บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อะคริลาไมด์

2.1.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของสารอะคริลาไมด์

อะคริลาไมด์ มีชื่อเรียกอื่นๆได้แก่ 2-โพรพินาไมด์ (2-propenamide) เอธิลีนคาร์โบซา-ไมด์ (ethylenecarboxamide) อะคริลิก แอซิด เอไมด์ (acrylic acid amide) ไวนิล เอไมด์ (vinyl amide) และโพรพิโนอิก แอซิด เอไมด์ (propenoic acid amide) มีมวลโมเลกุล 71.08 ดาลตัน สูตรโมเลกุล C_3H_5NO เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ลักษณะเป็นผลึกของแข็ง ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลว 84.5 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เมทานอล เอทานอล อะซิโตน อะซิโทไนไตร์ และเอทิลอะซิเตต แต่ละลายได้น้อยในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน เฮปเทน และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Zhang, 2007)

2.1.2 ความเป็นพิษของอะคริลาไมด์

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอะคริลาไมด์กับมะเร็งในสัตว์ทดลองของหน่วยงานวิจัยมะเร็งระหว่างประเทศ (International Agency for Research on Cancer: IARC) พบว่ามีความเสี่ยงของอะคริลาไมด์ต่อการเกิดมะเร็งได้ในสัตว์ทดลอง จึงได้จัดให้สารอะคริลาไมด์เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งในคน (กลุ่ม 2A) (Terry, 2007) ซึ่งการแบ่งกลุ่มของสารก่อมะเร็งโดย IARC แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การแบ่งกลุ่มสารก่อมะเร็ง

กลุ่ม	ระดับการเกิด
1	เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์
2A	อาจจะทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์
2B	มีความเป็นไปได้ที่ทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์
3	ไม่สามารถระบุได้ว่าทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์

ที่มา: IARC (2004)

นอกจากนี้ทาง Joint FAO/WHO Food Standards Program Codex Committee on Food Additive and Contaminants: JECFA (2007) ได้กำหนดค่า LD_{50} ของอะคริลาไมด์ที่ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งความเป็นพิษและอันตรายของอะคริลาไมด์ สามารถสรุปได้ดังนี้

2.1.2.1 พิษต่อระบบประสาท Lopachin (2005) ได้ศึกษาความเป็นพิษของอะคริลาไมด์ในสัตว์ทดลองและมนุษย์ พบว่ามีผลทำให้เกิดอาการกล้ามเนื้อทำงานไม่ประสานกัน ส่งผลให้กล้ามเนื้อส่วนปลายอ่อนแรง มือ-เท้า ชา เนื่องจากอะคริลาไมด์มีผลต่อระบบประสาท ทำให้ปลายประสาทแอกซอน (axon) ทำงานเสื่อมลง

2.1.2.2 การก่อมะเร็ง Claey (2007) ได้ทำการศึกษาในหนูทดลองที่ให้สารอะคริลาไมด์ พบการเกิดเนื้องอกในอวัยวะต่างๆ เช่น ไทรอยด์ (thyroid) และแอดรีนาล (adrenal) สำหรับในมนุษย์ จากผลการศึกษาระบาดวิทยาของผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสารนี้เป็นเวลานาน พบว่ามีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งเพิ่มขึ้น แต่ยังไม่มีหลักฐานที่แน่นอนว่าการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารอะคริลาไมด์ จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง (Mucci, 2005)

สำหรับค่าปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษของอะคริลาไมด์ (no observe adverse effect level: NOAEL) เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน และปริมาณต่ำสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ (lowest observe adverse effect level: LOAEL) เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน (Health Canada, 2007) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารอะคริลาไมด์เป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำ สามารถดูดซึมได้อย่างรวดเร็วในระบบทางเดินอาหาร จึงถูกขับออกอย่างรวดเร็วทางปัสสาวะ ทำให้สารอะคริลาไมด์ปริมาณครึ่งหนึ่งของปริมาณที่เข้าสู่ร่างกายถูกขับออกภายในเวลา 2 ชั่วโมง (สถาบันอาหาร, 2549)

2.1.3 การเกิดสารอะคริลาไมด์ในอาหาร

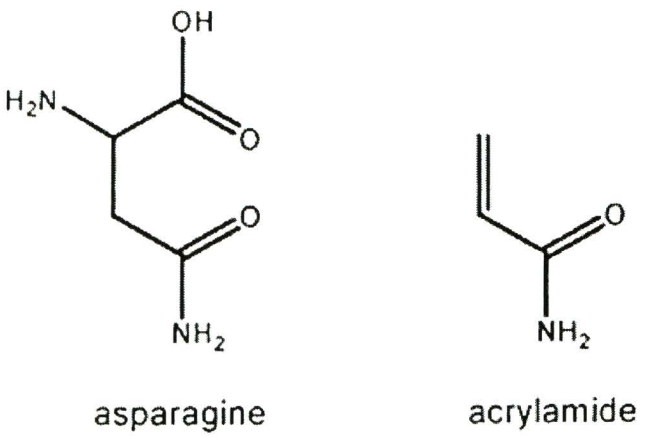
2.1.3.1 สารตั้งต้นของอะคริลาไมด์

เดือนเมษายน ค.ศ.2002 ณ การประชุมวิทยาศาสตร์นานาชาติของประเทศสวีเดน ได้มีรายงานผลงานวิจัยเรื่องการก่อตัวของสารอะคริลาไมด์ในอาหาร ระบุว่าเกิดจากกรด อะมิโนแอสพาราจีน และน้ำตาลรีดิวซ์ ผ่านทางปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่อุณหภูมิมากกว่า 100 องศาเซลเซียส (EFSA, 2007)

Yaylayan (2003) ได้ทำการทดลองสังเคราะห์อะคริลาไมด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาของกรดอะมิโนแอสพาราจีนกับน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่าการเกิดอะคริลาไมด์ในปริมาณที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับว่าเป็นน้ำตาลชนิดโมโนแซคคาไรด์ หรือไดแซคคาไรด์ นอกจากนี้น้ำตาลที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลซูโครส (sucrose) สามารถเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดอะคริลาไมด์ได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากเมื่อได้รับความร้อนแล้วน้ำตาลซูโครส สามารถแตกตัวได้เป็นกลูโคสกับ ฟรุกโตสได้

พนาวัลย์ (2550) ได้ศึกษาจากการใช้ไอโซโทปคาร์บอนของกลูโคสและกรดอะมิโนแอสพาราจีน แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลไม่ใช่โครงสร้างหลักของโมเลกุลอะคริลาไมด์ นอกจากนี้พบว่าอะตอมไนโตรเจนของอะคริลาไมด์มาจากกลุ่มเอไมด์ (amide) ของแอสพาราจีน จึงระบุได้ว่ากรดอะมิโนแอสพาราจีนเป็นสารตั้งต้นหลัก (precursor) ในการเกิดอะคริลาไมด์ โดยมีข้อสนับสนุนคือ โมเลกุลของกรดอะมิโนแอสพาราจีนมีโครงสร้างใกล้เคียงกับโมเลกุลของอะคริลาไมด์ ตามรูปที่ 2.1 เมื่อกรดอะมิ

โนแอสพาราจีนถูกกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) และแอมโนเนีย (deamination) จะได้สารอะคริลาไมด์



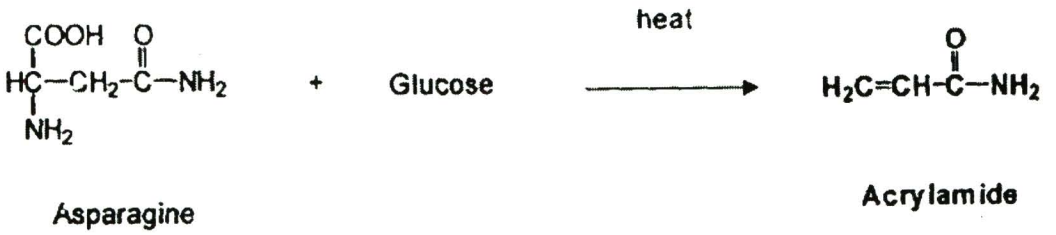
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดอะมิโนแอสพาราจีนและอะคริลาไมด์

ที่มา: พนาวัลย์ (2550)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดอะคริลาไมด์ในอาหาร นอกจากสารตั้งต้นของปฏิกิริยาซึ่งได้แก่ กรดอะมิโนแอสพาราจีน และน้ำตาลรีดิวซ์แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิดอะคริลาไมด์ ได้แก่ อุณหภูมิและเวลาในการปรุงหรือแปรรูปอาหาร การเก็บวัตถุดิบ สภาวะอื่นๆ หรือพารามิเตอร์ในการเกิดปฏิกิริยา เช่น ค่า pH ปริมาณน้ำ พื้นที่ผิว รวมทั้งบริเวณที่เกิดสีน้ำตาล เป็นต้น (นิธิยา, 2545)

2.1.3.2 กลไกการเกิดอะคริลาไมด์ในอาหาร

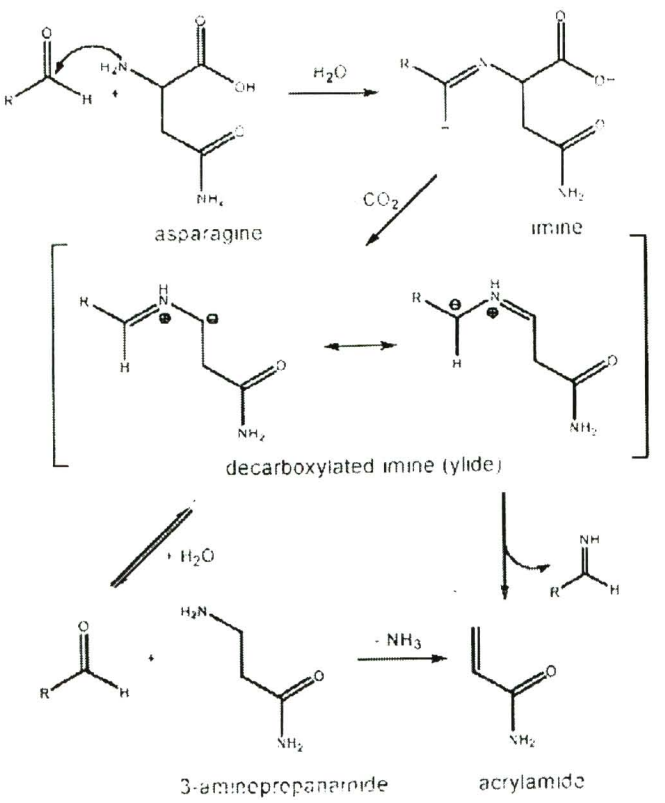
มีงานวิจัยหลายชิ้นยืนยันการเกิดอะคริลาไมด์ว่าเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด อย่างแน่นอน เช่น งานวิจัยของ Stadler และคณะ (2002) แสดงให้เห็นว่าการสลายตัวด้วยความร้อน (pyrolysis) ของกรดอะมิโนแอสพาราจีนกับกลูโคส (หรือน้ำตาลชนิดอื่นๆ) ทำให้เกิดอะคริลาไมด์ ดังรูปที่ 2.2 โดยอัตราเร็วของปฏิกิริยาดังกล่าวสูงขึ้นประมาณ 1,700 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเกิดอะคริลาไมด์จากการสลายตัวด้วยความร้อนของกรดอะมิโนแอสพาราจีนเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 2.2 กลไกการเกิดอะคริลาไมด์จากกรดอะมิโนแอสพาราจีนกับกลูโคส

ที่มา: Stadler และคณะ (2002)

Zyzak และคณะ (2003) พบว่ากลไกของการเกิดอะคริลาไมด์จากปฏิกิริยาของกรดอะมิโนแอสพาราจีนกับสารประกอบที่มีหมู่คาร์บอนิล เมื่อได้รับความร้อนจะทำให้เกิด Schiff base และเมื่อกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ออกจาก Schiff base จะสามารถเกิดอะคริลาไมด์ได้โดยตรงจากปฏิกิริยาการสลายตัวของอีมีน (imine) หรือเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ของ Schiff base ทำให้เกิด 3-แอมมิโนโพรพิโอนาไมด์ (3-aminopropionamide) ที่สลายให้แอมโมเนียออกมาเมื่อได้รับความร้อน ได้เป็นอะคริลาไมด์ ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กลไกการเกิดอะคริลาไมด์จากสมมติฐานของ Zyzak และคณะ

ที่มา: Zyzak และคณะ (2003)

2.1.4 ปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่มีในอาหารและปริมาณที่คนได้รับจากอาหาร

ผู้บริโภคทั่วไปจะได้รับสารอะคริลาไมด์เข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคอาหาร โดยพบค่าปริมาณการบริโภคเฉลี่ย 0.2 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน และการบริโภคที่ปริมาณสูงสุด 4 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน นอกจากนี้ยังมีการคาดการณ์อีกว่าเด็กอาจได้รับปริมาณอะคริลาไมด์เข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคอาหารมากกว่าผู้ใหญ่ 2-3 เท่า เนื่องจากพฤติกรรมการบริโภคของเด็กที่นิยมรับประทานขนมขบเคี้ยวที่แตกต่างจากผู้ใหญ่ (EFSA, 2007) ซึ่งปริมาณสารอะคริลาไมด์เฉลี่ยที่ได้รับจากการรับประทานอาหารประจำวันที่นำเสนอโดยหน่วยงานต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบปริมาณการได้รับสารอะคริลาไมด์จากการบริโภคอาหารประจำวันที่นำเสนอโดยหน่วยงานต่างๆ

หน่วยงาน/ประเทศ	ปริมาณการได้รับสารอะคริลาไมด์จากการบริโภคอาหารประจำวัน (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน)*
Food and Agriculture Organization (FAO) / World Health Organization (WHO)	0.3-0.8
European Union Scientific Committee on Food (EU SCF)	0.2-0.4
Bundesdesinstitut fur Risikobewertung (BfR), Germany. (Germany Federal Institute for Risk Assment)	1.1-3.4
Swiss Federal Office of Public Health (FOPH), Switzerland	0.28
The Norwegian Food Agency (NFA), Norway	0.32-1.35
Agency Francaise de Security des Aliment (AFSSA), France. (French Food Safety Agency)	0.5-2.9
The Swedish Nation Food Administration (SNFA), Sweden	0.45-1.03
The Nation Food Consumption Survey (NFCS), Netherlands	0.48-1.1
Untied State of America (USA)	0.43-2.31
Untied Kingdom Food Standards Agency (UK FSA)	0.3-1.8
Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA)	1-4

* คือ การประเมินจากการบริโภคเฉลี่ย

ที่มา: Dybling และ Sanner (2003)

จากข้อมูลในตารางที่ 2.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า LD_{50} ของอะคริลาไมด์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ผู้บริโภคมีโอกาสเสี่ยงที่จะได้รับปริมาณสารอะคริลาไมด์จากการบริโภคอาหารในระดับที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ ดังในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ระดับความเป็นพิษของค่า LD_{50} ที่ปริมาณต่างๆ

ค่า LD_{50}	ระดับความเป็นพิษ
$LD_{50} < 1$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	มีความเป็นพิษร้ายแรงมาก (extremely toxic)
$1 < LD_{50} < 50$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	มีความเป็นพิษร้ายแรง (highly toxic)
$50 < LD_{50} < 500$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	มีความเป็นพิษปานกลาง (moderate toxic)
$0.5 < LD_{50} < 5$ กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	มีความเป็นพิษเล็กน้อย (slightly toxic)
$5 < LD_{50} < 15$ กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	ไม่เป็นสารพิษ (practical non-toxic)

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ (2553)

2.2 ลิคควิดโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง (High Pressure Liquid Chromatography: HPLC)

2.2.1 หลักการพื้นฐาน

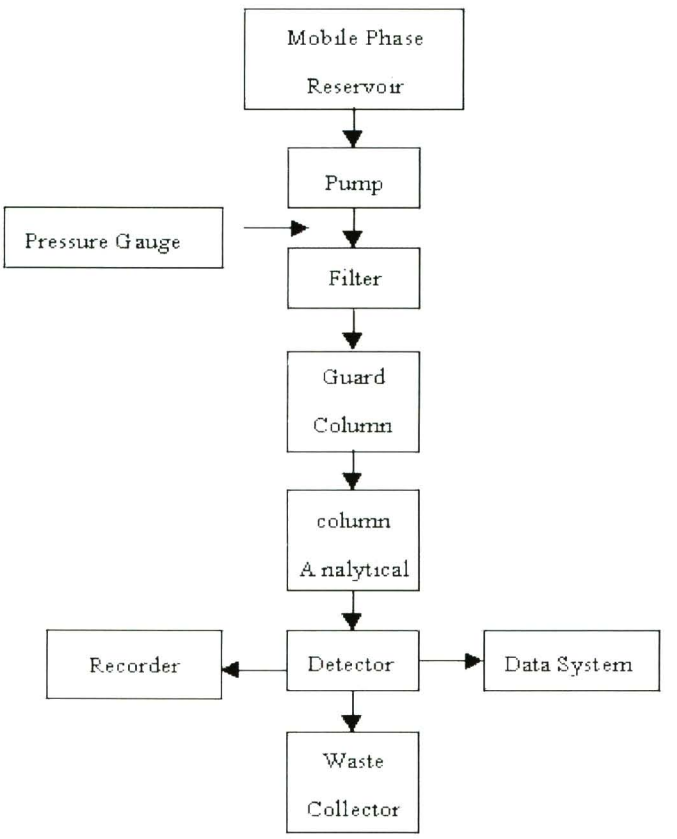
HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบในเฟสคงที่ (stationary phase) ของคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับตัวตรวจวัดสัญญาณจะสามารถตรวจวัดสารที่แยกออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ นิยมใช้ทดสอบสารประกอบที่ระเหยยาก (non volatile compounds) หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight compounds)

เทคนิคการแยกสารผสมโดยใช้ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) ดูดของเหลวหรือตัวทำละลาย ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคของเฟสคงที่ภายในคอลัมน์ สารผสมจะถูกแยกเป็นสารเดี่ยวที่เคลื่อนออกมาจากคอลัมน์ในเวลาต่างกัน เมื่อผ่านเข้าเครื่องตรวจวัดที่มีหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณในรูปแบบสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัว สัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผลออกมาในรูปโครมาโทแกรม (chromatogram) ประกอบด้วยพีก (peak) ของสารต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม (ดังรูปที่ 2.4) ด้วยหลักการดังกล่าว HPLC จึงเป็นเครื่องมือที่สามารถทดสอบสารปริมาณน้อยๆในระดับมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมได้เป็นอย่างดี ทำให้เกิดการแยกอย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาอันสั้น จึงจำเป็นต้องหาสภาวะดีที่สุดสำหรับการแยกสาร (คณิตา, 2542)

2.2.2 ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่อง HPLC (รูปที่ 2.5)

2.2.2.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase reservoir)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน preparative HPLC ความจุของขวดควรจะมากกว่านี้ และจะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ จุดประสงค์ของการไล่อากาศ คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ การไล่แก๊สจะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นสารมีขั้ว (polar solvents) เครื่อง HPLC ของบางบริษัทสามารถใช้กับระบบที่ไม่ต้องไล่แก๊สก่อนได้



รูปที่ 2.4 หลักการทำงานของเครื่อง HPLC

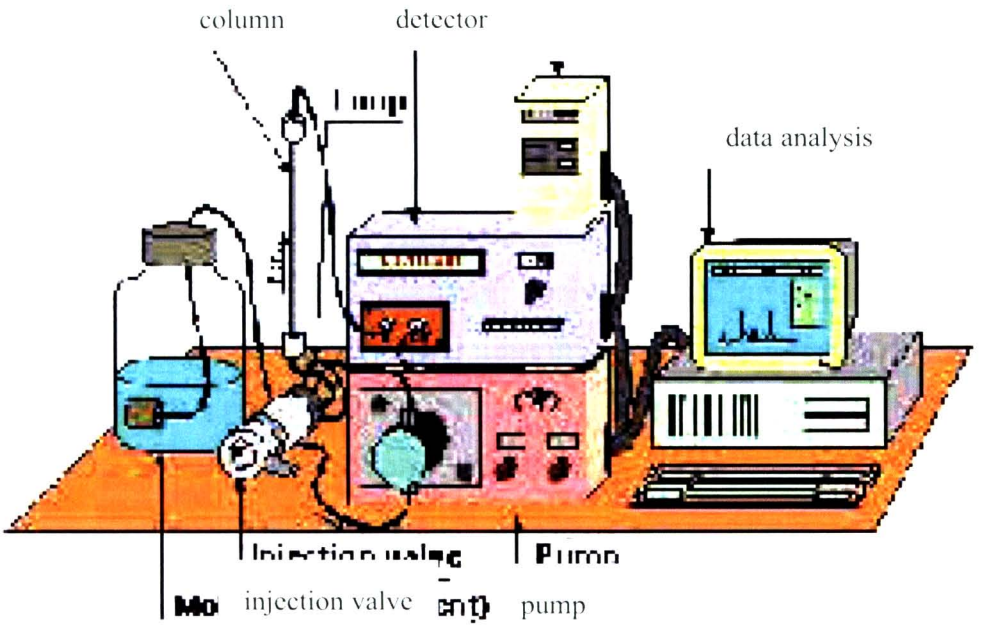
ที่มา: ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ (2553)

2.2.2.2 เครื่องปั๊มสารละลายความดันสูง

เนื่องจาก HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลที่ว่านี้จะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆและคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป โดยปั๊มสามารถแบ่งออกเป็น2 ชนิด ได้แก่

1) Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

2) Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่



รูปที่ 2.5 ส่วนประกอบต่างๆของเครื่อง HPLC

ที่มา: ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ (2553)

หลักการเลือก pumping system เพื่อใช้กับ HPLC นั้นควรพิจารณาจากสมบัติต่อไปนี้

1) ปั๊มและส่วนประกอบควรจะทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนต่อ ตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทั้งนี้รวมทั้งท่อ fittings และ flow cell เช่น ทำด้วยเหล็กไร้สนิมคุณภาพสูง polytetrafluoro- ethylene (PTFE) ruby และ sapphire

2) ควรจะต้องสามารถปั๊มเฟสเคลื่อนที่ ที่มีปริมาณมากๆได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการขัดข้อง

3) สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000-6,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพื่อปั๊มให้เฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ขนาดเล็ก ยาวขนาด 30 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ และอย่างน้อยต้องให้ความดันได้ถึงขนาด 500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

4) สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นอย่างน้อยและคงที่

5) ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องไม่เกิน 1-2 เปอร์เซ็นต์

6) ควรจะมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อน

7) ต้องไม่มีพัลส์ (pluse) หรือมีตัวที่ใช้ลดพัลส์ (pluse damper) หรือ ไม่ทำให้เกิด detector noise

2.2.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (pressure monitoring devices)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดความดัน อยู่ระหว่างทางเข้าของคอลัมน์กับปั๊ม อุปกรณ์ตรวจวัดนี้จะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ เป็นสิ่งที่บ่งบอกว่ามีการ อุดตันหรือไม่ หรือการทำงานของปั๊มล้มเหลวหรือไม่ นอกจากนี้ การทราบความดันของเครื่องจะช่วยทำให้การปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ เป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด

2.2.2.4 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำ gradient elution

สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

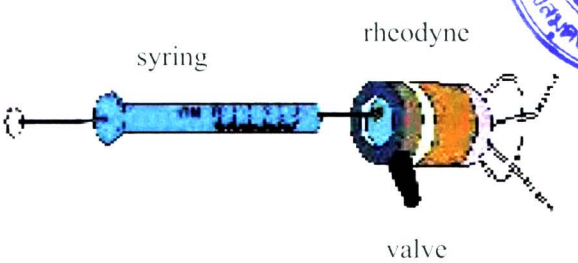
1) แบบ low pressure gradient เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศ ต่อจากนั้นก็จะถูกปั๊มต่อไปด้วยความดันสูง เข้าสู่คอลัมน์

2) แบบ high pressure gradient เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ใน gradient elution จะถูกปั๊มผ่าน high pressure pump เข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนจะเข้าสู่คอลัมน์

2.2.2.5 Sample introduction devices

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยังคอลัมน์ มีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการ แยกสาร เนื่องจากใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย และต้องการความแม่นยำสูง เพื่อให้สารตัวอย่างผ่านเข้าไปในคอลัมน์ลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นได้ นิยมใช้คือ microsampling valve วิธีที่ง่ายที่สุดคือใช้วิธีฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วย microsyringe (ดังรูปที่ 2.6)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 2.6 microsyringe

ที่มา: ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ (2553)

2.2.2.6 เครื่องฉีดสารตัวอย่าง

สามารถฉีดสารตัวอย่างได้ 20 ไมโครลิตร โดยไม่ต้องเปลี่ยนที่บรรจุและไม่ต้องหยุดหรือลดแรงดันของปั๊มก่อน และส่งสัญญาณไปยังเครื่องประเมินผลและบันทึกผลได้โดยอัตโนมัติในทันทีที่ฉีดสารตัวอย่าง

2.2.2.7 Guard column

ใช้เชื่อมต่อกับคอลัมน์ เพื่อกรองสารที่ไม่สามารถถูกชะ หรืออนุภาคเล็กๆ ช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์

2.2.2.8 คอลัมน์

ลักษณะทั่วไปภายนอกมักทำด้วยโลหะสแตนเลส ภายในคอลัมน์จะบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งจนเต็ม ซึ่งอนุภาคนี้จะบรรจุแน่นและไม่มีช่องว่าง และใช้ปั๊มช่วยให้ตัวทำละลายไหลผ่าน อุณหภูมิของคอลัมน์สามารถควบคุมได้โดยการติดตั้งคอลัมน์ไว้ใน heater column ปัจจุบันคอลัมน์มีขนาดเล็กลงเรียกว่า micro bore colum (รูปที่ 2.7)

รูปที่ 2.7 คอลัมน์ชนิดต่างๆและอุปกรณ์

ที่มา: ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ (2553)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 ก.ค. 2554
ทะเบียน 233344
เรียกหนังสือ

2.2.2.9 เครื่องตรวจวัด (detector)

สิ่งที่ต้องการ คือ ความไวของเครื่องตรวจวัดซึ่งสามารถตรวจวัดสารที่แยกออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นเครื่องตรวจวัดในอุดมคติควรมีลักษณะดังนี้

- มีความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- เชื่อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีลักษณะแบบเชิงเส้น (linearity) ในช่วงกว้าง
- ไม่ทำลายสาร
- ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับพีก (peak) ที่ต้องการตรวจสอบ

เครื่องตรวจวัดของ LC สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1) bulk property หรือ general detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลาย เช่น refractive index และ conductivity detectors
2) solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-VIS, fluorescence หรือ electrochemical detectors เป็นต้น

เครื่องยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS detectors) อาศัยการดูดกลืนแสงยูวี หรือวิสิเบลของสารตัวอย่าง ลักษณะที่พิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ยูวี-วิสิเบิลที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1) Fixed-wavelength UV detector
2) Variable UV-VIS detector
3) Photodiode-array detector

เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (differential refractometers) นิยมมากใน HPLC รองลงมาจากเครื่องยูวี ดีเทคเตอร์ ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเห (refractive index, RI) อย่างต่อเนื่อง ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ สามารถให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่ เครื่อง RI ที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่

1) Fresnel refractometer

2) Deflection refractometer

3) Interferometric refractometer

เครื่องดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent detector) มีความจำเพาะสูง (selective) เนื่องจากมันมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิด เมื่อถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี ดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีประโยชน์มากเมื่อนำมาตรวจหาสาร ในสารตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ต่างๆ ที่มีปริมาณน้อยๆ

2.2.3 ปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแยกสารโดยเทคนิคโครมาโทกราฟฟี

2.2.3.1 Parition ratio (partition coefficient, K) เป็นค่าคงที่ ที่อธิบายถึงสมดุลของการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างเฟสทั้งสอง คือ เฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ โดยค่า K ได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารในเฟสคงที่ กับความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่ หรืออัตราส่วนของเวลาที่สารอยู่ในเฟสคงที่ กับเวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ดังสมการที่ 2.1

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{หรือ} \quad K = \frac{t_s}{t_m} \qquad (2.1)$$

โดยที่ C_s = ความเข้มข้นของสารในเฟสคงที่

C_m = ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่

t_s = เวลาที่สารอยู่ในเฟสคงที่

t_m = เวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

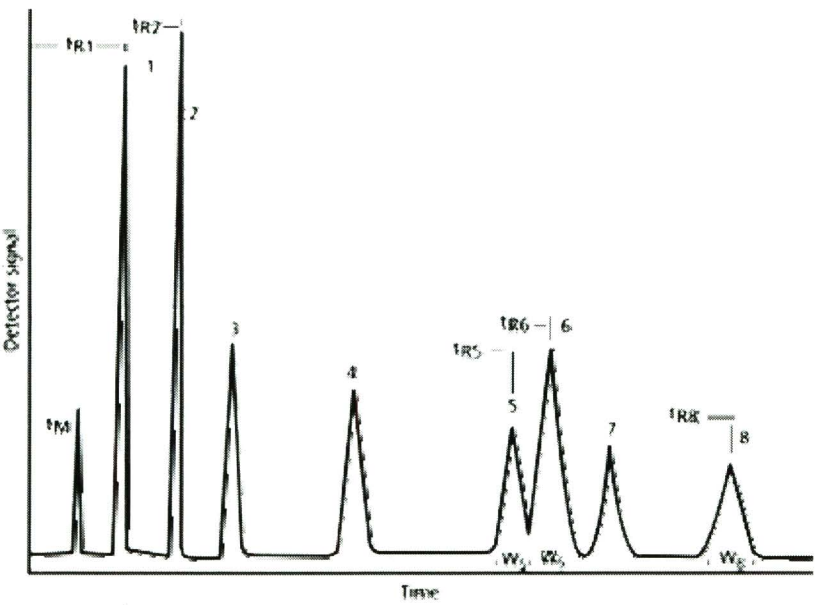
สารแต่ละชนิดจะมีค่า K คงที่เฉพาะในแต่ละสภาวะที่ทดสอบเท่านั้น ค่า K แปรผันตามอุณหภูมิของการทดลอง และส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ แต่ไม่ขึ้นกับจำนวนของสารที่นำมาตรวจวิเคราะห์ สามารถนำในใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แต่การวัดค่า K จากโครมาโทแกรมโดยตรงนั้นทำได้ยาก จึงไม่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร และมักใช้พารามิเตอร์ตัวอื่นที่สามารถวัดค่าจากโครมาโทแกรมโดยตรงในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร เช่น เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ เป็นต้น

2.2.3.2 เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (retention time, t_R) เป็นระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ใช้ในการพาหรือชะล้างสารตัวอย่างให้เคลื่อนผ่านเฟสคงที่ หรือระยะเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนถึงเวลาที่อยู่ ณ ตำแหน่งจุดยอดของพีกบนโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.8

เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ เป็นพารามิเตอร์ที่วัดและอ่านค่าได้จาก โครมาโทแกรมโดยตรง สามารถใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ หรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร แต่การ

เปลี่ยนแปลงสภาวะที่ใช้ในการทดลอง เช่น อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จะทำให้การพิสูจน์เอกลักษณ์ผิดพลาดได้ จึงนิยมใช้พารามิเตอร์ตัวอื่น เช่น เวลาการคงไว้สัมพัทธ์ จะให้ผลถูกต้องกว่า

2.2.3.3 Corrected retention time (t'_R) คือ ระยะเวลาตั้งแต่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสคงที่ ถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารตัวอย่างบน โครมาโทแกรม หรือระยะเวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวให้อยู่ในเฟสคงที่



รูปที่ 2.8 โครมาโทแกรมแสดงการหาพารามิเตอร์ต่างๆ

ที่มา: ISA (2010)

2.2.3.4 แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, k') เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารตัวอย่างหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยกโดยการชะแบบไอโซเครติก ค่า k' นี้หาได้จาก corrected retention time ของสารที่วิเคราะห์ หารด้วยเวลาสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยว หรือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (t_0) ดังสมการ 2.2

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \qquad (2.2)$$

k' เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงลักษณะการทำงานของคอลัมน์ ปัจจัยที่มีผลต่อค่า k' คือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เฟสคงที่ และอุณหภูมิของการทดลอง โดยทั่วไปค่า k' ของสารจะอยู่ระหว่าง 2-5 ทั้งนี้เพราะเวลาที่ใช้แยกสมดุลกันดี และค่า k' ที่เหมาะสมของการแยกสารที่ซับซ้อนควรมีค่าระหว่าง $1 \leq k' \leq 16$ ในการปฏิบัติควรหาค่า k' ของพีกของสารที่ใช้ทดสอบอย่างน้อย 1 พีก คือ พีกแรก เพื่อให้แน่ใจว่าพีกของสารที่ใช้ทดสอบแยกออกจากตัวทำละลาย หรือพีกของสารปนเปื้อนซึ่งมักจะถูกชะออกมาใกล้เคียงหรือที่เดียวกับ t_0 พีกของสารที่ใช้ทดสอบ ไม่ควรมีค่า k' สูงเกิน 10-15

เพราะจะใช้เวลานาน ทำให้พีกที่ได้กว้างและแยกได้ไม่ดี ทำให้การตรวจวัดลำบาก ค่า k' บอกให้ทราบถึงเวลาที่สารชะล้างออกมาจากคอลัมน์ บอกลักษณะของพีก กว้างหรือแคบ การตรวจวัดยากหรือง่าย ความแรงของเฟสเคลื่อนที่แรงหรืออ่อน ดังแสดงในตารางที่ 2.4 จากข้อมูลนี้สามารถนำมาปรับค่า k' ให้เหมาะสม เพื่อให้การแยกสารได้ดีที่สุด

ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบค่า k'

ข้อมูล	ค่า k' ต่ำ	ค่า k' สูง
เวลาที่สารถูกพาออกจากคอลัมน์	น้อย	มาก
ลักษณะของพีก	แหลมสูง	กว้างเตี้ย
การตรวจวัด	ง่าย	ยาก
ความแรงของเฟสเคลื่อนที่	แรง	อ่อน

ที่มา : แม้น และอมร (2534)

การปรับปรุงหรือควบคุมค่า k' ในกรณีที่ค่า k' ที่ได้จากการทดลองไม่เหมาะสม อาจสูงหรือต่ำเกินไป ทำให้การแยกไม่ดี มีวิธีการปรับปรุงค่า k' หรือเวลาของการชะสารเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้นได้ดังนี้

1) ปรับเปลี่ยนส่วนผสม หรือความแรงของตัวทำละลาย หรือเฟสเคลื่อนที่ โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย ในทางปฏิบัติการเลือกเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมนั้นจะต้องพิจารณาจากสมบัติของสารตัวอย่างเป็นหลัก และความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสม ทำโดยการแยกสารที่ต้องการ 1-2 ครั้ง แล้วพิจารณาค่า k' ที่ได้ หลังจากนั้นจึงปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้แรงขึ้นหรืออ่อนลง เพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น วิธีที่ง่ายและสะดวกในการปรับความแรง คือ ปรับความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเป็นกรด-ด่าง ความมีขั้ว โดยไม่เปลี่ยนสมบัติทางเคมีหรือชนิดของตัวทำละลายที่เป็นส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ โดยทั่วไปมักจะใช้ตัวทำละลายผสมที่ให้ค่า $1 \leq k' \leq 10$ เพื่อให้การเกิดการแยก และเวลาในการแยกไม่นานเกินไป ถ้าต้องการเปลี่ยนค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงน้อย ในทางตรงข้ามถ้าต้องการลดค่า k' ให้ใช้เฟสที่มีความแรงเพิ่มขึ้น

2) เพิ่มหรือลดปริมาณของเฟสคงที่ ในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟฟีแบบแยกขนาดจำเพาะ (size exclusion chromatography) ทำได้โดยการเพิ่มหรือลดปริมาณของรูพรุน และพื้นที่ผิวของสารบรรจุในคอลัมน์ ในกรณีของสารที่เป็นโครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบนสารบรรจุ การปรับเปลี่ยนปัจจัยที่มีผลต่อค่า K อุณหภูมิ และอัตราการเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความผันแปรของค่า K ดังนั้นจึงมีผลต่อค่า k' ด้วย

2.2.3.5 ค่าซีเล็คติวิตี้ (selectivity factor, α) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสาร 2 ชนิด แยกออกจากกันได้ดีเพียงใด ดังรูปที่ 2.9 การแยกออกจากกันนี้ขึ้นกับค่า t'_R หรือค่า k' เท่านั้น โดยไม่

คำนึงถึงความกว้างของพีก และค่าที่เกี่ยวข้องกับ relative partition coefficient หรืออัตราส่วนของแฟกเตอร์ความจุ 2 ชนิดที่มีพีกติดกัน สามารถคำนวณได้จากสมการ

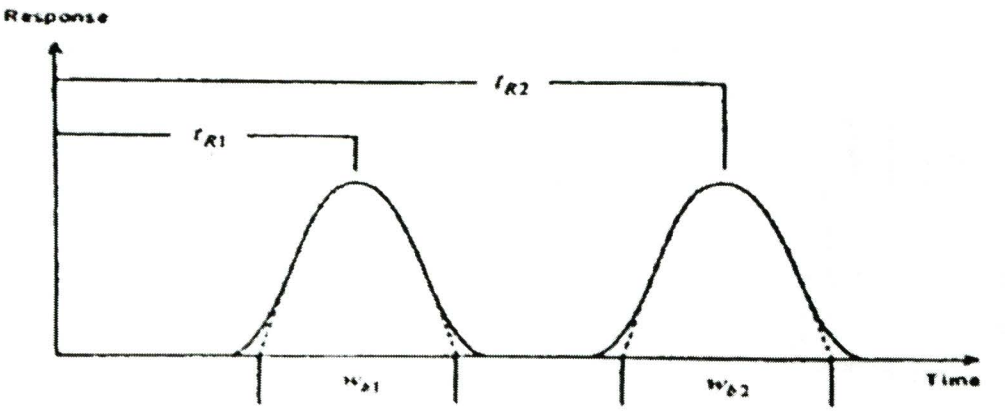
$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \qquad (2.3)$$

โดยที่ k'_1 = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกที่ 1

k'_2 = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกที่ 2

t'_{R1} = Corrected retention time ของพีกที่ 1

t'_{R2} = Corrected retention time ของพีกที่ 2



รูปที่ 2.9 โครมาโทแกรมแสดงการหาค่าซีเล็คติวิตี้

ที่มา: คณิตา (2542)

ค่าซีเล็คติวิตี้ เป็นค่าที่มีความสำคัญมาก เป็นตัวบอกใบ้ให้ทราบว่าคอลัมน์หรือเฟสคงที่นั้นทำงานอยู่ในสภาวะใด ค่านี้ขึ้นกับองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ พื้นที่ผิวของเฟสคงที่ และอุณหภูมิในการแยกสาร ค่า α จะมีค่ามากกว่า 1 จึงจะมีการแยกเกิดขึ้น ถ้าค่า $\alpha = 1$ แสดงว่าพีกทั้งสองทับกัน เนื่องจากพีกทั้งสองมีเวลาการคงไว้เท่ากับค่า α ที่เหมาะสม คือ ระหว่าง 1.5 ถึง 4.0

การควบคุมหรือปรับเปลี่ยนค่าซีเล็คติวิตี้ เพื่อให้สาร 2 ชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันได้ดีขึ้นเท่านั้น สามารถทำโดยวิธีต่างๆ ดังนี้

1) ปรับองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ โดยการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบ เป็นการเปลี่ยนสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย

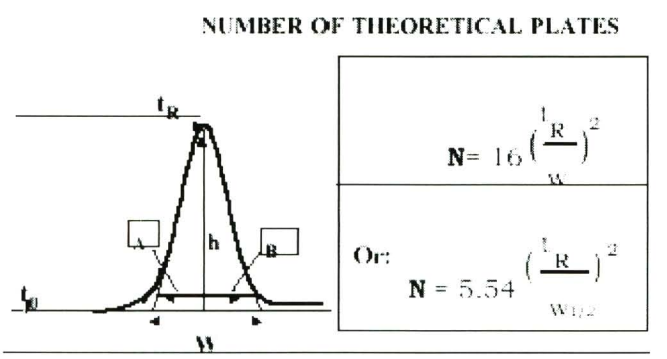
2) เปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเฟสเคลื่อนที่ นิยมใช้กับการแยกสารที่มีการแตกตัวเป็นไอออน การปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเฟสเคลื่อนที่มักทำให้ค่า α เปลี่ยนแปลง แต่ค่า k' เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ส่วนมากใช้วิธีการแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange) และไอออนแพร์ (ion-pair)

3) เปลี่ยนเฟสคงที่ ทำโดยการเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์วิธีนี้ไม่สะดวก เสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าการปรับเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมแต่ให้ผลดีมาก ถ้ามีการเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่ เฟสเคลื่อนที่จะต้องปรับเปลี่ยนด้วยเช่นกัน เพื่อให้มีความแรงพอที่จะทำให้ได้ค่า k' ที่เหมาะสม

4) เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ โดยทั่วไปการเพิ่มอุณหภูมิ จะทำให้ค่า k' ลดลง ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ จำเป็นต้องลดความแรงของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อเป็นการชดเชยค่า k' อยู่ในช่วงที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า α เพียงเล็กน้อย

5) การใช้ปฏิกิริยาทางเคมี ปฏิกิริยาที่นิยมใช้ คือ คอมแพล็กเซชั่น (complexation) โดยการเติมซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) ลงในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งซิลเวอร์ไอออนจะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า t_R และค่า α ทำให้การแยกดีขึ้น

2.2.3.6 ประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากความกว้างของพีกที่ถูกชะล้างออกมา ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี พีกแต่ละพีกที่ถูกชะล้างออกมาจะต้องมีฐานที่แคบและแยกออกจากกันได้ ค่าที่วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวนเพลทของคอลัมน์ (number of theoretical plate, N) และความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ (hight eqivalant to a theoretical plate, H หรือ HETP) ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณจำนวนเพลทของคอลัมน์

ที่มา: ISA (2010)

จำนวนเพลทของคอลัมน์เป็นตัวชี้บ่งถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ ว่าคอลัมน์นั้นมีการบรรจุดีเพียงใด พิจารณาจากความกว้างของพีกขณะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ โดยเปรียบเทียบความ

กว้างของพีก กับเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ สามารถคำนวณได้จาก โครมาโทแกรมดังสมการที่ 2.4

$$N = a\left(\frac{t'_R}{W}\right)^2 \quad (2.4)$$

โดยที่ N = จำนวนเพลท

t_R = เวลาคงไว้ของสาร

W = ความกว้างของพีกที่ตำแหน่งความสูงที่กำหนด

a = ค่าคงที่ขึ้นกับวิธีวัดความกว้างของพีก (ตามตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 ค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีกโดยวิธีการต่างๆ

วิธี	ค่า a
ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง	5.54
ความกว้างของพีกที่ 4.4% ของความสูง (5σ)	25
Tangent	16

ที่มา: แม้น และอมร (2534)

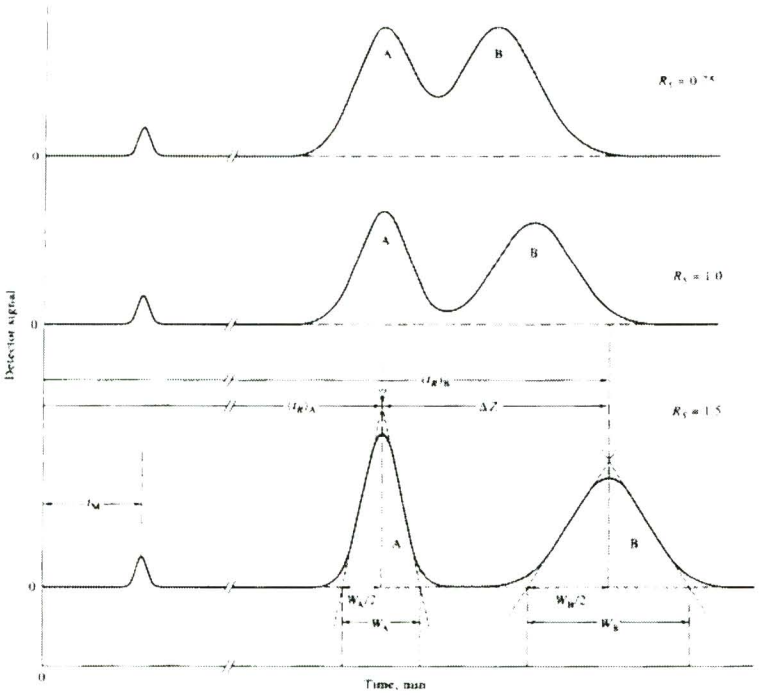
2.2.3.7 ความสามารถในการแยก (resolution) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันได้ดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และความกว้างของพีกทั้งสอง ดังรูปที่ 2.11 คำนวณได้จากระยะห่างระหว่างจุดสูงสุดของพีกทั้งสอง หารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีกทั้งสอง ดังสมการที่ 2.5

$$R_s = \frac{(t_2-t_1)}{\frac{1}{2}(W_1+W_2)} \quad (2.5)$$

โดยที่ R_s = ค่าความสามารถในการแยก (resolution)

t_1 และ t_2 = การคงไว้ของพีกที่ 1 และพีกที่ 2 ตามลำดับ

W_1 และ W_2 = ความกว้างของพีกที่1 และพีกที่ 2 ตามลำดับ



รูปที่ 2.11 โครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่าการแยก (R_s)

ที่มา: ISA (2010)

ถ้าพีกสมมาตร R_s มีค่าเท่ากับ 1.5 แสดงว่าการแยกของพีกทั้งสองลงถึง เบสไลน์ จะมีการทับกันเพียง 0.3 เปอร์เซ็นต์ ถือเป็นการแยกอย่างสมบูรณ์ ถ้า R_s มีค่าเท่ากับ 1.0 พีกทั้งสองจะทับกันบางส่วน คือประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และการแยกนี้สามารถนำมาใช้งานในการทดสอบเชิงปริมาณได้ ถ้า R_s มีค่าเท่ากับ 0.75 พีกทั้งสองจะทับกันมาก ไม่สามารถใช้ในการทดสอบเชิงปริมาณได้ และถ้า R_s มีค่าสูงเกินไป จะทำให้พีกทั้งสองห่างกันมาก เป็นผลให้สิ้นเปลืองเวลาและตัวทำละลายโดยไม่จำเป็น ดังนั้นควรปรับสภาวะเพื่อให้ได้ R_s ที่เหมาะสม

จะเห็นว่าความสามารถในการแยกเกี่ยวข้องกับเวลาการคงไว้ และความกว้างของพีก โดยที่เวลาจะเกี่ยวข้องกับแฟกเตอร์ความจุ (k') และค่าซิเล็คติวิตี้ (α) ส่วนความกว้างของพีกเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ (N) ค่า R_s จะเพิ่มเมื่อ Δt เพิ่ม และความกว้างของ พีกลดลง จากความสัมพันธ์ของค่าความสามารถในการแยกกับพารามิเตอร์ดังกล่าว สามารถเขียนเป็นสมการความสัมพันธ์ได้ตามสมการที่ 2.6

$$R_s = (¼)(\alpha-1)\sqrt{N}\left(\frac{k'}{1+k'}\right) \qquad (2.6)$$

จากสมการสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด และใช้เวลาน้อย ได้ 3 วิธีคือ

1) การปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ (k')

2) การปรับค่าซีเล็คติวิตี้ (α)

3) การปรับจำนวนเพลท (N)

ในเวลาทำงานจะต้องพิจารณาดูว่าควรปรับพารามิเตอร์ตัวใดก่อนหลัง เพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น โดยสิ่งที่ง่ายและสะดวกคือ การปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ (k') และค่าซีเล็คติวิตี้ (α) ก่อน ถ้าการแยกยังไม่ดีจึงปรับจำนวนเพลท ซึ่งไม่สะดวกและเสียค่าใช้จ่ายสูง

ประสิทธิภาพของคอลัมน์เกี่ยวข้องกับอิทธิพลทางไคเนติก (kinetic effect) ซึ่งมีผลต่อความกว้างของพีก ค่าซีเล็คติวิตี้ และค่าแฟกเตอร์ความจุ เกี่ยวกับเทอร์โมไดนามิกของสารที่ทำการแยก กับค่าการกระจายตัวของสาร (distribution coefficient, K) และปริมาณของเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ ค่าซีเล็คติวิตี้ (α) เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของสาร 2 ชนิดเท่านั้น ส่วนค่าแฟกเตอร์ความจุเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของสารและคอลัมน์

การปรับประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) สามารถปรับค่าจำนวนเพลทของคอลัมน์ เพื่อให้ความสามารถในการแยกดีขึ้นนั้นควรเป็นทางเลือกสุดท้าย เนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายสูงและไม่สะดวก การเพิ่มจำนวนเพลทของคอลัมน์ทำได้โดยการเพิ่มความยาวคอลัมน์ ทำให้พีกที่ได้แคบลง โดยทั่วๆไปมักจะลดความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ลง ซึ่งค่าความสูงของเพลทมีความสัมพันธ์กับจำนวนเพลทในคอลัมน์ คือ ค่าความสูงของเพลทต่ำ จำนวนเพลทจะสูง การลดความสูงของเพลททำได้โดยเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ลดขนาดอนุภาคของสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ลดความหนืดของเฟสเคลื่อนที่ (เพื่อเพิ่มอัตราการกระจายตัวของสารในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้พีกแคบลง) และเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์

2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method of validate)

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่จะให้ผลถูกต้องและเป็นที่น่าเชื่อถือนั้น วิธีทดสอบเป็นองค์ประกอบที่สำคัญยิ่ง ดังนั้นเมื่อเลือกนำวิธีทดสอบใดมาใช้ ไม่ว่าจะเป็นวิธีมาตรฐาน หรือวิธีที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ จะต้องมีการทดสอบว่าสามารถใช้ทดสอบตัวอย่างได้ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องปฏิบัติ ก่อนนำวิธีการทดสอบนั้นมาใช้งาน ไม่ว่าวิธีนั้นจะถูกดำเนินการมาอย่างไร เช่น การนำวิธีทดสอบมาตรฐานมาใช้ทดสอบอาหาร หรือองค์ประกอบที่นอกเหนือจากที่กำหนดไว้ในขอบข่ายของวิธีนั้น หรือมีการปรับเปลี่ยนเงื่อนไขที่กำหนดไว้ในวิธีมาตรฐานหรือวิธีที่มีอยู่เดิม หรือวิธีที่จะนำมาใช้ไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับคุณลักษณะเฉพาะของวิธีหรือมีไม่สมบูรณ์ตามความจำเป็นของการใช้งาน หรือเป็นวิธีใหม่ที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้น ส่วนในกรณีที่นำวิธีมาตรฐานหรือวิธีที่พัฒนาอย่างดีแล้วมาใช้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ก็จำเป็นต้องทวนสอบ (verify) โดยห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันสมรรถนะของ

ห้องปฏิบัติการว่าสามารถทำได้ตามที่ระบุในวิธี การตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบ เป็นกระบวนการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเพื่อการศึกษา หรือยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบ (method performance characteristics) และประเมินด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความถูกต้อง และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ซึ่งคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเหล่านี้ ได้แก่ช่วงของการทดสอบ (range) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นของการทดสอบ (accuracy) ความเที่ยงของการทดสอบ (precision) ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity) ความทนของวิธี (rugged/robustness) และปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) เป็นต้น การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะเหล่านี้อาจไม่จำเป็นต้องดำเนินการทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีทดสอบ และวัตถุประสงค์การใช้งาน (นภาวรรณ, 2552)

2.3.1 ช่วงของการทดสอบ และความเป็นเส้นตรง

ช่วงทดสอบ คือ ช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ระหว่างค่าต่ำสุด และค่าสูงสุดที่เป็นเส้นตรง ให้ผลการทดสอบที่มีความเที่ยง ความแม่นตามเกณฑ์ที่ยอมรับ ภายใต้สภาวะการทดลองที่ระบุไว้ ส่วนความเป็นเส้นตรงเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือตรวจวัด และความเข้มข้นของสารในช่วงของการทดสอบ

2.3.1.1 ขั้นตอนการทดสอบช่วงของการทดสอบ

1) กำหนดช่วงความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ

2) ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ (fortified sample blank หรือ fortified sample) ที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อง 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ แล้วทดสอบตามขั้นตอน

3) เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ (แกน X) กับสัญญาณ (แกน Y)

4) พิจารณาความเข้มข้นที่เป็นความเป็นเส้นตรง

2.3.1.2 ขั้นตอนการทดสอบความเป็นเส้นตรง

1) ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบ ในความเข้มข้นของช่วงการทดสอบ อย่างน้อย 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วทดสอบตามขั้นตอน

2) เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่าง (แกน X) กับพื้นที่ใต้พีก (แกน Y)

3) หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r); $r \geq 0.995$

2.3.2 ความแม่นของการทดสอบ (accuracy)

ความแม่นเป็นคุณลักษณะของวิธีที่แสดงความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์ต่อค่าจริงหรือค่าอ้างอิงที่ยอมรับ การทดสอบความแม่นทำได้โดยการประเมินด้วยการคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของวิธีที่มีต่อสารตัวอย่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์คืนกลับ} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3} \qquad (2.7)$$

โดยที่ C_1 = ความเข้มข้นของสารที่สนใจซึ่งได้จากการทดสอบ (spiked sample)

C_2 = ความเข้มข้นของสารที่สนใจที่มีในตัวอย่าง (unspiked sample)

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

เกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์การคืนกลับตามมาตรฐานโคเด็กซ์ ได้กำหนดไว้ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 เกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์การคืนกลับตามมาตรฐานโคเด็กซ์

ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%)
< 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม	50 – 120
> 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ≤ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	60 – 120
> 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ≤ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70 – 120
> 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม < 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70 – 110
> 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	70 – 110

ที่มา : Codex Alimentarius Commission (2002)

2.3.3 ปริมาณต่ำสุดที่วิธีทดสอบตรวจพบได้เชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD)

ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ โดยที่ความเข้มข้นระดับนี้ไม่อาจบอกเป็นปริมาณที่มีความถูกต้อง และเที่ยงตรงในระดับที่ยอมรับได้ เนื่องจากความไม่แน่นอนสูง

ขั้นตอนการทดสอบ LOD (กรณี blank sample ไม่สามารถอ่านสัญญาณได้)

1) ทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการทดสอบที่ระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้
2) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
3) คำนวณค่า LOD จากสูตร LOD = ค่าเฉลี่ย + 3SD

2.3.4 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ ที่ความเข้มข้นระดับนี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่น และความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้

ขั้นตอนการทดสอบ LOQ (กรณี blank sample ไม่สามารถอ่านสัญญาณได้)

1) หาค่า LOQ โดยประมาณจาก SD ที่ได้จากการหา LOD
2) ประมาณค่า LOQ จากสูตร LOQ = ค่าเฉลี่ย + 10SD
3) ยืนยันค่า LOQ ที่มีความแม่น ความเที่ยง ในระดับที่ยอมรับได้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หลังจากที่ได้มีประกาศเรื่องการพบอะคริลาไมด์ในอาหารนั้น หลายประเทศมีการตื่นตัวในการตรวจสอบการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในอาหาร โดยแบ่งออกเป็นการตรวจสอบอาหารสำเร็จรูป และการตรวจสอบอาหารท้องถิ่น ดังตัวอย่างต่อไปนี้

2.4.1 อาหารสำเร็จรูป

พนาวัลย์ (2550) ได้ตรวจวิเคราะห์อาหารของไทยที่คาดว่ามีการปนเปื้อนอะคริลาไมด์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูง จำนวน 161 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 เปอร์เซ็นต์ สกัดสิ่งรบกวนด้วยเฟสของแข็ง (solid extraction phase: SPE) ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่มีวัตถุดิบจากมันฝรั่งมีปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 1,336 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาเป็นผลิตภัณฑ์ในกลุ่มกาแฟสำเร็จรูป 404 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Murkovic (2004) ได้วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารพร้อมบริโภค (ready-to-eat) ในประเทศออสเตรีย จำนวน 158 ตัวอย่างโดยสกัดอะคริลาไมด์ออกจากตัวอย่างที่แยกไขมันออกแล้ว สกัดสิ่งรบกวนด้วย SPE ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC/MS ก่อนพบปริมาณอะคริลาไมด์มีมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ประเภทมันฝรั่งทอด คือ 499 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทกาแฟ คือ 169 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Viklund และคณะ (2006) ได้ทำการวิเคราะห์มันฝรั่งทอดที่ 160 องศาเซลเซียล นาน 2 ถึง 4.5 นาที ทำการวัดสีด้วยเครื่องวัดสีดิจิตอล (digital imaging) และสกัดอะคริลาไมด์ก่อนนำมากรองผ่านเฟสของแข็ง มีเปอร์เซ็นต์การคืนกลับที่ 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ด้วยเครื่อง LC-MS พบว่าค่าสีมีความสัมพันธ์ต่อกับปริมาณอะคริลาไมด์ โดยมีค่า L^* (lightness) ลดลง และค่า a^* (redness) และ b^* (yellowness) เพิ่มขึ้น เมื่อค่าอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น และพบว่าสิ่งที่มีผลต่อปริมาณอะคริลาไมด์ได้แก่ สี และปริมาณน้ำอิสระในตัวอย่าง (water activity: A_w)

JECFA (2007) ได้ตรวจสอบอาหารในประเทศนอร์เวย์ สวีเดน สวิตเซอร์แลนด์ อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา พบว่าผลิตภัณฑ์ในกลุ่มมันฝรั่งมีปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 1,312 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และผลิตภัณฑ์ขนมอบมีปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 423 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

2.4.2 อาหารท้องถิ่น

Tateo (2007) ได้ศึกษาปริมาณอะคริลาไมด์ในข้าวสุก ซอสมะเขือเทศ และอาหารจานด่วน (fast food) บางชนิดที่เป็นอาหารที่นิยมรับประทานกันโดยสุ่มตัวอย่างจากตลาดอิตาเลียน จำนวน 27 ชนิดตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างมาสกัดไขมันออกด้วยเฮกเซน และสกัดอะคริลาไมด์ด้วยเมทานอล ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย GC/MS พบว่าซอสมะเขือเทศ ข้าว และรีซอทโต (risotto) มีปริมาณอะคริลาไมด์ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Nigel (2007) ได้ตรวจวิเคราะห์มันฝรั่ง 3 พันธุ์ ได้แก่ Rooster, Record และ Oilean เพื่อหาสารตั้งต้นของอะคริลาไมด์ พบว่ามันฝรั่งทั้ง 3 พันธุ์ มีปริมาณแอสพาราจีนและน้ำตาลรีดิวซ์สูงไม่แตกต่างกัน ทำให้มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดอะคริลาไมด์ในอาหารที่นำมันฝรั่งเหล่านี้ไปใช้เป็นวัตถุดิบ

Wang (2007) ได้ทำการศึกษาปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารทอดประเภทแป้งพื้นเมืองของจีน โดยนำตัวอย่างมาสกัดอะคริลาไมด์ด้วยน้ำ และสกัดสิ่งรบกวนด้วย SPE ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC/UV พบว่า พายไข่ทอด (fried egg pastry) มีปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 198 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และแป้งหวานทอด (fried sweet dumpling) มีปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 136 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Olemz และคณะ (2008) ได้ทำการสำรวจปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารที่จำหน่ายในตลาดของประเทศตุรกี ประเภทอาหารสำเร็จรูป และของหวานท้องถิ่น ที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ จำนวน 311 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง GC-MS พบว่าอาหารสำเร็จรูปประเภทมันฝรั่งทอดกรอบ มีปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 834 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และของหวานประเภทแป้งทอด (kemalpasa dessert) มีปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 512 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณอะคริลาไมด์ระหว่างอาหารที่วิเคราะห์เมื่อวันที่ผลิตกับอาหารที่วิเคราะห์หลัง 6 เดือนนับจากวันที่ผลิต

Karasek และคณะ (2009) ได้ทำการวิเคราะห์หาอะคริลาไมด์ในเกาลัดคั่วและผลิตภัณฑ์ขนมอบที่มีเกาลัดเป็นส่วนประกอบ จำนวน 31 ตัวอย่าง จาก 9 ประเทศในทวีปยุโรปโดยนำตัวอย่างมาสกัดอะคริลาไมด์ด้วยน้ำ และสกัดสิ่งรบกวนด้วย SPE ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS/MS พบว่าในตัวอย่างเกาลัดคั่วมีปริมาณอะคริลาไมด์ในช่วง น้อยกว่า 8 ถึง 1,278 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณอะคริลาไมด์คือ 90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผลิตภัณฑ์ขนมอบที่มีเกาลัดเป็นส่วนประกอบ มีปริมาณอะคริลาไมด์ในช่วง น้อยกว่า 4 ถึง 159 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และยังพบว่าระยะเวลาการให้ความร้อนมีผลต่อปริมาณอะคริลาไมด์อีกด้วย

Daniali และคณะ (2010) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อบและทอดที่มีกล้วยเป็นส่วนประกอบ จากตลาดต่างๆในประเทศมาเลเซีย โดยใช้เครื่อง GC-MS พบว่าในตัวอย่างกล้วยทอด (pisang goring) มีปริมาณอะคริลาไมด์มากที่สุดในช่วง 74.0 ถึง 7,468.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาคือกล้วยทอดกรอบชนิดหวาน (kerepek pisang manis) มีปริมาณอะคริลาไมด์ในช่วง 160.7 ถึง 500.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งขีดจำกัดในการตรวจพบอยู่ที่ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และจากการศึกษานี้พบว่าอัตราการได้รับอะคริลาไมด์ในประเทศมาเลเซียอยู่ที่ 1.2 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม