที่ในการควบคุมปริมาณและนำสารตัวอย่างของเหลวเข้าไปในกระแสดำเนินการไหลของเฟสเคลื่อนที่ อยู่ในตำแหน่งระหว่างปั๊มและคอลัมน์ซึ่งจะต้องสามารถทนแรงดันได้สูง injector ในเทคนิค μ -LC นิยมใช้วาล์วแบบ 6-port ทำงานโดยการฉีดสารตัวอย่างในขณะที่ตำแหน่ง load ให้สารตัวอย่างเข้าไปใน loop จนเต็มเพื่อกำหนดปริมาณของสารตัวอย่างที่ต้องการฉีด แล้วทำการสั่งงานการฉีดโดยมีการปรับทิศทางการไหลเฟสเคลื่อนที่ที่จะชะสารตัวอย่างที่อยู่ใน loop เข้าสู่คอลัมน์ในการแยก ดังแสดงในภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 ระบบการทำงานของวาล์วแบบ 6-port

ที่มา : <http://www.vici.com/support/app/app2.php>

3.2 เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

เฟสเคลื่อนที่ใน HPLC หมายถึงตัวทำละลายที่ไหลเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่องเพื่อพา สารละลายตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ ควรมีความบริสุทธิ์สูงปราศจากสิ่งเจือปน และไม่ทำปฏิกิริยากับ เฟสคงที่ (คอลัมน์) ตัวตรวจวัด และสารที่ต้องการแยกจนทำให้สารที่ต้องการแยกเปลี่ยนแปลงสภาพ เฟสเคลื่อนที่อาจพบได้ใน 2 ลักษณะคือ

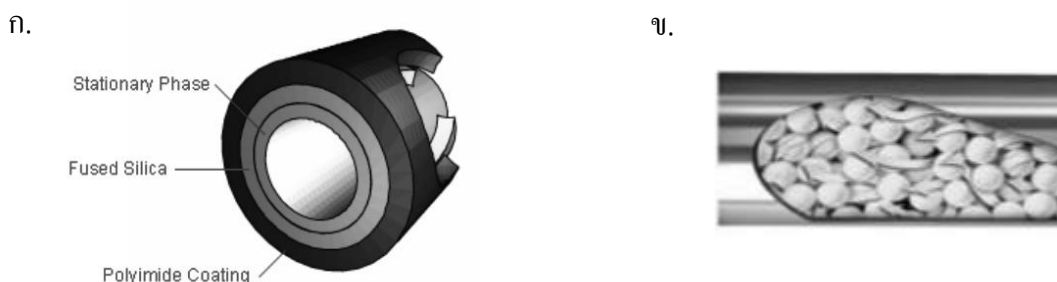
1. Isocratic elution เป็นการให้ สารละลายเพียงองค์ประกอบเดียวในการชะสารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์
2. Gradient elution เป็นการให้สารละลายมากกว่าหนึ่งองค์ประกอบชะสารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ ซึ่งเหมาะกับการแยกสารหลายชนิดที่มีความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่ต่างกันมาก

3.3 เครื่องสูบล (pump)

เครื่องสูบล (pump) มีหน้าที่สูบลของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลเข้าไปในคอลัมน์ และรักษาอัตราการไหลให้คงที่ เช่น syringe pump, reciprocating piston pump และ constant pressure pump ซึ่งในเทคนิค μ -HPLC ซึ่งต้องการอัตราการไหลที่ต่ำ อาจต้องมีอุปกรณ์เสริมในการลดอัตราการไหลจากเครื่องสูบล เพื่อให้ได้อัตราการไหลที่ต่ำกว่าขีดจำกัดของเครื่องสูบลในระบบ HPLC ปกติ

3.4 คอลัมน์ (column)

ในเทคนิค μ -HPLC นิยมใช้คอลัมน์ 3 ประเภทหลัก คือ open tubular ซึ่งเป็นคอลัมน์แบบท่อเปิดมีเฟสคงที่เคลือบที่พื้นผิวท่อ และแบบ packed ประกอบด้วยเฟสคงที่ของแข็งบรรจุอยู่ภายใน ซึ่งในแต่ละประเภทมีความง่ายในการเตรียมและประสิทธิภาพทางโครมาโทกราฟีต่างกัน ซึ่งสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดตัวอย่างที่จะวิเคราะห์



ภาพประกอบ 5 คอลัมน์แบบ packed และแบบ open tubular : ก.คอลัมน์แบบ open tubular,
ข.คอลัมน์แบบ packed

ที่มา : <http://www.thetruthaboutforensicscience.com/what-is-a-gas-chromatography-column-and-why-should-i-care/>, <https://www.chromservis.eu/c/more-about-chromatography?offset=130>

3.5 ตัวตรวจวัด (detector)

ตัวตรวจวัดมีหน้าที่วัดสัญญาณซึ่งแปรผันตรงกับปริมาณของสารเพื่อส่งให้เครื่องบันทึกผลทำการบันทึกค่าและแสดงผล ตัวตรวจวัดมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่ต้องตรวจวัด ตัวอย่างเช่น ตัววัดแสง (UV-vis detector) ใช้สำหรับการวัดสารที่มีสีหรือมีความขุ่น ตัววัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) ตัววัดดัชนีหักเห (refractive index detector) ตัวตรวจวัดแต่ละชนิดมีความไวและข้อจำกัดในการใช้งานแตกต่างกัน

4. โมนอลิธิคคอลัมน์

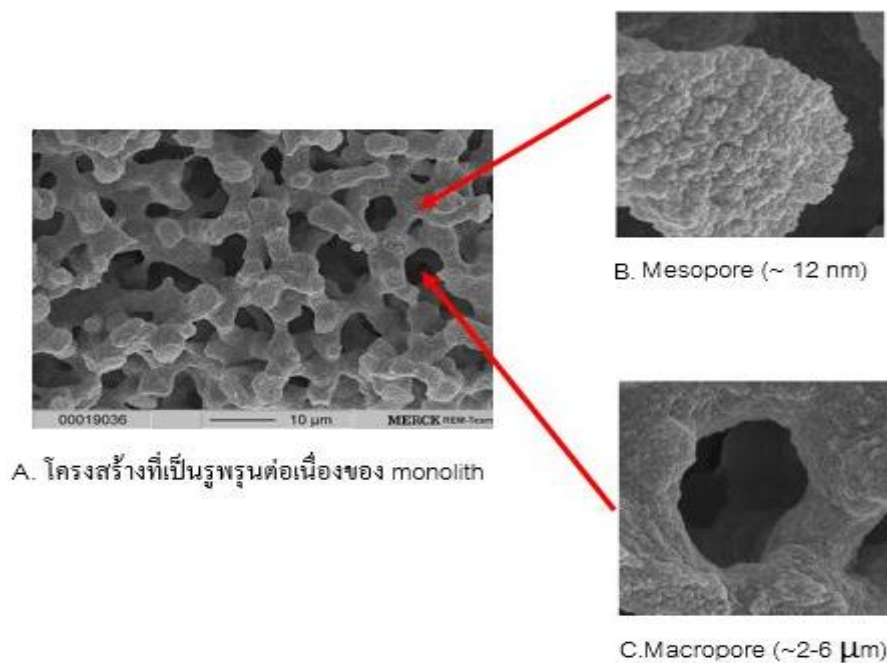
โมนอลิธิคคอลัมน์ (monolithic column) เป็นคอลัมน์ที่ใช้วัสดุโมนอลิธิค (monolithic material) ซึ่งเป็นวัสดุแบบใหม่ที่ถูกนำมาใช้เป็นเฟสคงที่ในเทคนิคโครมาโทกราฟีในปี ค.ศ.1970 โดย Kubin และคณะ (Kubin M. 1967: 3881) โดยโมนอลิธิคชิ้นแรกเตรียมจาก open-pore polyurethane foams และนำไปใช้กับเทคนิค size exclusion chromatography แม้ว่าจะสามารถนำมาใช้แยกโปรตีนได้แต่การซึมผ่านของคอลัมน์ยังต่ำมาก วิธีการในการเตรียมความพร้อมได้รับการพัฒนาต่อไปจำนวนมาก โดยมีจุดประสงค์ของการเพิ่มความพรุนและประสิทธิภาพของวัสดุโมนอลิธิค ในปี ค.ศ.1991 นากานิชิ และคณะได้อธิบายวิธีใหม่ในการเตรียมโมนอลิธิคที่มีการซึมผ่านสูงจากซิลิกา (Nakanishi K. 1991:

2518-2530) แต่วิธีการที่ยังคงค่อนข้างยาก ภายหลังได้มีการวิจัยเพื่อปรับปรุงวิธีการเตรียม วัสดุโมโนลิติก ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นช่วงหลัง โดยมีการเตรียมและการประยุกต์ใช้หลากหลาย

โมโนลิติกคอลลัมน์มีข้อดีที่โดดเด่นกว่า เฟสคงที่แบบเก่าในแง่ของความเป็นรูพรุนสูง (Minakuchi H. 1996: 3498-3501) ทำให้สามารถใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงการแยกจึงรวดเร็ว ทำให้วิเคราะห์ ตัวอย่างได้จำนวนมาก อีกทั้งมีความยืดหยุ่นสำหรับการเชื่อมต่อกับระบบอื่น ๆ (Cabrera K. 1998: 50-53) นอกจากนี้โมโนลิติกสามารถเตรียมขึ้นภายใน fused silica capillary และเกิดพันธะที่แข็งแรงกับผิวแก้วจึงไม่จำเป็นต้องใช้วัสดุปิดปลายคอลลัมน์

4.1 โครงสร้างของวัสดุโมโนลิติก

โครงสร้างของโมโนลิติกมีรูปร่างคล้ายกับฟองน้ำ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นรูพรุนแบบต่อเนื่อง ซึ่งรูพรุนของโมโนลิติกมี 2 ชนิด คือ macropore และ mesopore ดังแสดงในภาพประกอบ 6 macropore ทำให้ใช้อัตราการไหลได้สูงเนื่องจากความต้านทานต่ำ รูพรุนเหล่านี้จะกำหนดคุณสมบัติการซึมผ่านของคอลลัมน์ mesopore จะอยู่บนโครงสร้างทำให้พื้นที่ผิวมากขึ้น



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างและรูพรุนของวัสดุโมโนลิติก : A.โครงสร้างหลักของโมโนลิติก B.รูพรุนบนโครงสร้างของโมโนลิติก C.รูพรุนระหว่างโครงสร้างของโมโนลิติก

ที่มา : Karin Cabrera. (2014) 843-852.

4.2 ประเภทของโมโนลิธิคคอลัมน์

โมโนลิธิคคอลัมน์แบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลักๆ ตามประเภทของสารที่ใช้เตรียมเป็นโครงสร้าง คือ ออแกนิกโมโนลิธิ (organic monolith) หรือ Polymer-based monolith กับ อินอแกนิกโมโนลิธิ (inorganic monolith) หรือ Silica-based monolith ซึ่งโมโนลิธิคคอลัมน์แต่ละประเภทมีข้อดีและข้อเสียในด้านที่แตกต่างกัน เช่น ออแกนิกโมโนลิธิจะมีข้อดีที่สามารถรองรับการใช้งานในสภาวะที่ค่า pH ที่มีช่วงกว้างกว่าอินอแกนิกโมโนลิธิ ซึ่งเกิดการสลายตัวได้ที่สภาวะที่มีค่า pH สูง และออแกนิกโมโนลิธิสามารถเลือกเตรียมคอลัมน์ที่หมู่ฟังก์ชันได้หลากหลายกว่า แต่ออแกนิกโมโนลิธิมีข้อเสียในข้อจำกัดในการเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งอาจทำให้เกิดอาการบวมได้ และมีประสิทธิภาพการแยกที่ต่ำกว่า

4.2.1 ออแกนิกโมโนลิธิ (organic monolith)

ออแกนิกโมโนลิธิเป็นพอลิเมอร์ที่ใช้โมโนเมอร์ที่เป็นสารอินทรีย์เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน จึงสามารถเรียกวัดวัสดุโมโนลิธิชนิดนี้อีกแบบหนึ่งว่า polymer-based monolith คอลัมน์เหล่านี้ได้รับความนิยมมากขึ้นเนื่องจากสามารถใช้งานในค่า pH เป็นช่วงกว้าง มีขั้นตอนการเตรียมง่ายและการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของวัสดุได้หลากหลาย (Zhu G Z. 2007:792-803) การเตรียมออแกนิกโมโนลิธิจะทำได้โดยวิธี *in-situ* polymerization ซึ่งเป็นการ polymerization ของโมโนเมอร์กับตัวเชื่อมใน ตัวทำละลายสำหรับการสร้างรูพรุนที่เหมาะสม การเตรียมโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกเนื่องจากจะเตรียมในขั้นตอนเดียวและเตรียมในแคปิลารีคอลัมน์ซึ่งถูกตัดแปลงหมู่ฟังก์ชันที่พื้นผิวให้สามารถยึดเกาะกับวัสดุโมโนลิธิค เมื่อเตรียมเสร็จสามารถนำไปใช้งานได้ทันที โดยทั่วไปองค์ประกอบที่ใช้ในการเตรียมจะประกอบด้วย

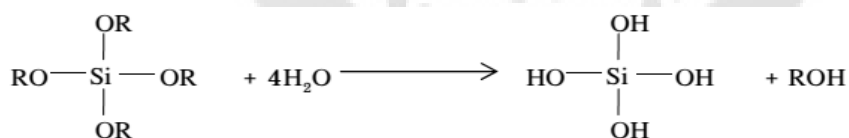
- Monomers ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางเคมีของคอลัมน์ โดยนิยมใช้เป็นสารประเภท methacrylate ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยา polymerization ได้ง่าย
- Crosslinking monomer ทำหน้าที่ในการเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างโมโนเมอร์ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้าง นิยมใช้ ethylene dimethacrylate (EDMA)
- Porogenic solvent ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายโมโนเมอร์ และกำหนดคุณสมบัติความเป็นรูพรุนในด้านปริมาณและขนาด

- Initiator ทำหน้าที่เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา polymerization โดยทั่วไปนิยมใช้ azobisisobutyronitrile (AIBN)

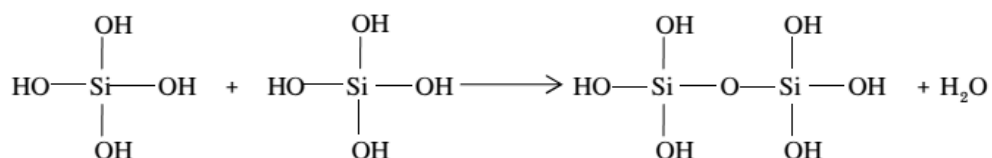
4.2.2 อินออแกนิกโมโนลิธ (inorganic monolith)

อินออแกนิกโมโนลิธเป็นโมโนลิธที่เตรียมจากสารอนินทรีย์โดยจะเรียกชื่อตามสารที่ใช้เตรียมเช่น Silica-based monolith และ Zirconia-based monoliths ซึ่งการเตรียมโมโนลิธประเภทนี้มักเตรียมด้วยกระบวนการโซลเจล (Sol-Gel) โดยการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวที่เรียกว่า "Sol" ส่วนมากอยู่ในรูปของสารแขวนลอยที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 0.15 ถึง 1 ไมครอน เป็นของแข็งที่เรียกว่า "Gel" โดยการนำสารละลายต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยา สารประกอบที่เกิดขึ้นจะอยู่ในลักษณะของโซล เมื่อโซลเกาะตัวกันเป็นร่างแหอย่างไม่เป็นระเบียบจะทำให้เกิดเป็นเจล ซึ่งในการเตรียม Silica-based monolith จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ tetramethoxysilane, tetraethoxysilane หรือ n-alkyltrialkoxysilanes แล้วเกิดปฏิกิริยาการควบแน่นในน้ำของ alkoxysilane แล้วทำการเติมตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการควบแน่นของสายพอลิเมอร์ทำให้เกิดโครงสร้างของ monolith (Legido-Quigley C. 2003:917-944) ซึ่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและเกิดปฏิกิริยาการควบแน่นมีกลไกดังแสดงในภาพประกอบ 7

1.ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส



2.ปฏิกิริยาการควบแน่น



ภาพประกอบ 7 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการควบแน่นในกระบวนการโซลเจลของ

n-alkyltrialkoxysilanes

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมด้วยโมโนลิธิคแคปปิลารีคอลลัมน์ร่วมกับเทคนิค μ -LC-UV รายละเอียดของเนื้อหาในบทนี้ประกอบด้วย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
2. การเตรียมสารเคมี
3. วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตาราง 4 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

| สารเคมี | เกรด | บริษัทจัดจำหน่าย |
|-------------------------|------------|-----------------------------|
| Acetonitrile | HPLC | Labscan (Bangkok, Thailand) |
| 1,4- Butanediol | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Decanol | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Ethylene dimethacrylate | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Ethylene glycol | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Glacial acetic acid | Analytical | Labscan (Bangkok, Thailand) |
| Iohexol | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Isoamyl alcohol | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Methacrylic acid | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Methanol | HPLC | Labscan (Bangkok, Thailand) |
| Perchloric acid | Analytical | Labscan (Bangkok, Thailand) |

ตาราง 4 (ต่อ)

| สารเคมี | เกรด | บริษัทจัดจำหน่าย |
|--|------------|-----------------------------|
| Phenol | Analytical | Polskie |
| Phosphoric acid | Analytical | Labscan (Bangkok, Thailand) |
| Sodium diatrizoate hydrate | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Sodium hydroxide | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Stearyl methacrylate | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Thiourea | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Toluene | Analytical | Labscan (Bangkok, Thailand) |
| 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |
| Zinc sulfate heptahydrate | Analytical | Sigma-Aldrich (Poole, UK) |

ตาราง 5 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

| เครื่องมือ | รุ่น | บริษัทจัดจำหน่าย |
|------------------------------|---|------------------|
| เครื่อง High pressure pump | Constametric4100 | TSP |
| เครื่อง UV-Visible detector | Spectroflow 757 | Kratos |
| Micro injector 6-port valve | C2N-4346 | Valco |
| Fused-silica capillaries | i.d.100 μm , o.d 360 μm | Agilent |
| เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง | AB104-S | Mettler Toledo |
| pH meter | 827 pH Lab | Metrohm Autolab |
| เตาอบ | INB-400 | Memmert |
| กล้องจุลทรรศน์ | 162(1000X) | National |
| เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน | Labostar | Siemens |
| เครื่อง centrifuge | CP80WX | Hitachi |

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 สารผสมสำหรับการเตรียมโมโนลิติคอลลัมน์

เตรียมสารผสมสำหรับการเตรียมโมโนลิติคอลลัมน์ 3 ชนิด คือ SMA-EDMA , PEDAS-EDMA และ MAA-EDMA โดยซึ่งน้ำหนักของสารเคมีในข้อ 2.1.1- 2.1.3 ลงในขวดแก้วขนาดเล็กปิดฝาขวดแล้วทำการเขย่าให้สารเคมีผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปเตรียมคอลัมน์ตามข้อ 3.2.2

2.1.1 สารผสมสำหรับการเตรียมโมโนลิติคอลลัมน์ SMA-EDMA ประกอบด้วย

- Monomers (30%(w/w) เปรียบเทียบกับ porogen)
 - : 0.1915 g stearyl methacrylate (SMA) (65%)
 - : 0.1040 g ethylene dimethacrylate (EDMA) (35%)
- Porogen (70% (w/w) เปรียบเทียบกับ monomer)
 - : 0.5642 g isoamyl alcohol (80%)
 - : 0.1331 g 1, 4-butadiol (20%)
- Initiator : 0.0028 g Azobisisobutyronitrile (AIBN) (0.95% (w/w) เปรียบเทียบกับ monomer)

2.1.2 สารผสมสำหรับการเตรียมโมโนลิติคอลลัมน์ SMA-EDMA ประกอบด้วย

- Monomers (33%(w/w) เปรียบเทียบกับ porogen)
 - : 0.3325 g pentaerythritol diacrylate (PEDAS) (95%)
 - : 0.0175 g EDMA (5%)
- Porogen (67% (w/w) เปรียบเทียบกับ monomer)
 - : 0.5148 g pentanol (79.2%)
 - : 0.1118 g ethylene glycol (17.2%)
 - : 0.0234 g water (3.6%)
- Initiator : 0.0035 g AIBN (1% (w/w) เปรียบเทียบกับ monomer)

2.1.3 สารผสมสำหรับการเตรียมโมโนลิธิคคอลลัมน์ SMA-EDMA ประกอบด้วย

- Monomers (33%(w/w) เปรียบเทียบกับ porogen)
 - : 0.0481 g methacrylic acid (MAA) (10%)
 - : 0.4270 g EDMA (90%)
- Porogen (67% (w/w) เปรียบเทียบกับ monomer)
 - : 0.1175 g toluene (12%)
 - : 0.8628 g decanol (88%)
- Initiator : 0.0045 g AIBN (1% (w/w) เปรียบเทียบกับ monomer)

2.2 สารละลายสำหรับการเตรียมเฟสเคลื่อนที่

2.2.1 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer)

ชั่งกรดอะซิติกเข้มข้น 0.3000 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด ละลายในน้ำประมาณ 90.00 มิลลิลิตร ปรับ pH ของบัฟเฟอร์ให้เป็น 3, 4 และ 5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.00 โมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) ให้ครบ 100.00 มิลลิลิตร สารละลายสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ในแต่ละขวดจะมีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

2.2.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)

ชั่ง $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.3000 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด ละลายในน้ำประมาณ 90.00 มิลลิลิตร ปรับ pH ของบัฟเฟอร์ให้เป็น 6, 7 และ 8 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ครบ 100.00 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในแต่ละขวดจะมีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

2.3 สารละลายสำหรับการเตรียมตัวอย่างเซรัม

2.3.1 สารละลายกรดเปอร์คลอริก 5% ((5% v/v) perchloric acid)

สารละลายกรดเปอร์คลอริก 5% เตรียมโดยการบีเบต 71.33 มิลลิลิตร ของกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น (70%) ใส่ขวดวัดปริมาตรแล้วนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 1000.00 มิลลิลิตร

2.3.2 สารละลายอะซิโตไนโตรล์ 50% ((50% v/v) Acetonitrile)

สารละลายอะซิโตไนโตรล์ 50% เตรียมโดยการบีเปิด 50.00 มิลลิลิตร ของอะซิโตไนโตรล์ ใส่ขวดวัดปริมาตรแล้วนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 100.00 มิลลิลิตร

2.3.3 สารละลายซิงค์ซัลเฟต 0.1 โมลาร์ (0.1M ZnSO₄)

สารละลายซิงค์ซัลเฟต 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยการชั่ง ZnSO₄ 2.8756 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรแล้วนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 100.00 มิลลิลิตร

2.4 สารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอล

สารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอลเตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานไอโอเฮกซอล 0.0010 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนมีปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1000 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

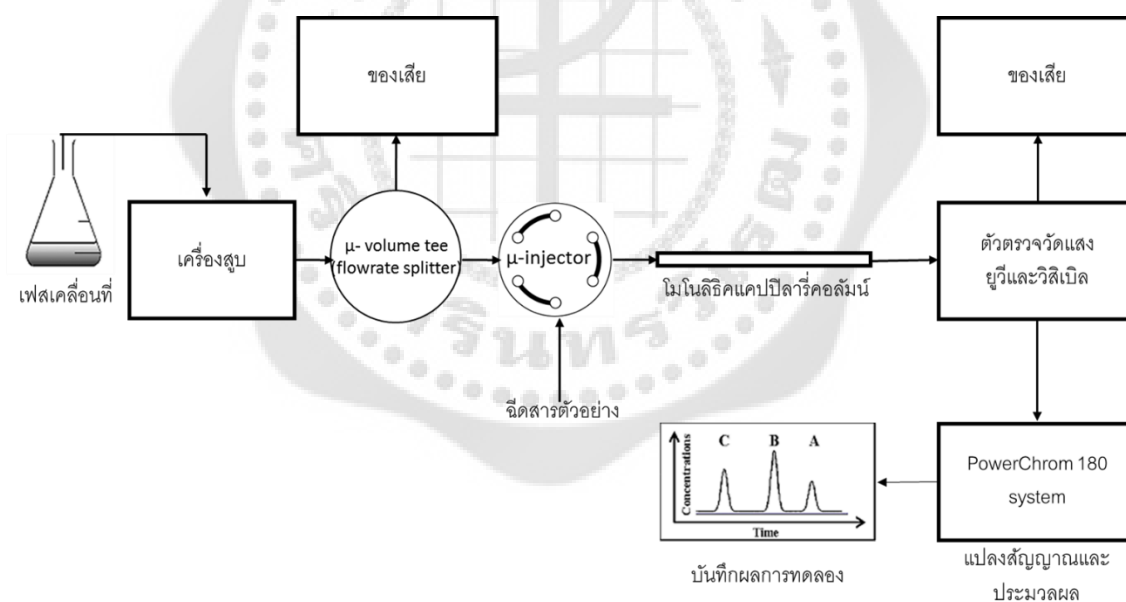
3. วิธีการทดลอง

3.1 การสร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร

ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรประกอบด้วยส่วนของเครื่องมือดังนี้คือ เครื่องสูบ(pump), ตัวลดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate splitter), ตัวฉีด (injector) ,โมโนลิติกแคปิลารีคอลัมน์ , ตัวตรวจวัดแสงยูวีและวิสิเบิล (UV-Visible detector), เครื่องแปลงสัญญาณและซอฟต์แวร์ประมวลผล และ ชุดคอมพิวเตอร์ ซึ่งมีรายละเอียดดังแสดงในตาราง 6 และนำเครื่องมือมาประกอบตามไดรแกรมในภาพประกอบ 8

ตาราง 6 เครื่องมือสำหรับการสร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร

| เครื่องมือ | รุ่น | บริษัทจัดจำหน่าย |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| เครื่อง High pressure pump | Constametric4100 | TSP |
| เครื่อง UV-Visible detector | Spectroflow 757 | Kratos |
| Micro injector 6-port valve | C2N-4346 | Valco |
| Bushing joint 3-way 1/16" | DG-6010-43210 | Shimadzu |
| PowerChrom 180 system | ER180 | Edaq |
| โมโนลิธิคแคปปีลารีคอลลัมน์ | - | - |
| เครื่องคอมพิวเตอร์ | - | - |



ภาพประกอบ 8 ไตรแกรมของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร

3.2 การเตรียมโมโนลิธิคแคปิลลารีคอลัมน์

การเตรียมโมโนลิธิคแคปิลลารีคอลัมน์ประกอบด้วยวิธีการ 2 ขั้นตอนคือ การปรับสภาพพื้นผิวของแคปิลลารีคอลัมน์ และการเตรียมโมโนลิธิคแคปิลลารีคอลัมน์ด้วยวิธี *in-situ* porimerization ในท่อแก้วแคปิลลารี

3.2.1 การปรับสภาพพื้นผิวของแคปิลลารีคอลัมน์

การเตรียมโมโนลิธิคคอลัมน์ใน fused silica capillary จะต้องทำการปรับสภาพทางเคมีของพื้นผิวคอลัมน์ให้สามารถยึดเกาะกับวัสดุโมโนลิธิค ด้วย 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (γ -MAPS) โดยนำ fused silica capillary มาบรรจุสารละลาย 1 โมลาร์ไซเตียมไฮดรอกไซด์โดยใช้ความดันจากก๊าซไนโตรเจนจากนั้นปิดด้วยจุกยาง (septum) ที่ปลายทั้งสองข้าง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ fused silica capillary มาล้างด้วยน้ำและเมทานอลเป็นเวลาอย่างละ 30 นาที หลังจากนั้น ทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน นำ fused silica capillary มาบรรจุสารละลาย γ -MAPS ในเมทานอล 50% (v / v) ปิดปลายแคปิลลารีทั้งสองข้างด้วยจุกยาง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 คืนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา silanisation จากนั้นล้างด้วยเมทานอลและทำให้แห้งโดยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน

3.2.2 การเตรียมโมโนลิธิคแคปิลลารีคอลัมน์

ทำการเตรียมโมโนลิธิคแคปิลลารีคอลัมน์ 3 ชนิด คือ MAA-EDMA โดยใช้วิธีการเตรียมดัดแปลงจากวิธีของ Y. Fan และคณะ (Fan Y. 2004:1065-1069), PEDAS-EDMA โดยใช้วิธีการเตรียมดัดแปลงจากวิธีของ Bedair และ Rassi (Okanda. 2005:1988-1995) และ SMA-EDMA โดยใช้วิธีการเตรียมดัดแปลงจากวิธีของ Jiang และ คณะ (Z. Jiang. 2007:39-45) โดยทั้ง 3 ชนิดเป็นโมโนลิธิคแคปิลลารีคอลัมน์ประเภทออกแกนิกโมโนลิธิ ซึ่งใช้วิธี *in-situ* porimerization ในการเตรียม โดยการนำ fused silica capillary ที่ทำการปรับสภาพพื้นผิวแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 100 ไมโครเมตร ยาว 40 เซนติเมตร นำมาบรรจุสารละลายผสมในข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.3 ปิดปลายแคปิลลารีด้วยจุกยางแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C โดยคอลัมน์ SMA-EDMA และ MAA-EDMA ใช้เวลา 6 ชั่วโมง ส่วนคอลัมน์ PEDAS-EDMA ใช้เวลา 3.5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต่อเข้าระบบ μ -LC ล้างด้วยเมทานอล 1 ชั่วโมง

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล

การหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลโดยนำสารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอลที่ความเข้มข้น 50 ppm มาใช้ในการทดลอง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ μ -LC-UV เพื่อศึกษาห้วงข้อสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ โดยห้วงข้อที่นำมาใช้ในการศึกษา มีดังนี้

3.3.1 ชนิดคอลัมน์ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

ชนิดของโมโนลิธิคคอลัมน์ที่นำมาใช้ในการศึกษามี 3 ชนิด คือ SMA-EDMA, PEDAS-EDMA และ MAA-EDMA เปรียบเทียบความเหมาะสมของชนิดของโมโนลิธิคคอลัมน์ โดยทำการทดลองวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลในสภาวะของระบบ μ -LC-UV เดียวกันทั้งหมดเพื่อเลือกคอลัมน์ที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ เพื่อนำไปใช้การหาสภาวะที่เหมาะสมในพารามิเตอร์อื่นต่อไป

3.3.2 ผลของค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่

จากการศึกษาในข้อ 3.3.1 เมื่อได้ชนิดของคอลัมน์ที่เหมาะสมแล้ว นำคอลัมน์ที่เลือกมาทำการทดลองเหมือนข้อ 3.3.1 แต่มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่ในช่วง 3-8 โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3, 4 และ 5 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6, 7 และ 8 เป็นองค์ประกอบ โดยค่า pH ที่เหมาะสม จะพิจารณาจากค่าเวลาคงตัวและลักษณะของสัญญาณ

3.3.3 ชนิด และอัตราส่วนของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่

จากการศึกษาในข้อ 3.3.2 เมื่อได้ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลแล้ว กำหนดให้ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดและที่ค่า pH นั้นคงที่ และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.3.2 แต่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ในเฟสเคลื่อนที่ในช่วง 30-50% และชนิดของตัวทำละลายออร์แกนิกในเฟสเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตน ไตรคลอโรเอทิลีน และเมทานอล โดยอัตราส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์และชนิดของตัวทำละลายออร์แกนิกที่เหมาะสม จะพิจารณาจากค่าเวลาคงตัวและลักษณะของสัญญาณ

3.4 การเตรียมตัวอย่างเซรัมของมนุษย์

จากการศึกษาในข้อ 3.3.3 เมื่อสภาวะของระบบ μ -LC-UV ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ไอโอเฮกซอลแล้ว ทำการทดลองเตรียมตัวอย่างเซรัมของมนุษย์ด้วยวิธีการสกัดโดยใช้ชนิดของตัวสกัด ในการสกัดไอโอเฮกซอล 4 ชนิด คือ 1. กรดเปอร์คลอริก 5% ในน้ำ (v/v) ดัดแปลงจากวิธีของ Rohit S. Soman และคณะ (Soman RS. 2005: 339-343) 2. อะซิโตไนไตรล์ 50% ในน้ำ (v/v) ดัดแปลงจากวิธีของ Richard Kay และคณะ (Kay R. 2008: 3255-3260) 3. สารละลายซิงค์ซัลเฟต 0.1 ไมลาร์ ดัดแปลงจากวิธีของ Cara Polson และคณะ (Polson C. 2003: 263-275) 4. centrifuge membrane filter ดัดแปลงจากวิธีของ Jie Sun และคณะ (Sun J. 2003: 276-284)

สกัดโดย นำตัวอย่างมา 50 ไมโครลิตร เติมตัวสกัดในข้อ 1. ถึง 3. ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ส่วนข้อ 4. นำตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน centrifuge membrane filter จากนั้นนำหลอดบรรจุสารละลายไปอัลตราโซนิก 15 นาที และเซนตริฟิวจ์ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายใส่มาทำการทดลองเหมือนข้อ 3.3.3 โดยชนิดของตัวสกัดที่เหมาะสม พิจารณาจากผลการแยกที่ไม่มีการรบกวนจากสารอื่น ความสะดวกในการเตรียม และความเที่ยงของวิธี

3.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามหัวข้อ ดังนี้

3.5.1 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

เตรียมกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอลให้มีความเข้มข้น 2,10, 50,100 และ 250 ppm นำไปวิเคราะห์ด้วย μ -LC-UV โดยใช้สภาวะที่กำหนดความเข้มข้นละ 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบสมการเชิงเส้นและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)

3.5.2 ความเที่ยงตรง (precision)

(1) ความเที่ยงตรงภายในวันเดียวกัน (Intraday precision)

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอลให้มีความเข้มข้น 50,100, 250 ppm ความเข้มข้นละ 7 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วย μ -LC-UV โดยใช้สภาวะที่กำหนด นำค่าเวลาคงตัวและพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

(2) ความเที่ยงตรงระหว่างวัน (Interday precision)

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอล ให้มีความเข้มข้น 50 ppm 7 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วย μ -LC-UV โดยใช้สภาวะที่กำหนด ทำการทดลองแบบเดียวกัน 3 วัน นำค่าเวลาคงตัวและพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

3.5.3 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

การตรวจสอบความแม่นยำทำโดยใช้วิธี standard addition โดยการเติมสารละลายมาตรฐานของไอโอเฮกซอล ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน 50 ppm ในตัวอย่างเซรัมมนุษย์ จำนวน 3 ตัวอย่าง นำสารละลายไปวิเคราะห์ด้วย μ -LC-UV โดยใช้สภาวะที่กำหนด นำพื้นที่ใต้สัญญาณที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ

3.5.4 ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

นำสารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอล 10 ppm มาเจือจางและทดลองฉีดที่ความเข้มข้นต่างๆ พร้อมบันทึกโครมาโทแกรมโดยฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ จนได้ความเข้มข้นที่มีสัดส่วนของความสูงของพีคต่อสัญญาณรบกวน (noise) เท่ากับ 3 และ 10 ซึ่งเป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ตามลำดับ

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัม

นำตัวอย่างเซรัมของมนุษย์มาใช้ในการทดสอบหัวข้อการวิเคราะห์ในตัวอย่างจริง โดยนำตัวอย่างมาสกัดและทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น สร้างกราฟการขับออกของไอโอเฮกซอลเพื่อใช้ในการประเมินภาวะโรคไตเรื้อรัง และเปรียบเทียบกับผลการทดลองโดยใช้เทคนิค HPLC ที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ (V. Meucci. 2004: 107-111)

3.7 การประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่ม

นำระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรที่สร้างขึ้นมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ เช่น น้ำชา กาแฟ และน้ำอัดลม

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมของมนุษย์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรควบคู่กับการใช้วัสดุสังเคราะห์โมโนลิธ โดยผู้วิจัยได้แบ่งงานวิจัยออกเป็น 3 ตอน ดังหัวข้อต่อไปนี้

ตอนที่ 1 สร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรและสังเคราะห์โมโนลิธแคปิลารีคอลัมน์

- 1.1 การสร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร
- 1.2 สังเคราะห์โมโนลิธแคปิลารีคอลัมน์

ตอนที่ 2 การศึกษาการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลด้วยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

- 2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล
- 2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

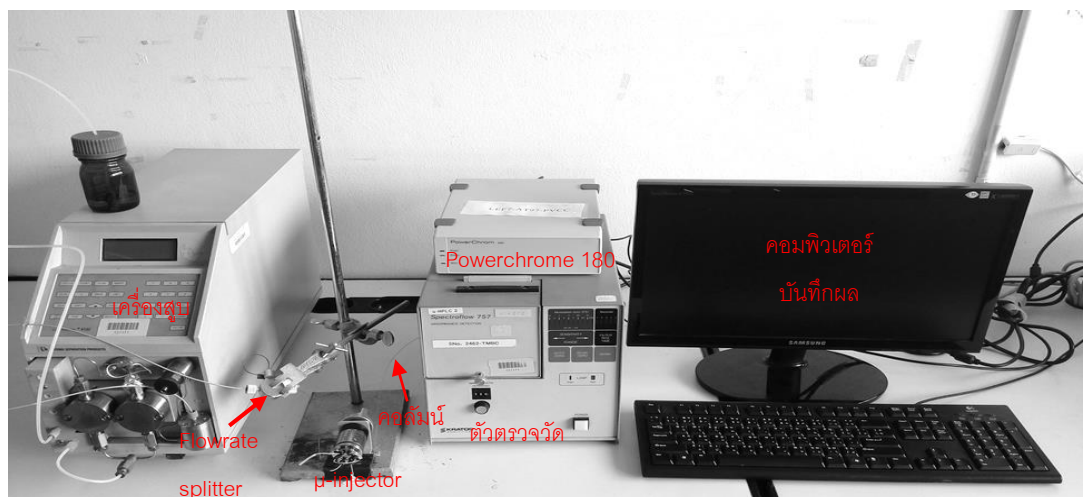
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมและการประยุกต์เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม

- 3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมของมนุษย์
- 3.2 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างกับวิธี HPLC
- 3.3 วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม

ตอนที่ 1 สร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรและสังเคราะห์โมโนลิติกแคปิลารีคอลัมน์

1.1 การสร้างระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตร

ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรที่สร้างขึ้นจากการประกอบเครื่องมือขึ้นจากไดรแกรมในภาพประกอบ 7 มีองค์ประกอบดังแสดงในภาพประกอบ 9



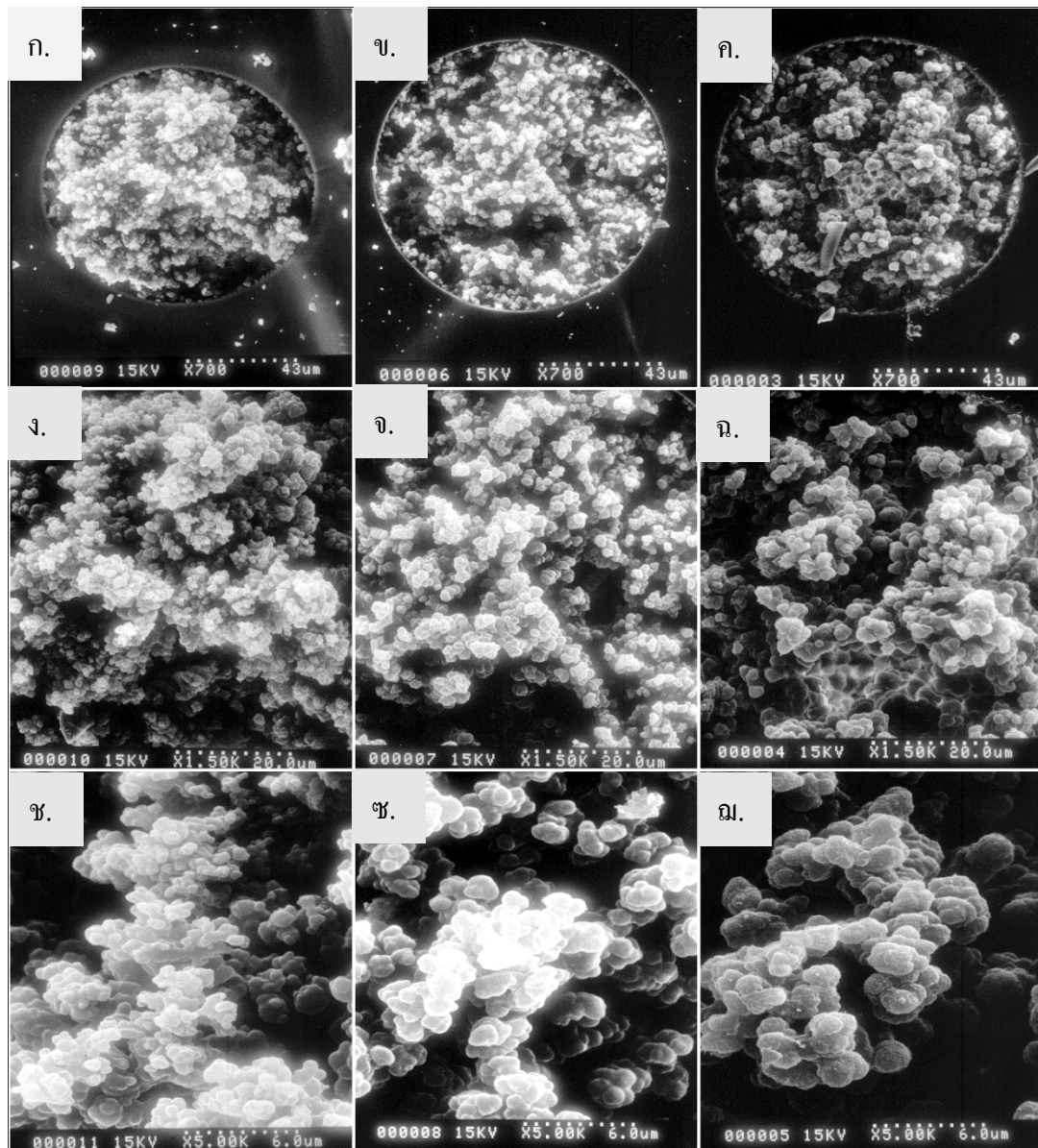
ภาพประกอบ 9 ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรที่สร้างขึ้น

พบว่าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรที่สร้างขึ้นนี้ สามารถทำงานได้ตามหลักการของโครมาโทกราฟีของเหลว ซึ่งระบบมีความเสถียรสูง และสามารถใช้งานร่วมกับโมโนลิติกแคปิลารีคอลัมน์โดยใช้อัตราการไหลต่ำได้เป็นอย่างดี

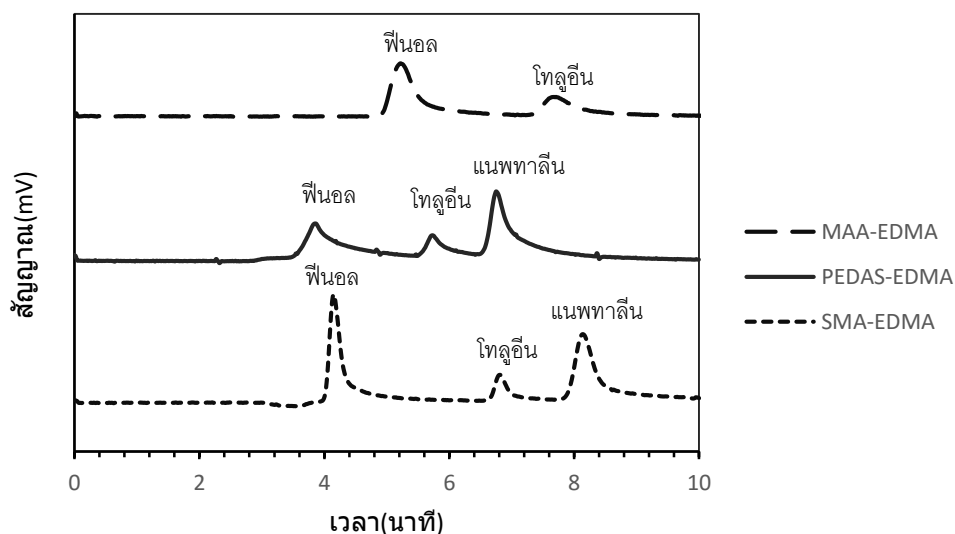
1.2 การเตรียมโมโนลิติกแคปิลารีคอลัมน์

จากการทดลองการเตรียมโมโนลิติกแคปิลารีคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด คือ SMA-EDMA, PEDAS-EDMA และ MAA-EDMA พบว่าสามารถเตรียมได้สำเร็จตามวิธีการเตรียมในบทที่ 3 ข้อ 3.2 ซึ่งโมโนลิติกแคปิลารีคอลัมน์ที่ทำการเตรียมขึ้นได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพโดยการถ่ายภาพตัดขวางด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ซึ่งภาพตัดขวางของคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นถึงลักษณะของโมโนลิติกที่มีความเป็นรูพรุนสูง ดังแสดงในภาพประกอบ 10 และได้ทำการทดสอบคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟีด้วยการทดลองแยกสารประกอบบางชนิดพบว่าคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการแยกสารประกอบออกจากกันได้ ซึ่งลำดับของสารที่ออกจากคอลัมน์

เรียงจากสารที่มีขี้้วมากไปหาสารที่มีขี้้วน้อยแสดงให้เห็นว่าคอลลิมนทั้ง 3 ชนิด มีเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบย้อนกลับ (reverse phase) ดังแสดงในภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 10 ภาพตัดขวางของโมโนลิทิกแคปปิลารีคอลลิมนถ่ายด้วยเทคนิค SEM : ก. ภาพ SMA-EDMA ขยาย 700 เท่า, ข. ภาพ PEDAS-EDMA ขยาย 700 เท่า, ค. ภาพ MAA-EDMA ขยาย 700 เท่า, ง. ภาพ SMA-EDMA ขยาย 1500 เท่า, จ. ภาพ PEDAS-EDMA ขยาย 1500 เท่า, ฉ. ภาพ MAA-EDMA ขยาย 1500 เท่า, ช. ภาพ SMA-EDMA ขยาย 5000 เท่า, ซ. ภาพ PEDAS-EDMA ขยาย 5000 เท่า, ฉ. ภาพ MAA-EDMA ขยาย 5000 เท่า



ภาพประกอบ 11 โครมาโทแกรมของคอลัมน์ SMA-EDMA, PEDAS-EDMA และ MAA-EDMA :

เฟสเคลื่อนที่ 70% ACN/water อัตราการไหล 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที

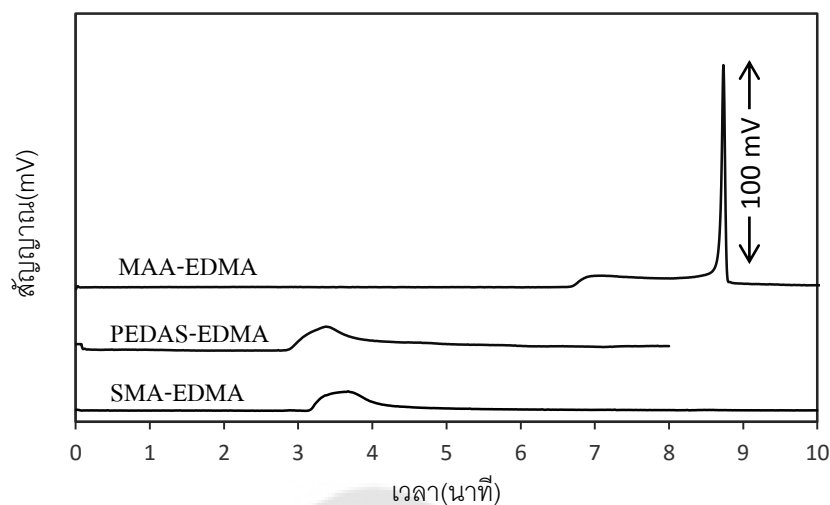
ตอนที่ 2 การศึกษาการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลด้วยระบบโครมาโทกราฟีของเหลว ระดับไมโครลิตรและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล ผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยกำหนดสภาวะเริ่มต้นคือ ใช้สารมาตรฐานไอโอเฮกซอลความเข้มข้น 50 ppm และใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนคงที่ไว้ที่ 70% ACN/water ที่อัตราการไหล 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจสอบด้วยตัวตรวจวัดแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทำการทดลองในพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

2.1.1 ชนิดคอลัมน์ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

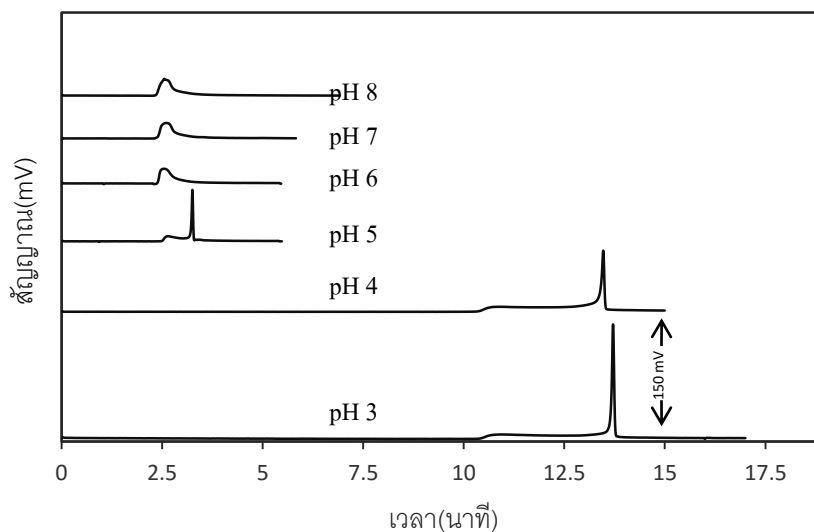
จากการทดลองหาชนิดคอลัมน์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลระหว่างคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าคอลัมน์ SMA-EDMA และ PEDAS-EDMA ไม่มีความจำเพาะในการแยกไอโอเฮกซอล ส่วนคอลัมน์ MAA-EDMA มีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล เนื่องจากคอลัมน์มีอันตรกิริยากับไอโอเฮกซอลโดยแสดงให้เห็นจากค่าเวลาคงตัวของไอโอเฮกซอล อีกทั้งลักษณะสัญญาณไอโอเฮกซอลมีแนวโน้มที่ดีกว่าที่ได้จากคอลัมน์อีกทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในภาพประกอบ 12 ผู้วิจัยจึงเลือกใช้คอลัมน์ MAA-EDMA เป็นคอลัมน์ที่เหมาะสมเพื่อนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลในพารามิเตอร์ลำดับต่อไป



ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ไฮโอเอทิลแอคริเลตด้วยคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด : เฟสเคลื่อนที่ 70% ACN/water อัตราการไหล 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที

2.1.2 ผลของค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่

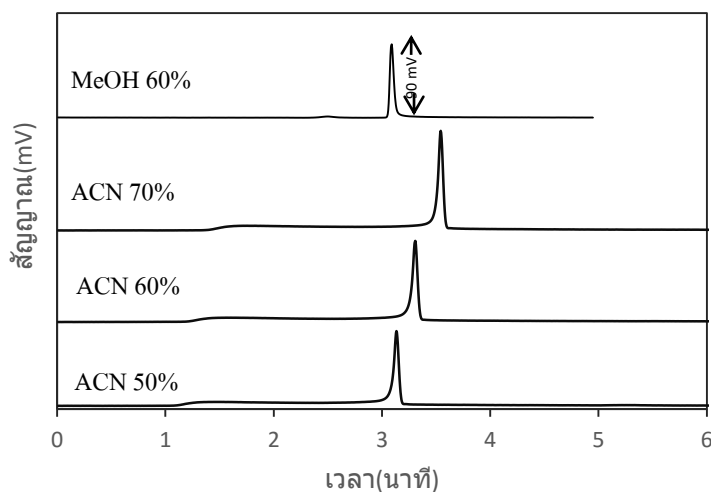
จากการทดลองวิเคราะห์สารมาตรฐานไฮโอเอทิลแอคริเลตโดยการคงที่อัตราส่วนของอะซิโตนไนโตรสไว้ที่ 70% และเปลี่ยนค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 3, 4 และ 5 ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ และ pH 6, 7 และ 8 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าการเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ pH 3, 4 และ 5 มีค่าเวลาตัวของไฮโอเอทิลแอคริเลตเท่ากับ 13.70, 13.48 และ 3.26 นาทีตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่าค่า pH ที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่าเวลาคงตัวของไฮโอเอทิลแอคริเลตลดลงเนื่องจากค่า pH ที่เปลี่ยนไปมีผลต่อการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชันที่พื้นผิวของคอลัมน์ MAA-EDMA และการเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 6, 7 และ 8 มีค่าเวลาตัวของไฮโอเอทิลแอคริเลตเท่ากับ 2.78 นาทีทั้งหมด ซึ่งจากค่าเวลาคงตัวและลักษณะของสัญญาณดังแสดงในภาพประกอบ 13 พบว่าการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่ ให้ผลการแยกที่ไม่ดี ผู้วิจัยจึงเลือกค่า pH ที่เหมาะสมเป็น pH 5 ซึ่งใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์ ซึ่งที่ค่า pH 5 มีค่าเวลาคงตัวของไฮโอเอทิลแอคริเลตที่ต่ำ มีความจำเพาะ และมีลักษณะของสัญญาณในแนวโน้มที่ดี เพื่อนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในพารามิเตอร์ต่อไป



ภาพประกอบ 13 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไอโอเฮกซอลที่ pH 3 ถึง 8 : เฟสเคลื่อนที่ 70% ACN/buffer pH 3-8 อัตราการไหล 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที

2.1.3 ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่

จากการทดลองการเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ โดยคงที่ pH ของเฟสเคลื่อนที่ไว้ที่ pH 5.0 และเปลี่ยนอัตราส่วนของอะซิโตนไตรีนในเฟสเคลื่อนที่เป็น 50%, 60% และ 70% ตามลำดับ พบว่ามีค่าเวลาคงตัวของไอโอเฮกซอลเท่ากับ 3.15, 3.35 และ 3.51 นาที ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มอัตราส่วนของอะซิโตนไตรีนทำให้เฟสเคลื่อนที่มีความเป็นขั้วลดลงส่งผลให้ไอโอเฮกซอลที่เป็นสารมีขั้วมากนั้นมีค่าเวลาคงตัวมากขึ้น จากโครมาโทแกรมในภาพประกอบ 13 พบว่ารูปทรงพีคที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของอะซิโตนไตรีนให้ผลที่ยังไม่ดี ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายจากอะซิโตนไตรีนเป็นเมทานอล 60% พบว่ามีค่าเวลาคงตัวของไอโอเฮกซอลเท่ากับ 3.1 นาที ซึ่งมีลักษณะของสัญญาณตามโครมาโทแกรมในภาพประกอบ 14 พบว่ามีลักษณะของสัญญาณของไอโอเฮกซอลที่ดีมีลักษณะที่แคบมีความสมมาตรและยังมีค่าเวลาคงตัวที่น้อยกว่าทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

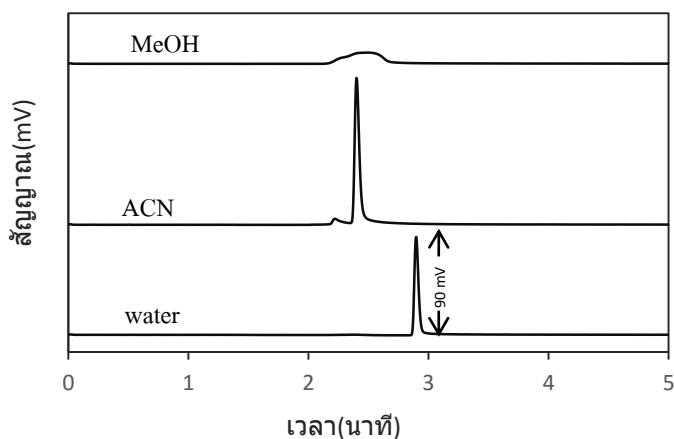


ภาพประกอบ 14 โครมาโทแกรมเปรียบเทียบชนิด และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ : เฟสเคลื่อนที่

acetate buffer pH 5 50mM/ACN 50-70% และ MeOH 60% อัตราการไหล 0.30 มิลลิลิตรต่อ นาที

2.1.4 ผลของชนิดตัวทำละลายในการเตรียมสารมาตรฐานไอโอเฮกซอล

จากการทดลองละลายสารมาตรฐานไอโอเฮกซอลด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ อะซิโตไนไตรล์ และเมทานอลแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่เลือกไว้ พบว่าการใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดให้ผลที่ต่างกัน ดังแสดงจากโครมาโทแกรมในภาพประกอบ 15 ซึ่งการละลายสารมาตรฐานไอโอเฮกซอลด้วยเมทานอลจะให้รูปทรงพีคที่อ่อนและประสิทธิภาพการแยกต่ำ การละลายในอะซิโตไนไตรล์จะได้พีคแยกเป็น 2 พีคซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของไอโอเฮกซอล โดยการวัดปริมาณไอโอเฮกซอลสามารถวัดจากเพียงไอโซเมอร์เดียวได้ และการละลายในน้ำให้รูปทรงพีคที่ดีที่สุดเพียงพีคเดียว และในตัวอย่างเซรัมเป็นตัวอย่างที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม



ภาพประกอบ 15 โครมาโทแกรมเปรียบเทียบชนิดตัวทำละลายสารมาตรฐานไอโอเฮกซอล : เฟสเคลื่อนที่ 60% MeOH/acetate buffer pH 5 50mM อัตราการไหล 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล ผู้วิจัยได้เลือกสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้คือ

เฟสคงที่: คอลัมน์ MAA-EDMA

เฟสเคลื่อนที่: สารละลายผสมระหว่างอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5 50mM 40% กับเมทานอล 60%
อัตราการไหล: 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที

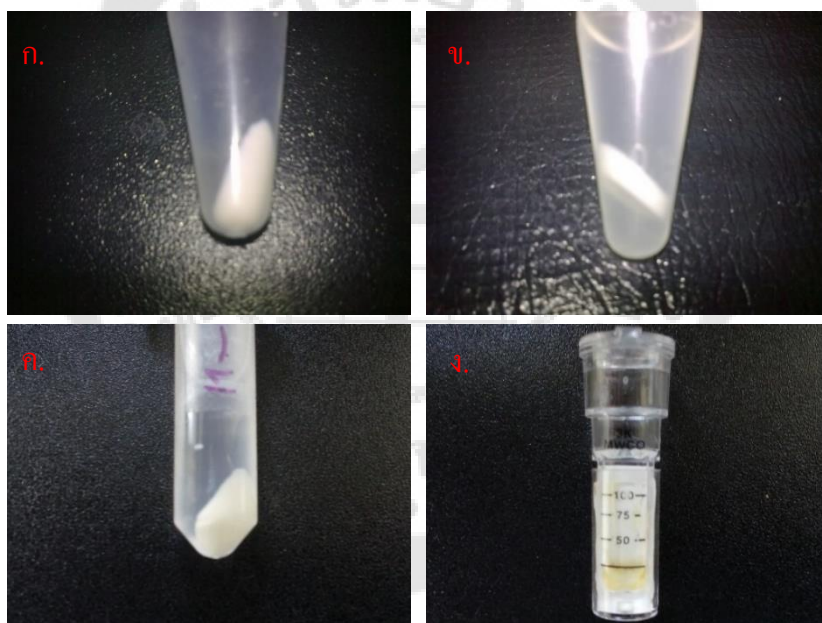
การตรวจวัด: ตรวจวัดแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

2.1.5 วิธีการเตรียมตัวอย่างเซรัมของมนุษย์

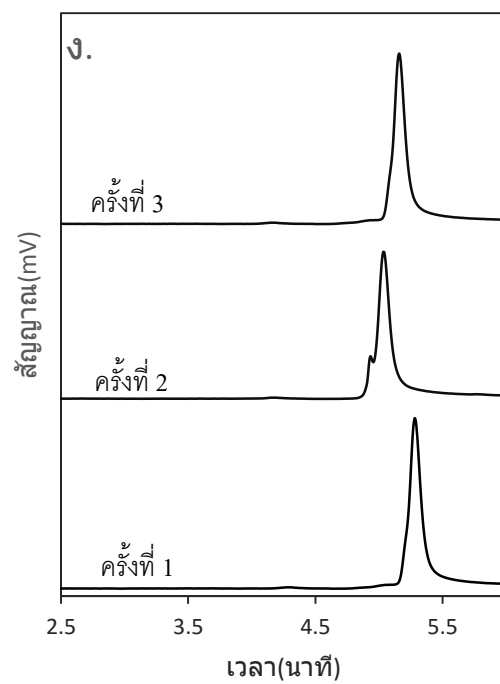
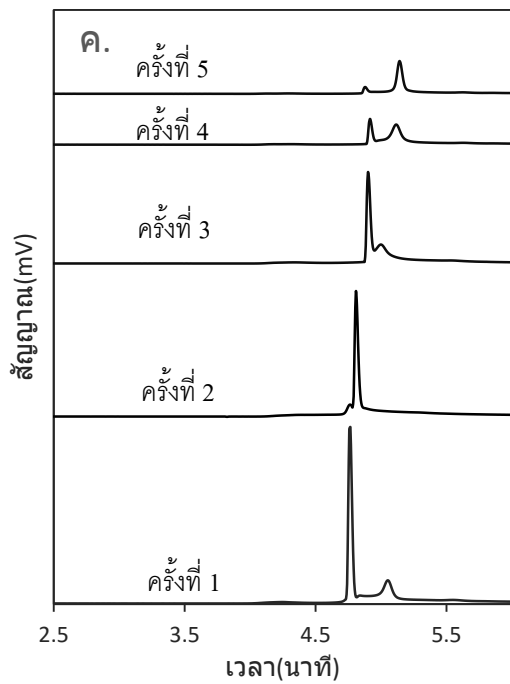
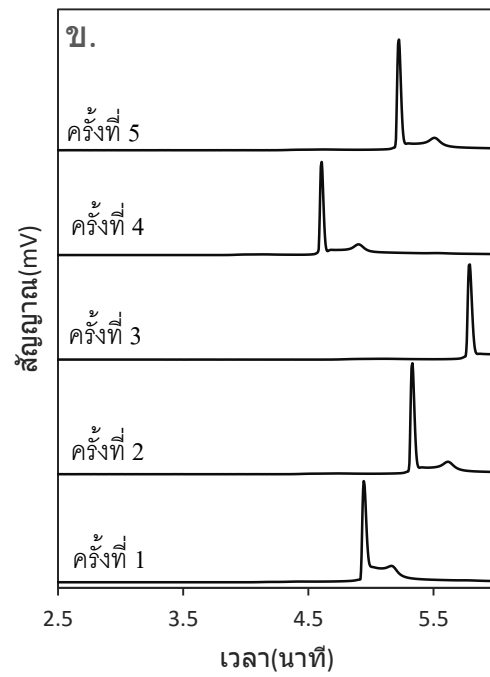
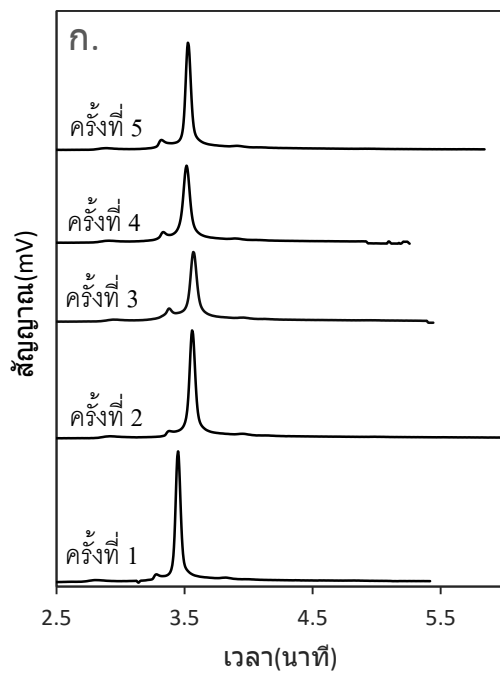
จากการทดลองเตรียมตัวอย่างของเซรัมมนุษย์ที่ได้รับการฉีดไอโอเฮกซอล และนำมาวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่เลือก ซึ่งวิธีการสกัดทั้ง 4 วิธีให้ผลการทดลองในด้านความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนดังแสดงในภาพประกอบ 16 และผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยสภาวะที่เลือกดังแสดงในโครมาโทแกรมในภาพประกอบ 17 จากผลการทดลอง การเตรียมตัวอย่างเซรัมด้วย (1) สารละลายกรดเปอร์คลอริก 5 % พบว่าในการวิเคราะห์แต่ละรอบมีค่าเวลาคงตัวของไอโอเฮกซอลที่แกว่งไม่สามารถทำการวิเคราะห์ซ้ำให้มีความเที่ยงได้ เนื่องจากความเป็นกรดที่มากของตัวสกัดตัวอย่างรบกวนต่อระบบการแยกซึ่งใช้องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ผู้วิจัยจึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ในเฟสเคลื่อนที่เป็น 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ และลดความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกเป็น 2% ตามลำดับ พบว่าไม่สามารถแก้ปัญหาได้ การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดจึงไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

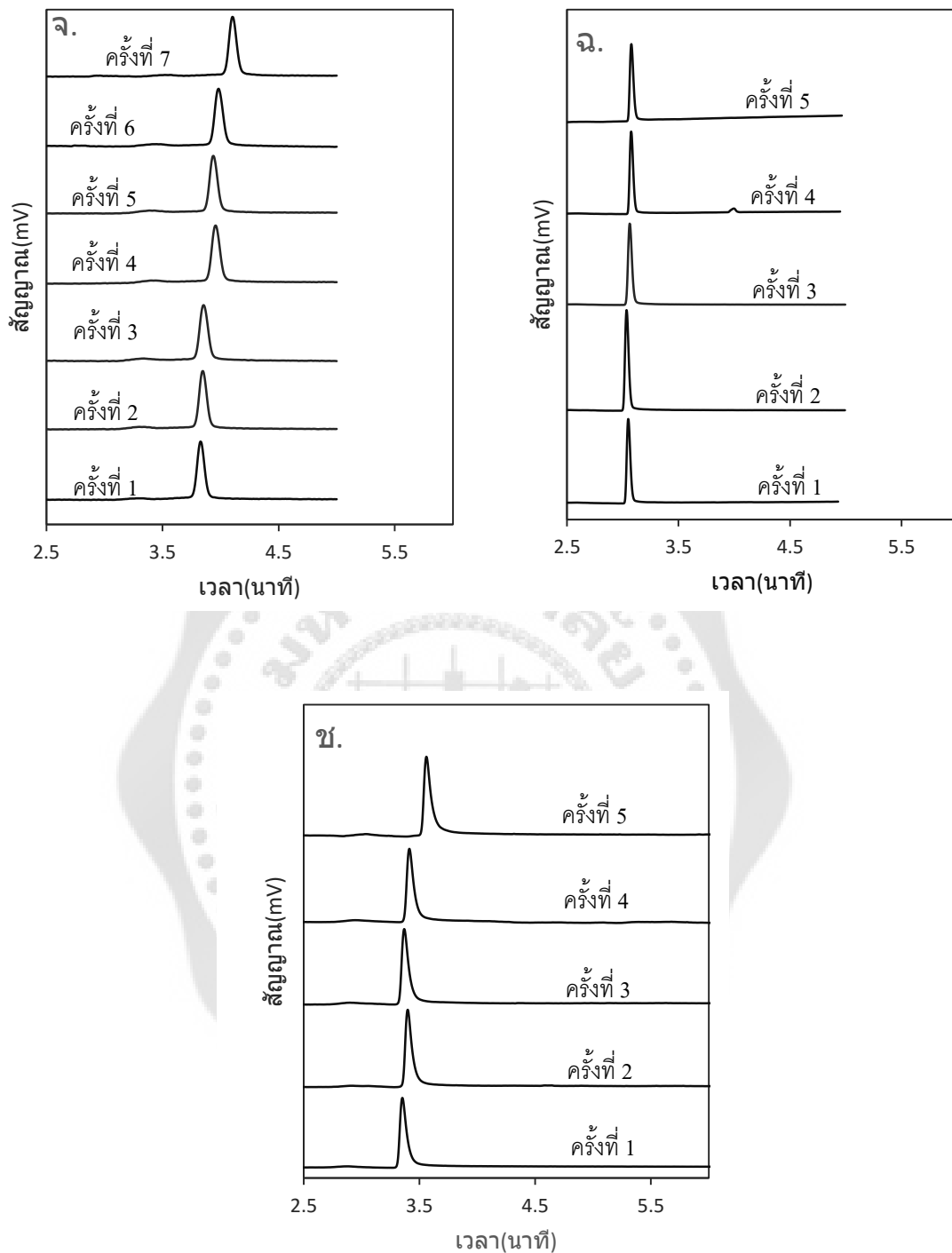
เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารละลายกรดจึงทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย (2) สารละลายอะซิโตไนไตรส์ 50%(v/v) พบว่าในการวิเคราะห์ให้ค่าเวลาคงตัวของไอโอเฮกซอลที่ต่ำลงไป และทำให้ความดันของระบบ μ -LC เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการสกัดด้วยตัวทำละลายนี้มีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างเข้มข้นได้น้อย ซึ่งมีผลทำให้คอลัมน์เกิดการอุดตันการสกัดด้วย สารละลายอะซิโตไนไตรส์ 50% จึงเป็นวิธีสกัดที่ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างเข้มข้นโดยการสกัดด้วย (3) สารละลายซิงค์ซัลเฟต 0.1 โมลาร์ พบว่าสามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีเหมือนสารละลายกรดเปอร์คลอริก 5% มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการใช้ (4) centrifuge membrane filter ซึ่งมีราคาแพง และผลการการวิเคราะห์ที่ดีค่าเวลาของไอโอเฮกซอลมีความเที่ยง ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างเข้มข้นในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล



ภาพประกอบ 16 ภาพโปรตีนที่ตกตะกอนจากการสกัด ก.สกัดด้วยกรดเปอร์คลอริก 5%, ข.สกัดด้วย อะซิโตไนไตรส์ 50%, ค.สกัดด้วยซิงค์ซัลเฟต 0.1 โมลาร์, ง.สกัดด้วย centrifuge membrane filter





ภาพประกอบ 17 โครมาโทแกรมของการสกัดตัวอย่างเซรั่ม : ก.กรดเปอร์คลอริก 5 % , ข. กรดเปอร์คลอริก 5% เปลี่ยนความเข้มข้นอะซิเตตบัฟเฟอร์เป็น 100 มิลลิโมลาร์, ค.กรดเปอร์คลอริก 5 % เปลี่ยนความเข้มข้นอะซิเตตบัฟเฟอร์เป็น 200 มิลลิโมลาร์, ง.กรดเปอร์คลอริก 2%, จ. สารละลายอะซิโตนไตรส 50%, ฉ.สารละลายซิงค์ซัลเฟต 0.1 โมลาร์, ช. centrifuge membrane filter

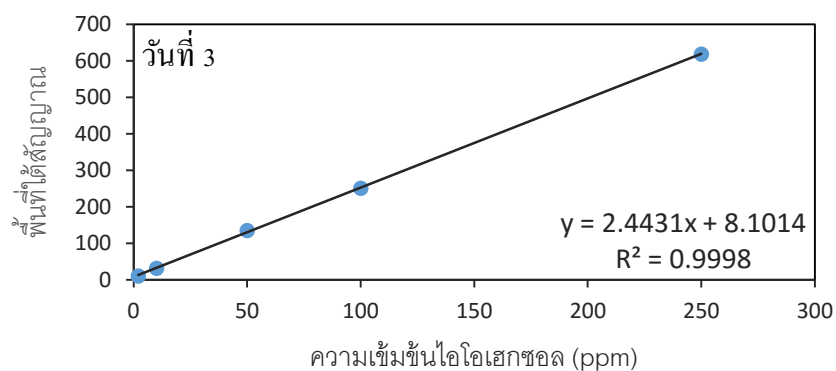
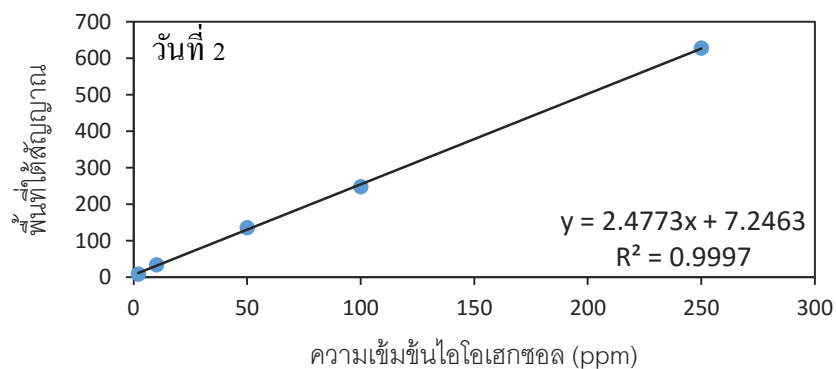
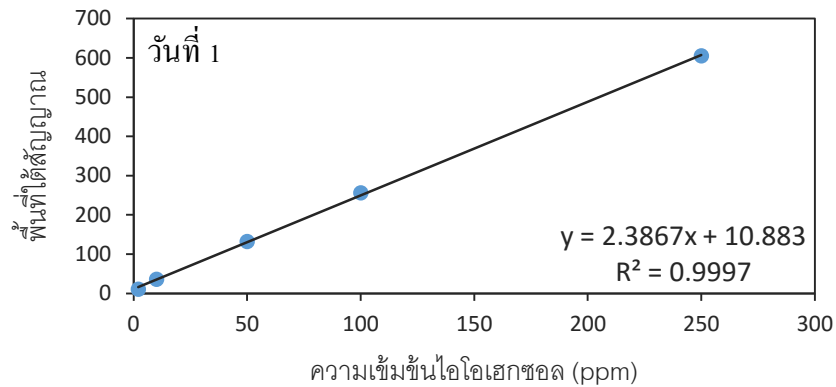
ตาราง 7 ความเที่ยงของค่าเวลาคงตัวของสารวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลด้วยวิธีสกัดต่างๆ

| วิธีการสกัด | ค่าเวลาคงตัวเฉลี่ย | SD | %RSD |
|-----------------------------------|--------------------|------|------|
| กรดเปอร์คลอริก 5% | 3.52 | 0.04 | 1.24 |
| กรดเปอร์คลอริก 5% บัฟเฟอร์ 100 mM | 5.09 | 0.47 | 9.30 |
| กรดเปอร์คลอริก 5% บัฟเฟอร์ 200 mM | 5.04 | 0.14 | 2.91 |
| กรดเปอร์คลอริก 2% | 5.21 | 0.19 | 5.24 |
| อะซิโตนไตรีส 50% | 3.93 | 0.09 | 2.40 |
| ซิงค์ซัลเฟต 0.1 โมลาร์ | 3.06 | 0.02 | 0.68 |
| centrifuge membrane filter | 3.41 | 0.07 | 2.32 |

2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

2.2.1 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานทำโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้นตามพารามิเตอร์ในหัวข้อ 2.1 โดยสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอลที่ความเข้มข้น 2 ถึง 250 ppm โดยทำการทดลองซ้ำ 3 วัน ดังภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 กราฟมาตรฐานของไอโอเฮกซอลความเข้มข้น 2-250 ppm ทั้ง 3 วัน

จากการสร้างกราฟมาตรฐานทั้ง 3 วัน พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงเข้มข้นของไอโอเฮกซอลที่ 2 ถึง 250 ppm และมีสมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ดังนี้

$$\text{วันที่ 1 สมการเส้นตรงคือ } y = 2.3867x + 10.883, R^2 = 0.9997$$

$$\text{วันที่ 2 สมการเส้นตรงคือ } y = 2.4773x + 7.2463, R^2 = 0.9997$$

$$\text{วันที่ 3 สมการเส้นตรงคือ } y = 2.4431x + 8.1014, R^2 = 0.9998$$

จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจะเห็นว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9997 ถึง 0.9998 ซึ่งมีความเป็นเส้นตรงสูงและมีความไวของวิธี (ความชันของกราฟ) ใกล้เคียงกัน วิธีที่พัฒนาสามารถวัดปริมาณไอโอเฮกซอลในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมต่อการวิเคราะห์ตัวอย่างเสริม

2.2.2 ขีดจำกัดการตรวจวัด และขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ

ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ให้ความสูงพีคเป็น 3 เท่า ของสัญญาณ noise (S/N) และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ให้ความสูงพีคเป็น 10 เท่าของสัญญาณ noise (S/N) จากผลการศึกษาหาประสิทธิภาพของระบบที่ทดลองพบว่า ให้ค่า LOD ของไอโอเฮกซอลเท่ากับ 0.44 ppm ส่วน LOQ เท่ากับ 1.47 ppm

2.2.3 ความเที่ยง

การศึกษาความเที่ยงตรงของระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นการศึกษาความคลาดเคลื่อนอันเนื่องมาจากการวิเคราะห์ ขั้นตอนการวิเคราะห์ ขั้นตอนหรือกระบวนการ ตลอดจนเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองว่ามีความเที่ยงตรงเพียงใด ในการทดลองนี้ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไอโอเฮกซอลโดยวัดจากค่าเวลาคงตัว (t_R) และพื้นที่ใต้พีคที่ความเข้มข้น 50 100 และ 250 ppm ในการหาความเที่ยงในวันเดียวกัน และความเข้มข้น 100 ppm ในการหาความเที่ยงระหว่างวัน ได้ผลการทดลองดังตาราง 8 และตาราง 9

ตาราง 8 ความเที่ยงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไอโอเฮกซอลในวันเดียวกัน (n=7)

| ครั้งที่ | 50 ppm | | 100 ppm | | 250 ppm | |
|---------------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| | เวลาคงตัว | พื้นที่ใต้พีค | เวลาคงตัว | พื้นที่ใต้พีค | เวลาคงตัว | พื้นที่ใต้พีค |
| 1 | 2.99 | 129.91 | 2.95 | 253.11 | 2.94 | 592.72 |
| 2 | 2.96 | 131.68 | 3.05 | 257.96 | 2.94 | 600.40 |
| 3 | 3.00 | 134.91 | 3.00 | 255.36 | 2.95 | 589.35 |
| 4 | 2.96 | 133.26 | 2.99 | 253.36 | 2.94 | 624.71 |
| 5 | 3.00 | 136.00 | 3.00 | 254.70 | 3.05 | 591.03 |
| 6 | 2.96 | 133.08 | 2.99 | 252.93 | 2.98 | 591.21 |
| 7 | 2.95 | 130.40 | 2.95 | 252.45 | 3.18 | 597.99 |
| ค่าเฉลี่ย | 2.97 | 132.75 | 2.99 | 254.27 | 3.00 | 598.20 |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | 0.02 | 2.25 | 0.03 | 1.93 | 0.09 | 12.36 |
| ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ | 0.72 | 1.69 | 1.14 | 0.76 | 3.00 | 2.07 |

ตาราง 9 ความเที่ยงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไอโอเฮกซอลในระหว่างวัน (n=7)

| วันที่ | ครั้งที่ | 100 ppm | |
|--------|----------|-----------|---------------|
| | | เวลาคงตัว | พื้นที่ใต้พีค |
| 1 | 1 | 2.99 | 129.91 |
| | 2 | 2.96 | 131.68 |
| | 3 | 3.00 | 134.91 |
| | 4 | 2.96 | 133.26 |
| | 5 | 3.00 | 136.00 |
| | 6 | 2.96 | 133.08 |
| | 7 | 2.95 | 130.40 |

ตาราง 9 (ต่อ)

| วันที่ | ครั้งที่ | 100 ppm | |
|--------|---------------------------------|-----------|---------------|
| | | เวลาคงตัว | พื้นที่ใต้พีค |
| 2 | 1 | 2.99 | 136.11 |
| | 2 | 3.00 | 135.81 |
| | 3 | 3.01 | 136.29 |
| | 4 | 3.05 | 137.45 |
| | 5 | 2.97 | 136.35 |
| | 6 | 2.97 | 135.40 |
| | 7 | 2.97 | 135.99 |
| 3 | 1 | 2.93 | 133.62 |
| | 2 | 2.99 | 133.18 |
| | 3 | 3.02 | 128.14 |
| | 4 | 2.90 | 125.10 |
| | 5 | 2.97 | 140.14 |
| | 6 | 2.97 | 138.26 |
| | 7 | 2.99 | 131.50 |
| | ค่าเฉลี่ย | 2.98 | 133.93 |
| | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | 0.03 | 3.56 |
| | ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ | 1.07 | 2.66 |

จากการวิเคราะห์ความเที่ยงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไอโอเฮกซอลได้ผลดังนี้ ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าเวลาคงตัวในวันเดียวกันที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 250 ppm ได้ 0.72%, 1.14% และ 3.00% ตามลำดับ ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้สัญญาณในวันเดียวกันที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 250 ppm ได้ 1.69%, 0.76% และ 2.07% ตามลำดับ ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าเวลาคงตัวในระหว่างวันที่ความเข้มข้น 100 ppm ได้ 1.07% และค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้สัญญาณในระหว่างวันที่ความเข้มข้น 100 ppm ได้ 2.66% ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลองหาความเที่ยงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไอโอเฮกซอลทั้งในวันเดียวกันและในระหว่างวันมีค่าอยู่ในช่วง 0.72% ถึง 3.00% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูง

2.2.4 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการศึกษาหาค่าร้อยละกลับคืนของการวิเคราะห์ (% recovery) โดยการเติมสารมาตรฐานไอโอเฮกซอลที่รู้ความเข้มข้นที่แน่นอนลงไปในตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์เพื่อหาค่าคืนกลับของการวิเคราะห์สารมาตรฐานนั้นๆ

ตาราง 10 ค่าร้อยละการคืนกลับของไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรั่มมนุษย์

| ตัวอย่าง ที่ | ความเข้มข้นในตัวอย่าง ค่าเฉลี่ย \pm SD(ppm) | ความเข้มข้นที่ เติมลงไป(ppm) | ความเข้มข้นที่วัดได้ ค่าเฉลี่ย \pm SD(ppm) | ร้อยละการคืน กลับ |
|-----------------|--|---------------------------------|---|----------------------|
| 1 | 37.41 \pm 0.15 | 46.56 | 85.00 \pm 0.44 | 102.21 |
| 2 | 36.76 \pm 2.70 | 46.56 | 84.86 \pm 3.28 | 103.29 |
| 3 | 51.78 \pm 0.75 | 46.56 | 100.27 \pm 0.89 | 104.13 |

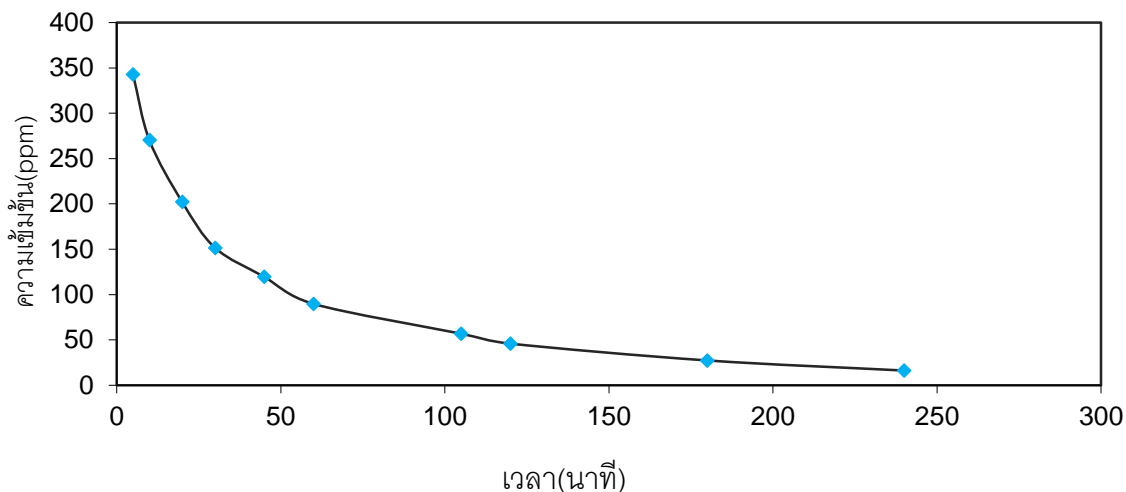
จากการทดลองหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยการหาค่าร้อยละการคืนกลับของตัวอย่างเซรั่มของมนุษย์จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าร้อยละการคืนกลับเป็น 102.21, 103.29 และ 104.13 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำสูง

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรั่มและการประยุกต์เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรั่มของมนุษย์

การวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรั่มของมนุษย์ ได้นำเซรั่มของผู้รับการตรวจคัดกรองโรคไตที่ได้รับการฉีดสารมาตรฐานไอโอเฮกซอลและทำการเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างเซรั่มที่เวลา 5 ถึง 240 นาที นับจากได้รับการฉีดไอโอเฮกซอล แล้วนำตัวอย่างเซรั่มมาทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลผลการวิเคราะห์แสดงในตาราง 11 นำผลที่ได้มาทำการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับเวลาดังแสดงในภาพประกอบ ซึ่งจะแสดงถึงอัตราการขับออกของไอโอเฮกซอลซึ่งสามารถนำไปคำนวณหาค่า GFR ได้โดยนำความเข้มข้นที่ตรวจได้ไปใช้ในสมการ two-compartment model analyses equation (Gaspari F. 1995 : 257-263) ซึ่งต้องใช้น้ำหนักส่วนสูงและอายุของผู้รับการตรวจ ตาราง 11 ผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรั่มของมนุษย์

| เวลา (นาที) | พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย \pm SD(mV^2) | ความเข้มข้นไอโอเฮกซอล (ppm) | ความเข้มข้นไอโอเฮกซอล ในตัวอย่างเซรั่ม(ppm) |
|----------------|---|--------------------------------|--|
| 5 | 233.93 \pm 0.72 | 34.30 | 342.96 |
| 10 | 186.42 \pm 0.45 | 27.03 | 270.27 |
| 20 | 141.84 \pm 0.86 | 20.21 | 202.07 |
| 30 | 108.82 \pm 1.23 | 15.16 | 151.56 |
| 45 | 87.86 \pm 0.56 | 11.95 | 119.48 |
| 60 | 68.35 \pm 0.65 | 8.96 | 89.64 |
| 105 | 46.82 \pm 0.63 | 5.67 | 56.70 |
| 120 | 39.68 \pm 1.10 | 4.58 | 45.78 |
| 180 | 27.54 \pm 1.15 | 2.72 | 27.21 |
| 240 | 20.24 \pm 1.35 | 1.60 | 16.04 |

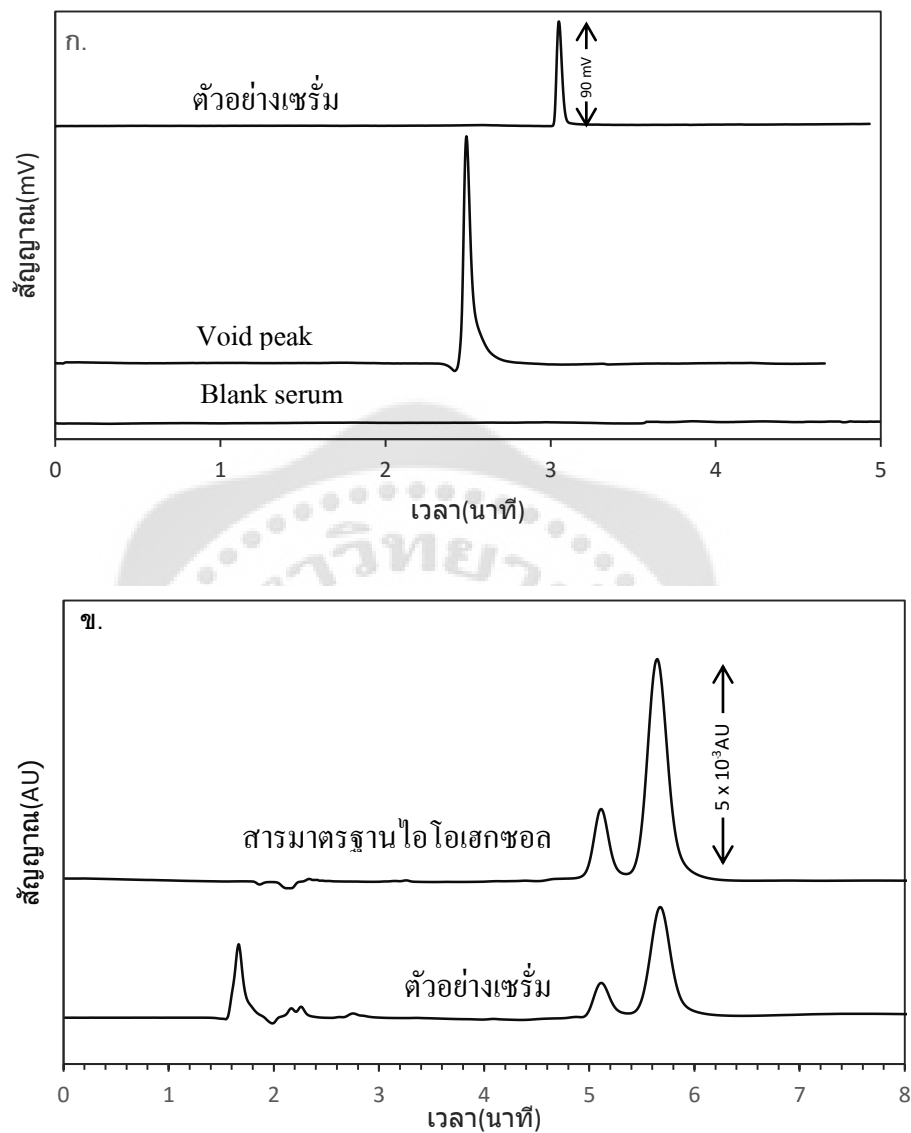


ภาพประกอบ 19 กราฟระหว่างความเข้มข้นของไอโอเฮกซอลในเซรัมกับเวลาเพื่อศึกษาอัตราการขับออกของไอโอเฮกซอลโดยการทำงานของไต

จากการกราฟระหว่างความเข้มข้นไอโอเฮกซอลและเวลาแสดงให้เห็นระดับการขับออกของไอโอเฮกซอลซึ่งตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์เป็นตัวอย่างเซรัมของมนุษย์ที่ไม่เป็นโรคไต ซึ่งลักษณะของกราฟที่ได้มีแนวโน้มในทางเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ เช่น งานวิจัยของ Soo-Youn Lee (Soo-Youn Lee.(2006) : 124-129)

3.2 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างกับวิธี HPLC

เมื่อเปรียบเทียบผลการแยกโดยวิธีที่พัฒนามกับวิธี HPLC ที่เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอล ผู้วิจัยได้ใช้คอลัมน์ nucleosil c8 เป็นเฟสคงที่ และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5 90% กับเมทานอล 10% ที่อัตราการไหล 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งผลการแยกที่ได้พบว่ามีลักษณะสัญญาณของไอโอเฮกซอลเป็น 2 สัญญาณ ซึ่งเป็นสัญญาณของไอโซเมอร์ทั้งสองของไอโอเฮกซอล ซึ่งมีค่าเวลาคงตัวที่ 5.1 และ 5.7 นาที ดังแสดงในภาพประกอบ 20 จากผลการทดลองเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างไอโอเฮกซอลด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี HPLC พบว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีลักษณะสัญญาณของไอโอเฮกซอลที่ดีกว่า จึงมีประสิทธิภาพการแยกสูงกว่าโดยวัดจากค่าทฤษฎีเพลตของโครมาโทกราฟี (N) ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ 48226 และวิธี HPLC ที่ทำการวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 2262 นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาจะมีค่า N มากกว่า 21 เท่า ยังใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่า 2 เท่า



ภาพประกอบ 20 โครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างวิธีที่พัฒนาและวิธี HPLC : ก. โครมาโทแกรมของ ไอโอสอกซอลในเทคนิค μ -LC (void peak วัดโดยใช้อะซิโตไนไตร์สตรวจวัดที่ 200 นาโนเมตร), ข. โครมาโทแกรมในเทคนิค HPLC

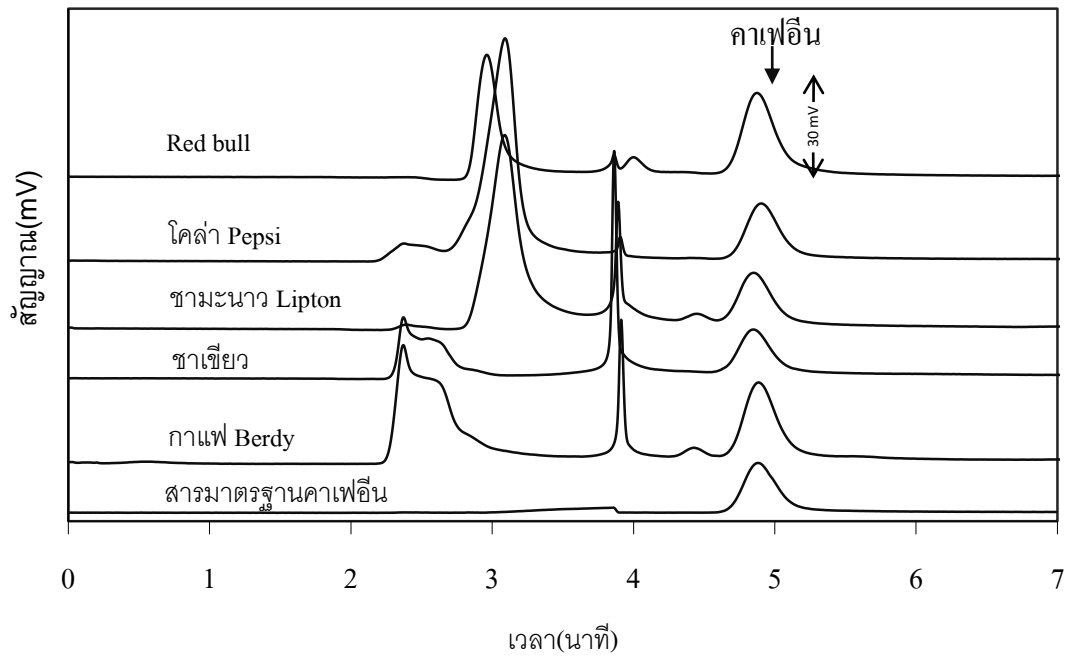
3.3 วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม

เพื่อขยายขอบเขตของระบบที่พัฒนาขึ้น ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผู้วิจัยได้เลือกสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้คือ ใช้คอลัมน์ MAA-EDMA เป็นเฟสคงที่ และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 อัตราส่วน 80% กับอะซิโตนไตรัส 20% ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตร ต่อนาที ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 271 นาโนเมตร สามารถวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ได้ในเวลาประมาณ 5 นาที

วิธีวิเคราะห์คาเฟอีนที่พัฒนาขึ้นได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีในพารามิเตอร์ต่อไปนี้ กราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20 ถึง 200 ppm ซึ่งมีสมการเส้นตรง $y = 11.571x + 39.999$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9993 ชี้ดจำกัดการตรวจวัด และชี้ดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ เท่ากับ 0.22 และ 0.72 ppm ตามลำดับ มีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สำหรับค่าเวลาดังกล่าวและพื้นที่ใต้สัญญาณในวันเดียวกันเท่ากับ 0.98% และ 1.10% ในระหว่างวันมีค่าเท่ากับ 1.51% และ 1.50% และมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 93.99% ถึง 102.92%

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ แสดงในตาราง 12 และโครมาโทแกรมในภาพประกอบ 21 แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ได้อย่างถูกต้อง ตาราง 12 การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่ม

| ตัวอย่าง | ความเข้มข้นคาเฟอีน (g/mL) | | ค่าร้อยละการคืนกลับ |
|----------------------------------|---------------------------|--------|---------------------|
| | ระบุในฉลาก | ตรวจพบ | |
| กาแฟ(Berdy) | 850 | 657 | 97.22 |
| ชาเขียว | 88 | 68 | 101.10 |
| ชามะนาว(Lipton) | 90 | 77 | 93.99 |
| โคล่า(Pepsi) | - | 97 | 102.92 |
| เครื่องดื่มชูกำลัง (red bull) | 344 | 280 | 100.66 |



ภาพประกอบ 21 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานคาเฟอีนและตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณของไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมของมนุษย์และคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มด้วยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรควบคู่กับการใช้วัสดุสังเคราะห์โมโนลิธ พบว่าระบบ μ -LC ที่สร้างขึ้นสามารถทำงานได้ ตามหลักการของโครมาโทกราฟีซึ่งมีข้อดีกว่าเครื่อง HPLC แบบดั้งเดิมในหลายด้าน ได้แก่ การใช้ปริมาณของเฟสเคลื่อนที่และตัวอย่างในปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งในเฟสเคลื่อนที่มีองค์ประกอบหลักเป็นตัวทำละลายอินทรีย์จึงเป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อม ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างสั้นกว่า และเฟสคงที่เป็นวัสดุโมโนลิธซึ่งสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองและมีต้นทุนต่ำ

ในการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ของระบบ μ -LC ที่สร้างขึ้น เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมมนุษย์ เมื่อนำพื้นที่ใต้สัญญาณกับค่าความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานของไอโอเฮกซอล พบว่ากราฟมาตรฐานทั้ง 3 วันของไอโอเฮกซอลมีสมการเส้นตรงคือ $y = 2.3867x + 10.883$, $y = 2.4773x + 7.2463$ และ $y = 2.4431x + 8.1014$ ตามลำดับ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) 0.9997, 0.9997 และ 0.9998 ตามลำดับ มีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สำหรับค่าเวลาคงตัวและพื้นที่ใต้สัญญาณในวันเดียวอยู่ในช่วง 0.72 ถึง 3.00 เปอร์เซ็นต์ ในระหว่างวันมีค่าเท่ากับ 1.07 ถึง 2.66 เปอร์เซ็นต์ มีค่า LOD เท่ากับ 0.44 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน LOQ เท่ากับ 1.47 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในระดับที่สามารถตรวจวัดไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมได้

ในงานวิจัยในครั้งนี้นำตัวอย่างเซรัมของมนุษย์ 3 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลด้วยระบบ μ -LC ที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาค่าร้อยละของการคืนกลับโดยการเติมสารมาตรฐานของไอโอเฮกซอลลงในตัวอย่างทั้ง 3 ที่ความเข้มข้น 46.56 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น ผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 102.21 ถึง 104.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแม่นยำสามารถวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมได้อย่างถูกต้อง

วิธีวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเข้มข้นของมนุษย์ที่พัฒนาเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก มีการเตรียมสารตัวอย่างด้วยวิธีที่ง่าย ประหยัด ได้ผลการวิเคราะห์อย่างรวดเร็วได้ผลที่เที่ยงตรงน่าเชื่อถือ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลด้วยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวระดับไมโครลิตรควบคู่กับการใช้วัสดุสังเคราะห์โมโนลิธสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดการขับออกของไอโอเฮกซอลได้จริง สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาในการตรวจคัดกรองโรคไตได้ในอนาคต และผู้วิจัยนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี มีความเที่ยงและความถูกต้องสูง แสดงให้เห็นว่าระบบ μ -LC สามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความหลากหลาย

ข้อเสนอแนะ

ระบบ μ -LC เป็นระบบที่ประกอบขึ้นเอง และต้องมีการสังเคราะห์โมโนลิธคอลัมน์ ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทำการทดลอง





บรรณานุกรม

- A. Hazotte, L. Danielle, C Pierre. (2007). High-temperature micro liquid chromatography for lipid molecular species analysis with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*. 1140: 131–139.
- AS. Levey, KU. Eckardt, Y. Tsukamoto, et al. (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International*. 67(6): 2089-2100.
- B. Francesco, LL. Kathryn, WB. Justin, H. Anna. (2008). Rapid analysis of iodinated X-ray contrast media in secondary and tertiary treated wastewater by direct injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1213: 200-8.
- C. Danilo. (2010). Handbook of HPLC second editor. CRC Press.
- C. Legido-Quigley, ND. Marlin, M. Virginie, et al. (2003). Advances in capillary electrochromatography and micro- high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science. *Electrophoresis*. 24: 917-44.
- C. Polson, P. Sarkar, B. Incedon, V. Raguvaran, R. Grant. (2003). Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 785: 263–275.
- EL. Knight, JC. Verhave, D. Spiegelman, et al. (2004). Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney International*. 65(4): 1416-1421.
- F. Don, AD. Sica, F. Itaf, et al. (2005). Simple HPLC–UV method for determination of iohexol, iothalamate, p-aminohippuric acid and n-acetyl-p-aminohippuric acid in human plasma and urine with ERPF, GFR and ERPF/GFR ratio determination using colorimetric analysis. *Journal of Chromatography B*. 826: 267–272

- F. Gaspari, N. Perico, P. Ruggenti, et al. (1995). Plasma clearance of nonradioactive iohexol as a measure of glomerular filtration rate. *Journal of the American Society of Nephrology*. 6(2): 257-263.
- FM. Okanda, ZE. Rassi. (2005). Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases Preparation of neutral stearyl- acrylate monoliths and their evaluation in capillary electrochromatography of neutral and charged small species as well as peptides and proteins. *Electrophoresis*. 26:1988-95.
- G. Xin, GL. Liang, LQ. Luo, et al. (2000). Determination of iohexol in serum by X-ray fluorescence spectrometry. *Fenxi Kexue Xuebao*. 16: 131-3.
- GJ. Schwartz, SL. Furth. (2007). Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*.
- GS. Andreas, C. Ligon Jr., WH. Christian, et al. (2009). Monolithic poly(1,2-bis(p-vinylphenyl)ethane)capillary columns for simultaneous separation of low and high molecular-weight compounds. *Journal of Separation Science*. 32: 2510–20.
- GZ. Zhu, H. Yuan, Z. Liang, et al. (2007). Recent development of monolithic materials as matrices in microcolumn separation systems. *Journal of Separation Science*. 30: 792-803.
- H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Ishizuka, et al. (1996). Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. 68: 3498-50.
- J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, H. Fein. (2003) Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors*. 3: 276-284.
- K. Cabrera, G. Wieland, D. Lubda, et al. (1998). SilicaROD™-A new challenge in fast high-performance liquid chromatography separations. *Trends in Analytical Chemistry*. 17: 50-3.
- K. Nakanishi, K. Soga. (1991). Phase separation in gelling silica-organic polymer solution: systems containing poly(sodium styrenesulfonate). *Journal of the American Ceramic Society*. 74: 2518-30.

- L. Dean, S. Frantisek, M.J. Fréchet. (2004). Photopolymerized monolithic capillary columns for rapid micro high-performance liquid chromatographic separation of proteins. *Journal of Chromatography A*. 1051: 53–60.
- L. Soo-Youn, C. Mi-Ryung. (2006). Determination of iohexol clearance by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal of Chromatography B*. 839: 124–9.
- MA. Thomas, TC. Larry. (2009). Ultrapformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for iohexol in human serum. *Clinical Chemistry*. 55(6): 1196–202.
- MC. Denis, K. Venne, D. Lesiege, et al. (2008). Development and evaluation of a liquid chromatography–mass spectrometry assay and its application for the assessment of renal function. *Journal of Chromatography A*. 1189: 410-6.
- M. Kubin, P. Spacek, R. Chromecek. (1967). Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 32: 3881.
- MS. De Baere, P. Smets, N. Finch, et al. (2012). Quantitative determination of exo- and endo- iohexol in canine and feline samples using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 61: 50–6.
- P. Anna-Maries, G Martin Schmid, P. Tamara, et al. (2004). Chiral separation of natural and unnatural amino acid derivatives by micro-HPLC on a Ristocetin A stationary phase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods. Methods*. 61: 11–21.
- P. Luigi, G. Rossella, C. Alessia, et al. (2004). Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC–ion trap MS and head space-GC–MS methods. *Journal of Chromatography B*. 812: 373–7.
- R. Kay, C. Barton, L. Ratcliffe, et al. (2008). Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20: 3255–3260.

- RS. Soman, H. Zahir, F. Akhlaghi. (2005). Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 816: 339-43.
- S. Andrew, T. Michael, B. Nigel, et al. (2014). Application of an isocratic methanol- based HPLC method for the determination of iohexol concentrations and glomerular filtration rate in patients with cirrhosis. *Annals of Clinical Biochemistry*. 51: 80-8.
- S. Rohit, Z. Hamim, A. Fatemeh. (2005). Chiral Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 816: 339-43.
- SE. Back, E. Krutzen, P. Nilsson-Ehle. (1988). Contrast media as markers for glomerular filtration: a pharmacokinetic comparison of four agents. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 48(3): 247-53.
- SE. Back, P. Masson, P. Nilsson-Ehle. (1988). A simple chemical method for the quantification of the contrast agent iohexol, applicable to glomerular filtration rate measurements. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 48:825-9.
- V. Meucci, A. Gasperini, G. Soldani, G. Guidi, M. Giorgi. (2004). A new HPLC method to determine glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in conscious Dogs by Single Intravenous administration of iohexol and p- aminohippuric acid, *Journal of Chromatographic Science*. 42: 107-11.
- VR. Michael, MB. Vardaman, CM. Lisa, KS. Zakariya. (1996). Capillary electrophoresis for the determination of glomerular filtration rate using nonradioactive iohexol. *American Journal of Kidney Diseases*. 28: 173-7.
- WE. Braselton, KJ. Stuart, JM. Kruger. (1997). Measurement of serum iohexol by determination of iodine with inductively coupled plasma- atomic emission spectroscopy. *Clinical Chemistry*. 43: 1429- 35.

- Y. Fan, YQ. Feng, SL. Da, et al. (2004). In-tube solid-phase microextraction with poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for direct high- performance liquid chromatographic determination of ketamine in urine samples. *Analyst*. 129: 1065-9.
- Z. Jiang, N.W. Smith, P.D. Ferguson, M.R. Taylor. (2007). Hydrophilic interaction chromatography using methacrylate- based monolithic capillary column for the separation of polar analytes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70: 39-45.





ประวัติย่อผู้วิจัย

| | |
|-----------------|---|
| ชื่อ – สกุล | นายทศพร เฉลิมสุขวัฒนาการ |
| วันเดือนปีเกิด | 22 ธันวาคม 2533 |
| สถานที่เกิด | บ้านเลขที่ 73 ซอยลาดพร้าว 130 แขวงคลองจั่น เขตบางกะปิ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10240 |
| ประวัติการศึกษา | |
| พ.ศ. 2551 | จากโรงเรียนบางกะปิ จังหวัดกรุงเทพมหานคร |
| พ.ศ. 2554 | วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร |
| พ.ศ. 2558 | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร |

