รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดและอุปกรณ์ปฏิบัติการบนชิพสำหรับตรวจวัดสารตกค้างประเภทยาปฏิชีวนะและโลหะปนเปื้อนในอาหาร

METHOD AND LAB ON A CHIP DEVELOPMENT FOR THE ANTIBAETERIAL AND METAL DETERMINATION IN FOOD

รศ.ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล
รศ.ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์
รศ.ดร. ธรรมนูญ หนูจักร
รศ.ดร. นงนุช เหมืองสิน
อ.ดร. ลักษณา ลิ่มสวรรค์

ภาควิชา เคมี คณะ วิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเพื่อการตรวจวิเคราะห์โลหะหนักหลายชนิดพร้อมกันและตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็วซึ่งได้แก่โลหะตะกั่ว, แคดเมียม, และทองแดง โดยใช้เทคนิคไมโครชิพคะปิลารีอิเล็คโทรฟอริซิสร่วมกับตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ระบบการตรวจวิเคราะห์โดยตรงแบบแอมเพอโรเมทรีในไมโครชิพคะปิลารีอิเล็คโทรฟอริซิสถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ไอออนโลหะเหล่านี้ได้เป็นอย่างดี อิทธิพลจากศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับระบบ, ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัด, ความเข้มข้นและพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อค่าการตอบสนองของตัวตรวจวัดซึ่งได้ทำการตรวจสอบและหาค่าที่ทำให้เกิดประสิทธิภาพการตรวจวัด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์โดยใช้โซนอิเล็คโทรฟอริซิสในการแยกโลหะตะกั่ว แคดเมียม และทองแดงได้ในเวลาน้อยกว่า 3 นาที ใช้บัฟเฟอร์เอ็มอีเอส (MES) (พีเอช 7.0, 25 มิลลิโมลาร์) และแอลฮีสทีดีน (L-histidine), ให้ศักย์ไฟฟ้าในการแยก 1.2 กิโลโวลต์ และศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัดที่ -0.8 โวลต์ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดโลหะตะกั่ว, แคดเมียม, และทองแดงเป็น 1.74, 0.73, และ 0.13 ไมโครโมลาร์ (ค่าสัญญาณกระแสต่อสัญญาณรบกวนมีค่ามากกว่า 3) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสัญญาณกระแสไม่เกิน 6 เปอร์เซ็นต์ และของเวลาในการเคลื่อนที่ของสารในชันแนลไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ ในงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นหลักการในการให้ศักย์ไฟฟ้ากับระบบไมโครชิพซีอีซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ในอนาคต นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นการวิเคราะห์ไอออนโลหะในตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์ทำให้ได้ความมุ่งหมายว่าไมโครชิพซีอีร่วมกับตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้านี้จะเป็นอีกวิธีที่ใช้ในระบบการวิเคราะห์ระดับไมโครสำหรับตรวจวิเคราะห์อาหาร

Abstract

This thesis demonstrates the fast and simultaneous detection of prominent heavy metals including lead, cadmium and copper using a microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. Direct amperometric detection mode for microchip capillary electrophoresis was successfully applied to analytes, the heavy metal ions. The influences of the separation voltage, detection potential, concentration and pH value of running buffer on the response of the detector were carefully investigated and optimized. The zone electrophoretic separation of lead, cadmium and copper is less than 3 min using a MES buffer and L-Histidine as background electrolyte (pH 7.0, 25 mM), employing 1.2 kV as the separation voltage and -0.8 V as the detection potential. The detection limits for Pb^{2+}, Cd^{2+}, and Cu^{2+} were 1.74, 0.73 and 0.13 μM (S/N = 3), respectively. The %RSD of peak current was < 6 % and the %RSD of migration times <2% for prolong operation. To demonstrate the potential and future role of microchip CE, a new route in the real sample analysis was presented. The results obtained allow the proposed microchip capillary electrophoresis- Electrochemical detection as a real gateway to microanalysis in foods.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
คำอธิบายสัญญาลักษณ์	ฎ
บทนำ	
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	
2.1 หลักการของคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส	4
2.1.1 การเคลื่อนที่ของสารภายในคะพิลลารี	5
2.1.2 ความสามารถของการเคลื่อนที่ด้วยอิเล็กโทรออสโมซิส	7
2.1.3 ไมเกรชันไทม์	8
2.1.4 ลักษณะการเคลื่อนที่	9
2.1.5 ประเภทของเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส	10
2.2 ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส	11
2.2.1 ลักษณะไมโครชิพ	12
2.2.2 การบรรจุสารด้วยศักย์ไฟฟ้า	13
2.3 เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า	15
2.3.1 ไซคลิกโวลแทมเมตรี	15
2.3.1.1 การประยุกต์ใช้ประโยชน์	17
2.3.2 แอมเพอโรเมตรี	17

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 18

3.2 อุปกรณ์ไมโครซิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส 18

3.2.1 ขั้วไฟฟ้า 19

3.3 สารเคมี 19

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีในระบบ Batch 20

3.4.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีในไมโครซิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส 21

3.4.2.1 ไมโครซิฟคะพิลลรีอิเล็กโทรฟอริซิส 21

3.4.2.2 ขั้นตอนอิเล็กโทรฟอริซิส 21

3.4.2.3 ศึกษาผลของพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีน 22

3.4.2.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอส และแอลฮีสทีดีน 22

3.4.2.5 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดโลหะ copper(II), lead(II) และ cadmium(II) ion 22

3.4.2.6 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการแยกโลหะ copper(II), lead(II) และ cadmium(II) ion 22

3.4.2.7 ศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการนำสารเข้า channel 22

3.4.2.8 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัด (Linearity) 22

3.4.2.9 ศึกษาหาค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOD) และ ค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (LOQ) 22

3.4.2.10 ศึกษาหาความแม่นยำ (Precision) และ ความถูกต้อง (Accuracy) ในการตรวจวัดโลหะ copper(II), lead(II) และcadmium(II) ion 22

3.5 หาปริมาณโลหะ copper(II), lead(II) และcadmium(II) ion ในเครื่องดื่ม 22

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีในระบบ Batch 23

4.1.1 Background current 23

4.1.2 ปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของโลหะ 23

4.1.2.2 ปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของ Cadmium (II) 24
4.1.2.3 ปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของ Copper (II) 25
4.1.3 ศึกษาผลของ scan rate 26
4.1.3.1 ผลของ scan rate ต่อปฏิกิริยารีดักชันของ lead (II) 26
4.1.3.2 ผลของ scan rate ต่อปฏิกิริยารีดักชันของ cadmium (II) 27
4.1.3 3 ผลของ scan rate ต่อปฏิกิริยารีดักชันของ copper (II) 27
4.2 เทคนิคไมโครซิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสสำหรับการแยก
และการตรวจวัดของโลหะหนัก 28
4.2.1 ลักษณะทางเคมีไฟฟ้าของโลหะ lead (II), cadmium (II) และ copper (II) 28
4.2.2 ผลพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีน 28
4.2.3 ผลความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีน 29
4.2 4 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดโลหะ lead(II) cadmium(II)
ion และ copper(II) 30
4.2.5 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการแยกโลหะ lead(II)cadmium(II) ion
และcopper(II) 31
4.2.6 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่ากระแส
ไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัด (Linearity) และขีดความสามารถต่ำสุด
ในการวิเคราะห์ (Limit of Determination; LOD) 32
4.2.7 หาความแม่นยำ (Precision) และ ความถูกต้อง (Accuracy)
ในการตรวจวัดโลหะ copper(II), lead(II) และcadmium(II) ion 34
4.3 หาปริมาณโลหะ lead (II), cadmium (II) และcopper (II) ion ในเครื่องดื่ม 34

สรุปผลการวิจัย 36
บรรณานุกรม 37

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
4.1	ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดด้วยเทคนิคไมโครซีพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรีของโลหะทั้งสาม	26
4.2	แสดงค่ากระแสไฟฟ้าและ ค่าประสิทธิการแยกของโลหะทั้ง 3 ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 20 mM ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1200 V ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตรวจวัดที่ -0.85 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon	29
4.3	แสดง % RSD ของค่ากระแสที่ได้จากโลหะทั้ง 3	34
4.4	แสดง %recovery ของ lead (II) ในน้ำผัก	34
4.5	แสดง %recovery ของ cadmium (II) ในน้ำผัก	34
4.6	แสดง %recovery ของ copper (II) ในน้ำผัก	35

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	อุปกรณ์และสัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส	5
2.2	แสดงไดอะแกรม Electroosmotic flow (EOF)	7
2.3	แสดงกระบวนการแตกตัวของ Silanol	7
2.4	แสดงลำดับการตรวจวัดไอออนบวก ลบ และกลาง ที่เคลื่อนที่ด้วย electrophoretic และ electroosmotic flow ตามขนาดไอออน และจำนวนไอออน	8
2.5	แสดงรูปแบบการไหลและลักษณะ peak ของ electroosmotic flow และ hydrodynamic flow	9
2.6	คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสและไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส	11
2.7	ส่วนประกอบของไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส	12
2.8	รูปแบบไมโครชิพ	12
2.9	multi-microchannel	13
2.10	แบบ simplest injection	13
2.11	แบบ Pinched injection	14
2.12	แบบ variable-volume injection	14
2.13	โวลแทมโมแกรมของไซคลิกโวลแทมเมตรี	15
2.14	ไซคลิกโวลแทมโมแกรม	15
3.1	แสดง glass chip	19
3.2	ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสกับการตรวจวัดด้วยเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรี	21
4.1	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 50 mV/s	23
4.2	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ lead (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 50 mV/s	24

4.3 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ cadmium (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 50 mV/s 24

4.4 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ copper (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 50 mV/s 25

4.5 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ lead (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 10-300 mV/s และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับรากที่สองของ scan rate 26

4.6 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ cadmium (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 10-300 mV/s และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับรากที่สองของ scan rate 27

4.7 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ copper (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 10-300 mV/s และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับรากที่สองของ scan rate 27

4.8 อิเล็กโทรฟิโรแกรมของโลหะ lead (II), cadmium (II) และ copper (II) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM สารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1100 V ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตรวจวัดที่ -0.8 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon 28

4.9 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนต่อกระแสที่เกิดขึ้นของ cadmium (II) ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1000 V ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตรวจวัดที่ -0.8 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed Carbon 30

4.10 อิเล็กโทรฟิโรแกรมของ lead(II) cadmium(II) ion และcopper(II) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM ที่ศักย์ไฟฟ้าตรวจวัด (a) -0.99 V (b) -0.85 (c) -0.80 (d) -0.75 (e) -0.70 V ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1000 V 30

4.11 อิเล็กโทรฟิโรแกรมของสารละลาย lead(II)cadmium(II) ion
และcopper(II) ที่ความเข้มข้น 1 mM ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก
(a) 1200, (b) 1100, (c) 1000 V 32
4.12 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น lead (II)
กับค่ากระแสไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1200 V ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัดที่
-0.8 V ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM 32
4.13 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น cadmium (II)
กับค่ากระแสไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1200 V ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัดที่
-0.8 V ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM 33
4.14 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น copper (II)
กับค่ากระแสไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1200 V ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัดที่
-0.8 V ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM 33

คำอธิบายสัญญาลักษณ์

i	-	current (A)
i_{pa}	-	anodic peak current (A)
i_{pc}	-	cathodic peak current (A)
E_p	-	peak potential (V)
E_{pa}	-	anodic peak potential (V)
E_{pc}	-	cathodic peak potential (V)
F	-	Faraday constant (96,484.6 C equiv^{-1})
A	-	area of electrode (cm^2)
D	-	diffusion coefficient (cm^2 s^{-1})
ν	-	kinematic viscosity of the liquid (cm^2 s^{-1})
υ	-	scan rate (V sec^{-1})
ω	-	angular velocity of the disk (radians per second)
C	-	solution concentration (mol dm^{-3})
ppm	-	part per million
ppb	-	part per billion
mL	-	milliter
µL	-	microliter
g	-	gram
µg	-	microgram

µA	-	microamp
nA	-	nanoamp
µm	-	micrometer
µM	-	micromolar
nm	-	nanometer
i.d.	-	internal diameter
r^2	-	correlation coefficient
MES	-	2-Morpholinoethanesulfonic acid
L-his	-	(s)-2-Amiono-3-(4-imidazyl)propionic acid
V	-	volt

บทนำ

1.1 บทนำ

การวิเคราะห์ในระดับไมโคร (micro total analysis) ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากมีขนาดเล็ก ใช้ปริมาณสารในการวิเคราะห์น้อยและสามารถวิเคราะห์สารได้ในเวลาอันรวดเร็ว เทคนิคที่ใช้แยกสารในระดับไมโคร ได้แก่ คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (capillary electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารโดยอาศัยการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (Microchip capillary electrophoresis) เป็นส่วนหนึ่งของคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสโดยที่สารเคลื่อนที่แตกต่างกันภายในช่องที่มีขนาดเล็กซึ่งเทคนิคนี้ได้รับความนิยมนำมาใช้ในการแยกสารที่อยู่ในอาหารและสิ่งแวดล้อม

งานวิจัยแรกของเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสในปี 1992 แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาระยะเวลาที่ใช้ในการแยกสาร สามารถแยกได้อย่างรวดเร็ว [1] ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ในระดับไมโครและยังสามารถวิเคราะห์สารประกอบได้ [2-5] ต่อมามีการพัฒนามาเป็นไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสซึ่งมีการพัฒนาในด้านของส่วนประกอบและวัสดุที่ใช้ทำไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

โลหะหนักที่เจือปนในอาหารและสิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดความวิตกกังวล โดยทั่วไปโลหะหนักจะไม่ถูกสลายด้วยกระบวนการทางชีววิทยา โลหะหนักสามารถสะสมในมนุษย์ได้ จากการที่มนุษย์บริโภคพืชและน้ำที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสุขภาพ เช่น ไตวาย อาการเป็นพิษเรื้อรัง ตับถูกทำลาย ด้วยเหตุนี้องค์การอนามัยโลก จึงได้มีข้อกำหนดเรื่องการควบคุมปริมาณโลหะหนักเช่น ตะกั่ว แคดเมียม โครเมียม และโลหะหนักอื่น ๆ ในอาหารเพื่อความปลอดภัยแก่สาธารณชน

ตะกั่วและแคดเมียมเป็นโลหะหนักที่พบมากบนโลกและมีความเป็นพิษ ถ้าในอาหารมีความเข้มข้นของโลหะนี้มากจะเป็นสาเหตุให้เกิดความเจ็บป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ โรคไต โรคเกี่ยวกับระบบประสาท และกระดูก [6,7] นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุในการเกิดโรคมะเร็ง ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ (การผ่าเหล่า) และเป็นสาเหตุของความพิการของทารกในครรภ์ [8] ทองแดงและโลหะอื่นในปริมาณน้อยเป็นโลหะที่มีความจำเป็นต่อร่างกายมนุษย์และมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาการเผาผลาญสารภายในเซลล์ [9] ความไม่สมดุลของทองแดงสามารถเป็นสาเหตุให้เกิดความเจ็บป่วยรุนแรง [10] เหตุผลหลักที่ต้องมีการเฝ้าระวังระดับความเป็นพิษของโลหะหนักในอาหารเนื่องจากมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น แหล่งสร้างมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมมา จากโรงงานอุตสาหกรรมและการจราจร การเกษตร ดังนั้นการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนักในอาหารจึงต้องการวิธีการตรวจวัดที่ง่าย มีความไวและมีความแม่นยำ

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์โลหะหนักมีอยู่หลายเทคนิค เช่น atomic absorption และ emission spectrometry, mass spectrometry, electrochemical methods (potentiometry, voltammetry), colorimetry และ ion chromatography ซึ่งเทคนิคที่กล่าวมาส่วนใหญ่ไม่เหมาะสมกับการเคลื่อนย้าย (portable) เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างมีการขนส่งสารตัวอย่างเข้าสู่ห้องปฏิบัติการซึ่งอย่างก่อให้เกิดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ทำให้ผลการวิเคราะห์นั้นคาดเคลื่อนจากความเป็นจริง แต่ในเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสที่ในงานวิจัยนี้เสนอนั้นมีขนาดเล็กสามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวกและตรวจวัดในสถานที่เก็บตัวอย่างได้และง่ายต่อการตรวจวัดรวมทั้งได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำลดปัญหาการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมจากการขนส่งสารตัวอย่าง

ไมโครชิพสามารถวิเคราะห์โลหะหนักในน้ำซึ่งเป็นการพัฒนามาจากคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสแบบเดิม [11] ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสสามารถสร้างจากวัสดุหลายชนิดโดยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของวัสดุที่นำมาทำต้องไม่นำไฟฟ้าและไม่ดูดซับน้ำ เช่น แก้ว(glass) พอลิเมอร์ (polymer) ได้แก่ poly (dimethylsiloxane) [12], poly (methyl methacrylate) [13], polycarbonate [14], cyclic olefin polymers [15], SU-8 [16] และ polyimide [17] ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ไมโครชิพที่ทำจากแก้วเพื่อวิเคราะห์สารโลหะหนัก

ในด้านการบริโภคสินค้าประเภทเครื่องดื่มองค์การอนามัยโลกมีการกำหนดปริมาณการตกค้างของโลหะหนักในสินค้านำเข้าและส่งออกเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค เทคนิคไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสสามารถนำมาตรวจวัดโลหะหนักได้เช่นกันเมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ผลิตสินค้า

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้เสนอเทคนิคไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดโลหะหนักในตัวอย่างน้ำที่สามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง ใช้งานได้นาน และใช้สารปริมาณน้อยลดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์โลหะหนักที่มีความไวในการตรวจวัดสูง ราคาถูก และมีขนาดเล็กสามารถพกพาได้

2. ประยุกต์ใช้ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรีหาปริมาณโลหะหนักในเครื่องดื่ม

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ประยุกต์ใช้ไมโครซิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรีเพื่อหาปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่มโดยใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีนเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ประเภทไมโครซิพที่เลือกใช้ทำจากแก้ว

ทำการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของโลหะหนักด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ได้แก่ การศึกษาผลของพีเอช ผลของความเข้มข้น และสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีนเป็นขั้วไฟฟ้าทำงานในไมโครซิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสที่ทำการตรวจวัดโลหะหนักด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรี ทำการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตรวจวัด ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกโลหะหนัก ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ระยะเวลาการนำสารเข้าไมโครซิพ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดและหาความแม่นยำ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดโลหะหนักด้วยไมโครซิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรีนำมาประยุกต์หาปริมาณโลหะหนักในเครื่องดื่ม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์โลหะหนักด้วยเทคนิคไมโครซิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรีและสามารถนำมาประยุกต์ใช้หาปริมาณโลหะหนักในเครื่องดื่มได้

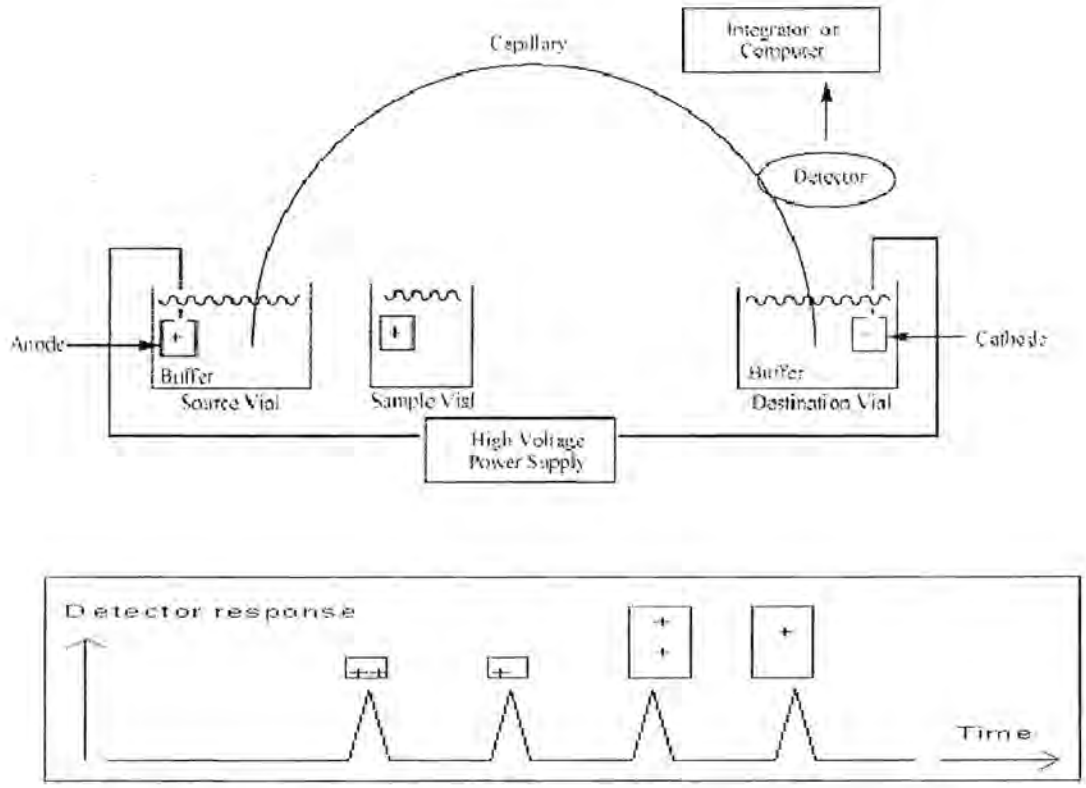
ทฤษฎี

2.1 หลักการของคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary electrophoresis) [18] เป็นเทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์สารมีการพัฒนามาจากอิเล็กโทรฟอริซิส (Electrophoresis) ที่ใช้กันมานาน และยังใช้กันมากถึงปัจจุบันในการวิเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลิก ในคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสนั้นการแยกสารเกิดขึ้นภายในคะพิลลารีซึ่งมีขนาดเล็กมาก (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 - 100 mm) ทำให้สามารถกระจายความร้อนที่เกิดจากการที่มีกระแสไฟฟ้าผ่านได้ดีกว่าอิเล็กโทรฟอริซิสแบบดั้งเดิม ผลที่ตามมาคือลดการแพร่ (diffusion) ของสารที่ทำการวิเคราะห์ ทำให้ได้ประสิทธิภาพในการแยกสูง (High Efficiency) และสมบูรณ์ (High Resolution) หลักการของคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสเป็นเช่นเดียวกับ อิเล็กโทรฟอริซิส คือ สารที่มีขนาดและประจุต่างชนิดกันจะแสดงลักษณะการเคลื่อนที่ต่างกัน เนื่องจากแรงดูดและแรงผลักเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า (Electric Field)

Electrophoresis หมายถึง การเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุที่อยู่ในรูปของสารละลายหรือแขวนลอยอยู่ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยมีไฟฟ้าวิ่งผ่าน แคตไอออนในสารละลายจะวิ่งไปที่ขั้วแคโทดซึ่งเป็นขั้วลบ แอนไอออนจะไปที่ขั้วแอโนดซึ่งเป็นขั้วบวก ส่วนอนุภาคที่เป็นกลางจะไม่วิ่งเข้าสู่ขั้วใดเลย

หลักการของคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส เกี่ยวข้องกับการให้ศักย์ไฟฟ้าสูงตั้งแต่ 10 ถึง 30 กิโลโวลต์ คะพิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 25 ถึง 100 ไมโครเมตร บรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยที่ปลายทั้ง 2 ข้าง ของคะพิลลารีจะจุ่มอยู่ในภาชนะบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าจะทำ ให้ไอออนในตัวอย่างวิ่งไปที่ขั้วไฟฟ้าแต่ละขั้ว ตัววัดสัญญาณส่วนใหญ่เป็นแบบยูวี ซึ่งให้รูปแบบการตอบสนองเป็นสัญญาณต่อเวลาเรียกว่า electropherogram ส่วนการไหลของอิเล็กโทรไลต์ไปตามคะพิลลารีนี้ เป็นไปตามรูปแบบ electroosmotic flow หรือ EOF ซึ่งทำให้เวลาในการวิเคราะห์ลดลง



รูปที่ 2.1 อุปกรณ์และสัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

2.1.1 การเคลื่อนที่ของสารภายในคะพิลลารี

การเคลื่อนที่ของสารภายในคะพิลลารีแบ่งเป็น 2 ประเภท

1. ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility)

ในการแยกสารด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอริซิส เมื่อให้ความต่างศักย์ที่ขั้วไฟฟ้าที่จุ่มอยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ทำให้เกิดความเข้มของสนามไฟฟ้า E (electric field strength) และไอออนของสารจะเคลื่อนด้วยแรงไฟฟ้า F_E ดังสมการ

$$F_E = zeE$$

z คือ ค่าประจุของไอออนของสาร e คือ ค่าคูลอมบ์ของอิเล็กตรอน

จะเกิดแรงต้านการเคลื่อนที่เนื่องจากความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ F_F ซึ่งขึ้นอยู่กับรัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of the ion, r_h) ความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity, v_{ep}) และความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (η) ในกรณีที่อนุภาคทรงกลม ค่า F_F ดังสมการ

$$F_F = 6\pi\eta r_h v_{ep}$$

ระบบจะสมดุลภายในมิลลิวินาที แรงไฟฟ้าและแรงต้านมีค่าเท่ากันแต่ทิศทางตรงกันข้าม

$$F_E = F_F$$

$$zeE = 6\pi\eta r_h v_{ep}$$

$$v_{ep} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} E$$

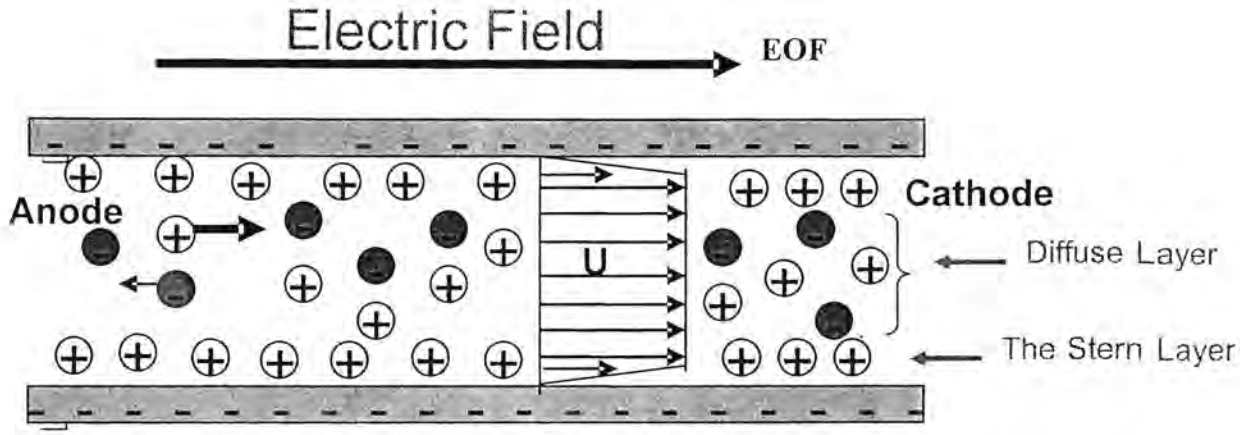
จะเห็นได้ว่าในตัวกลางชนิดหนึ่งๆ นั้นความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารชนิดเดียวกันขึ้นอยู่กับความเข้มของสนามไฟฟ้า ดังนั้นการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารชนิดในเทคนิคอิเล็กโทรฟอริซิส จะเปรียบเทียบเป็นค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าหรือความสามารถในการเคลื่อนที่ (electrophoretic mobility หรือ mobility, μ) ซึ่งนิยามว่าเป็นความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารภายใต้ความเข้มของสนามไฟฟ้า 1 V m^{-1} และในตัวกลางหนึ่งๆความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารต่างๆ ขึ้นอยู่กับค่าประจุรัศมีไฮโดรไดนามิกและความหนืดของตัวกลาง ดังสมการ

$$v_{ep} = \mu E$$

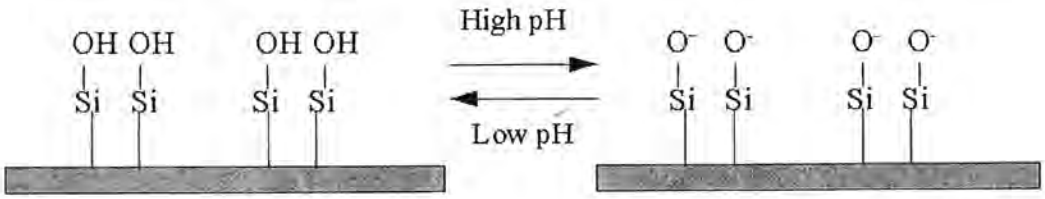
$$\mu = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h}$$

2. อิเล็กโทรออสโมซิส (Electroosmosis)

อิเล็กโทรออสโมซิสเกิดจากผนังของคะพิลลารีซึ่งทำ ด้วย fuse silica ประกอบด้วย silanol group (Si-OH) ซึ่งจะแตกตัวเป็นไอออนเมื่อบรรจุอิเล็กโทรไลต์ที่มี pH สูง โดยทำให้ผนังของคะพิลลารีมีประจุลบ ซึ่งจะดึงดูดไอออนบวกจากสารละลายตัวกลางมาเกาะที่ผิว เกิดเป็นชั้นของไอออน 2 ชั้น (Double Layers) คือชั้นที่เกาะติดแน่นกับผิวของคะพิลลารี (Fixed Layer หรือ The Stern Layer) และชั้นที่เกาะอย่างหลวมๆ (Diffuse Layer) เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเข้าสู่คะพิลลารี ไอออนบวกที่อยู่กันหนาแน่นแต่เคลื่อนที่ได้ในชั้น Diffuse Layer และโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบจึงเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วแคโทด เป็นผลให้สารละลายเคลื่อนที่ไปยังตัววัดสัญญาณ นั่นคือเป็นการผลักดันไอออนไปตามคะพิลลารีผ่านตัววัดสัญญาณ ส่วนอิเล็กโทรไลต์ที่มี pH ต่ำ silanol จะไม่แตกตัว ดังนั้นอัตราการไหลจึงช้ามากหรือสารละลายอาจไม่เคลื่อนที่เลย เรียกปรากฏการณ์ของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำหรือสารละลายนี้ว่า อิเล็กโทรออสโมซิส และเรียกการเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลนี้ว่าการไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF)



รูปที่ 2.2 แสดงไดอะแกรม Electroosmotic flow (EOF)



รูปที่ 2.3 แสดงกระบวนการแตกตัวของ Silanol

2.1.2 **ความสามารถของการเคลื่อนที่ด้วยอิเล็กโทรออสโมซิส** (electroosmosis mobility, μ_{eo})

ความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic velocity, v_{eo}) ที่ระยะ X ใดๆ จากผิวคะพิลลารีดังสมการ

$$v_{eo} = -\frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} E(1 - e^{-KX})$$

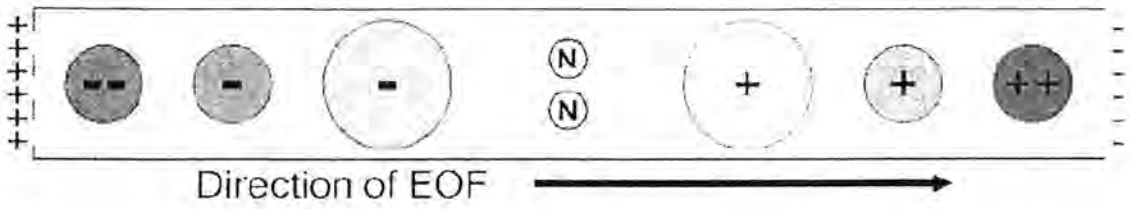
ε คือ permittivity ของตัวกลาง K คือ ส่วนกลับของความหนาของ diffusion layer

η คือ ความหนืดใน double layer ζ คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้ามีความสัมพันธ์กับความหนาของ diffusion layer

ความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิสที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 1 Vm^{-1} เรียกว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วยอิเล็กโทรออสโมซิส หรือสัมประสิทธิ์ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmostic mobility หรือ electroosmotic coefficient, μ_{eo})

$$v_{eo} = \frac{-\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} E$$

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{-\varepsilon\zeta}{4\pi\eta}$$



รูปที่ 2.4 แสดงลำดับการตรวจวัดไอออนบวก ลบ และกลาง ที่เคลื่อนที่ด้วย electrophoretic และ electroosmotic flow ตามขนาดไอออนและจำนวนไอออน

2.1.3 **ไมเกรชันไทม์** (migration time, t_m)

เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเคลื่อนตรวจวัดจะแสดงผลออกมาดังรูปที่1 ซึ่งเรียกว่า อิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) และระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่จากปลายคะพิลลารีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด เรียกว่า ไมเกรชันไทม์ การเคลื่อนที่ภายในคะพิลลารีส่วนใหญ่สารจะเคลื่อนที่ภายใต้อิทธิพลของ EOF ด้วยดังนั้นผลรวมของความเร็วของสาร (v_{net}) ดังสมการ

$$v_{net} = v_{ep} + v_{eo}$$

$$\mu_{net} = \mu + \mu_{eo}$$

ไมเกรชันไทม์ (t_m ,s) มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ

$$t_m = \frac{l}{v_{net}} = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}$$

L คือ ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี (m)

l คือ ความยาวจากปลายคะพิลลารีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด

V คือ ศักย์ไฟฟ้า (V)

ในทางปฏิบัติ เมื่อทราบไมเกรชันไทม์จากอิเล็กโทรฟีโรแกรม จะสามารถคำนวณ μ_{eo} และ μ ได้ดังสมการ

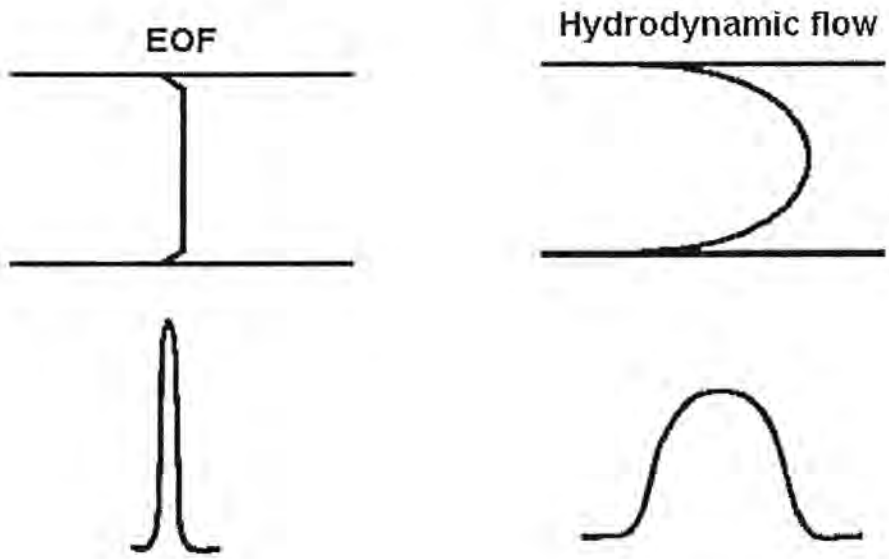
$$\mu_{eo} = \frac{lL}{Vt_{eo}}$$

$$\mu = \mu_{net} - \mu_{eo} = \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}}\right)\frac{lL}{V}$$

t_{eo} คือ ไมเกรชันไทม์ของสารที่ไม่มีประจุหรือ EOF marker

2.1.4 **ลักษณะการเคลื่อนที่** (flow profile)

ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารในคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสเป็นแบบ Flat Flow Profile ซึ่งแตกต่างจากการไหลใน HPLC ที่ลักษณะการเคลื่อนที่เป็นแบบ Parabolic Flow Profile ที่ใช้ Pump เป็นตัวผลักดันทำให้เกิดการไหลของ Mobile Phase ซึ่งการไหลโดยใช้ Pump จะเป็นแบบที่เป็นดังนี้เนื่องจากอัตราเร็วของ Mobile Phase ตรงกลาง Column จะสูงกว่าที่ผนังซึ่งมีแรงเสียดทาน (Shear Force) ผลที่ตามมาคือ โซนของสารที่เกิดจากการแยกในคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสจะแคบกว่าใน HPLC จึงทำให้ประสิทธิภาพในการแยก (Efficiency) ของคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสดีกว่า HPLC ในส่วนหนึ่ง



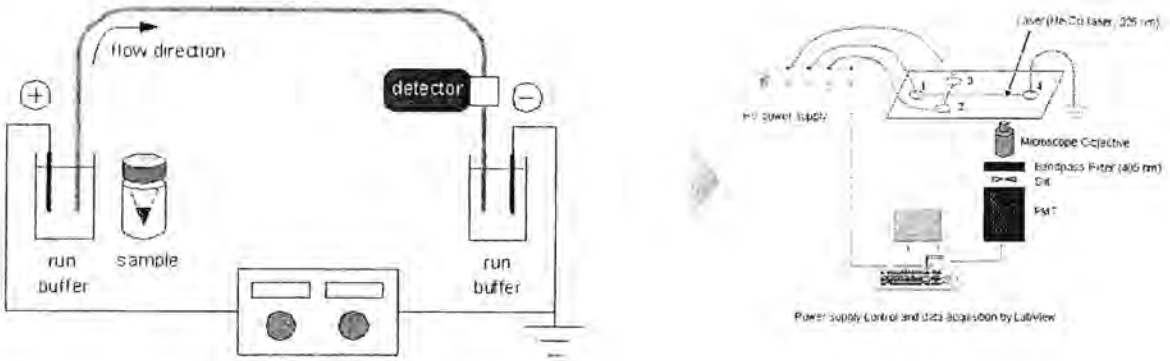
รูปที่ 2.5 แสดงรูปแบบการไหลและลักษณะ peak ของ electroosmotic flow และ hydrodynamic flow

2.1.5 ประเภทของเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสประเภทที่ใช้ในการแยกสารคือ Capillary Zone Electrophoresis เป็นประเภทที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายโดยอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของสารตัวอย่าง ตัวกลางที่ใช้ในคะพิลลารีเป็นบัฟเฟอร์ทั่วไป หรือบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารเติมแต่งบางชนิดที่ไม่ทำให้กลไกของการแยกเปลี่ยนแปลงไป สารเติมแต่งบัฟเฟอร์ เช่นตัวทำละลายอินทรีย์ สารลดอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis suppressant) สารเติมแต่งไครัลบางชนิด เป็นต้น คะพิลลารีที่ใช้ เช่น fused silica ซึ่งผิวด้านในของคะพิลลารีประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันซิลินอล ภายใต้สภาวะของการแยกสารที่ pH ของบัฟเฟอร์มากกว่า 2 ผิวด้านในของคะพิลลารีเป็นประจุลบเนื่องจากการไอออไนซ์ของไฮโดรเจนของหมู่ซิลินอล เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อแยกสารตัวอย่าง ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า อิเล็กโทรออสโมซิส และการไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (EOF) มีทิศไปทางขั้วแคโทด โดยทั่วไปในการแยกสาร จะให้ขั้วไฟฟ้าด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทด (ขั้วลบ) สารตัวอย่างเป็นแคทไอออน (สารที่มีประจุบวก) จะมีแรงดึงดูดให้เคลื่อนที่ไปทางขั้วแคโทด และผลรวมของความเร็วของการเคลื่อนที่ของแคตไอออนจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากผลของ EOF มากกว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของแอนไอออน ที่ภาวะเช่นนี้ แคทไอออนที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้ามากกว่า หรือค่าอัตราส่วนของประจุต่อขนาดของไอออนมากกว่า จะมีลำดับการเคลื่อนที่ออกมาก่อน ตามด้วยสารที่โมเลกุลเป็นกลางซึ่งจะไม่เกิดการแยก และแอนไอออน โดยแอนไอออนที่มีค่าอัตราส่วนของประจุต่อขนาดของไอออนน้อยกว่า จะมีลำดับการเคลื่อนที่ออกมาก่อน อย่างไรก็ตามลำดับการเคลื่อนที่ของสารประจุลบอาจจะกลับกันได้ ถ้าค่า EOF น้อยกว่าค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าและกลับขั้วไฟฟ้าให้ขั้วทางด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแอโนด

2.2 ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (Microchip Electrophoresis)

ลักษณะการแยกของไมโครชิพนั้น จะใช้ท่อไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส โดยอาศัยหลัก capillary electrophoresis และ liquid chromatography สำหรับคะพิลลารีที่ใช้จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่กี่สิบไมโครเมตร จึงทำให้ใช้ปริมาณสารน้อยมากระดับพิโกลิตรเท่านั้น

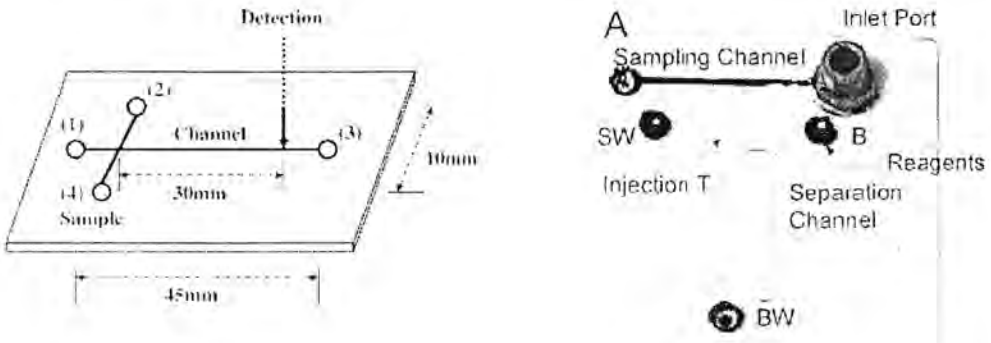


Conventional CE system ⟹ **micro CE**

รูปที่ 2.6 คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสและไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

จากรูปจะเห็นว่าไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสนั้นมีการปรับปรุงมาจากระบบคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส แต่มีข้อดีเพิ่มขึ้นกว่าแบบเดิม คือ ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนต์น้อย วิเคราะห์ได้รวดเร็วกว่าเดิม สามารถวิเคราะห์แบบ in situ ได้ และในกรณีที่ไมโครชิพเป็นพลาสติก สามารถใช้แล้วทิ้งได้เลย

ส่วนประกอบของระบบไมโครชิพที่สำคัญได้แก่ microchip, high voltage supply พร้อมขั้วไฟฟ้า และเครื่องตรวจวัด สำหรับไมโครชิพนั้นสามารถดูรายละเอียดได้จากรูปด้านล่างดังนี้



รูปที่ 2.7 ส่วนประกอบของไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

ไมโครชิพจะประกอบไปด้วยท่อขนาดเล็ก โดยที่ปลายของท่อจะมีลักษณะเป็นช่องว่างสำหรับใส่สารตัวอย่าง รีเอเจนต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์และสารที่เหลือทิ้ง ภายในช่องนี้เมื่อจะทำการวิเคราะห์จะใส่ขั้วไฟฟ้าเพื่อควบคุมการไหลของสาร โดยท่อคะพิลลารีจะมีทั้งส่วนที่ทำหน้าที่เป็น injection, separation และ detection

2.2.1 ลักษณะไมโครชิพ

สำหรับรูปแบบของคะพิลลารีจะมีรูปแบบหลักอยู่ 3 แบบ คือ channel, tee และ cross

Channel Tee Cross

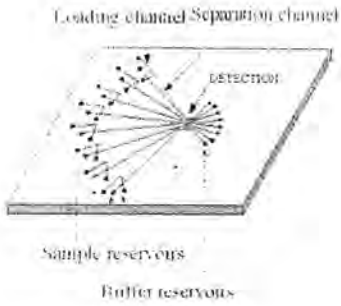
โดยที่แบบ Channel จะเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแยกขึ้น แบบ Tee เป็นส่วนที่เกิดการผสมกันของสาร และ Cross เป็นส่วนที่ใช้เป็นที่ฉีดสาร ซึ่งรูปแบบทั้งสามแบบนี้สามารถนำมารวมกันเพื่อให้เกิดการวิเคราะห์แบบต่าง ๆ ได้ ดังรูป

แบบ Cross กับ Channel แบบ Tee, Cross และ Channel แบบ Cross, Channel และ Tee

รูปที่ 2.8 รูปแบบไมโครชิพ

ในการนำรูปแบบมารวมกันนั้นทำให้สามารถวิเคราะห์สารได้หลายแบบ เช่น แบบ Cross กับ Channel เป็นการฉีดสารและทำการแยก แบบ Tee, Cross และ Channel เป็นการผสมสารก่อนทำการฉีดสารและทำการแยก (precolumn) แบบ Cross, Channel และ Tee เป็นการฉีดสารและทำการแยกสารก่อนนำมาผสมกับรีเอเจนต์ (postcolumn)

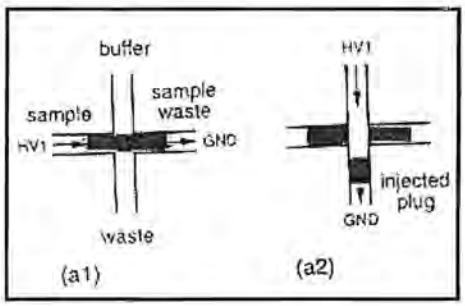
นอกจากนี้ยังสามารถนำ Channel มารวมกันได้ เพื่อวิเคราะห์สารได้หลายชนิดใน microchip เดียวกัน เรียก "multi-microchannel"



รูปที่ 2.9 multi-microchannel

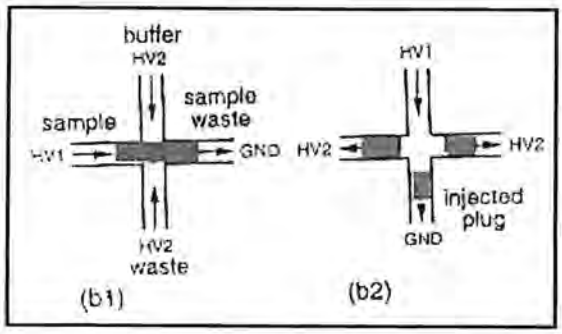
2.2.2 การบรรจุสารด้วยศักย์ไฟฟ้า

ในการควบคุมการไหลของสารภายในคะพิลลารีนั้น สามารถควบคุมได้โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าเข้าไปในปริมาณต่าง ๆ เพื่อคุมทิศทางการไหลของสารรวมทั้งการฉีดสารตัวอย่างด้วย การฉีดสารตัวอย่างนั้นมีหลายแบบ เช่น simplest, pinched และ variable-volume injection เป็นต้น



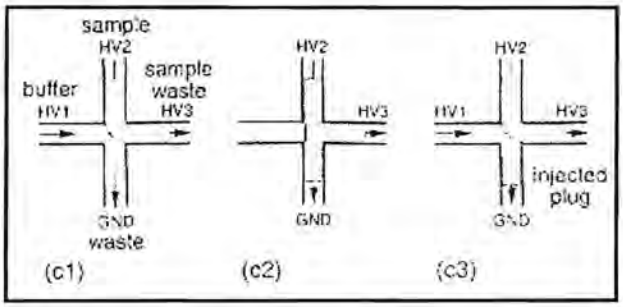
รูปที่ 2.10 แบบ simplest injection

การ injection ที่ให้ศักย์ไฟฟ้าจุดเดียวที่ sample reservoir ให้ sample เคลื่อนที่จาก sample reservoir ไป sample waste หลังจากนั้นเมื่อ sample เคลื่อนมาผ่าน cross แล้วจึงเปลี่ยนจุดที่ให้ศักย์เป็น reservoir ของ buffer วิธีนี้ได้ %RSD~2% เนื่องจากยังมี sample บางส่วนที่อาจไหลเข้าไปได้อีก



รูปที่ 2.11 แบบ Pinched injection

การ injection แบบ pinched นี้จะให้ศักย์ไฟฟ้าทั้งหมดสามจุด คือ sample reservoir(HV1) buffer reservoir (HV2) และ waste reservoir(HV2) โดย HV1>HV2 เพื่อให้ sample เคลื่อนที่จาก sample reservoir ไป sample waste เมื่อ sample เคลื่อนมาผ่าน cross แล้ว จะเพิ่มศักย์ไฟฟ้าที่ buffer reservoir เป็น HV1 เพื่อให้ sample ถูกพาเข้าสู่ channel โดยจะให้ศักย์ที่ sample reservoir และ sample waste ในการป้องกัน sample บางส่วนไหลเข้ามาทำให้ได้ %RSD~0.3%



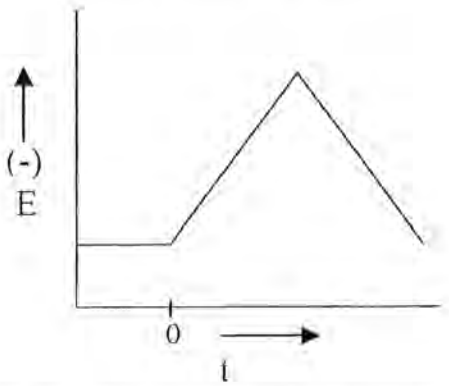
รูปที่ 2.12 แบบ variable-volume injection

การ injection แบบ variable-volume นี้จะมี sample reservoir ที่มี channel เดียวกับ GND มีการให้ศักย์สามจุด คือ buffer reservoir(HV1) sample reservoir (HV2) และ sample waste(HV3) โดยHV1>HV2>HV3 เพื่อให้ sample เข้าไปสู่ waste และเมื่อต้องการ inject จึงไม่ให้ศักย์ HV1 sample จะถูกพาเข้าสู่ channel หลังจากนั้นจึงให้ศักย์ HV1 simple ก็จะถูกผลักไปที่ sample waste วิธีนี้สามารถกำหนดปริมาณที่ต้องการในแต่ละครั้งได้ด้วยการควบคุมเวลาจาก c2 ถึง c3

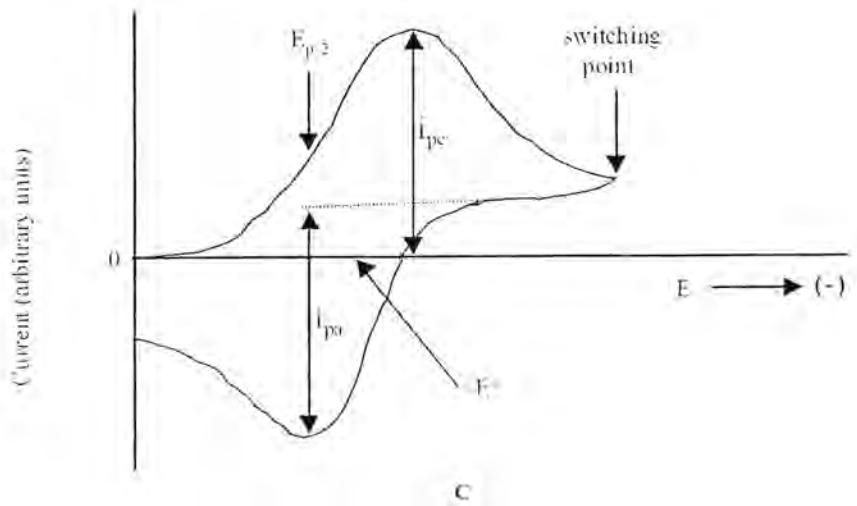
2.3 เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical technique)

2.3.1 ไซคลิกโวลแทมเมตรี (cyclic voltammetry)

เครื่องมือและเทคนิคต่าง ๆ ของการทำไซคลิกโวลแทมเมตรีเหมือนกับลิเนียร์สวีปโพลาโรกราฟี โวลเทจโมแกรมมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมเช่นกัน แต่แตกต่างจากสามเหลี่ยมของลิเนียร์สวีปโพลาโรกราฟี คือ เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นจนถึงมากที่สุด จากนั้นค่อย ๆ ลดลงด้วยอัตราเร็วเท่ากัน โวลเทจโมแกรมที่ได้จึงมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมหน้าจั่วดังรูปที่ 2.13 เมื่อเริ่มสแกนโวลเทจก็เริ่มมีกระแสเกิดขึ้น เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าสูงสุด (ถึงยอดของสามเหลี่ยม) ก็จะมีกระแสเนื่องจากเกิดปฏิกิริยารีดักชันเกิดขึ้นสูงสุดมีลักษณะเป็นพีกและเมื่อลดศักย์ไฟฟ้าด้วยอัตราเร็วเท่าเดิมกระแสก็จะค่อย ๆ ลดลงจนถึงต่ำสุดเพราะเกิดปฏิกิริยาในทิศทางตรงกันข้าม (ผันกลับได้) มีลักษณะเป็นพีกเช่นกัน แต่กลับทิศทางกับพีกแรก ซึ่งมีลักษณะที่สมมาตรกัน แต่ถ้าปฏิกิริยาผันกลับไม่ได้จะไม่เกิดพีก เมื่อสแกนให้ศักย์ไฟฟ้าลดลง และถ้าปฏิกิริยาผันกลับได้ไม่สมบูรณ์ ลักษณะพีกที่เกิดขึ้นจะไม่สมมาตรกัน ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.13 โวลแทมโมแกรมของไซคลิกโวลแทมเมตรี



รูปที่ 2.14 ไซคลิกโวลแทมโมแกรม

พารามิเตอร์ที่สำคัญของไซคลิกโวลแทมโมแกรม ได้แก่ กระแสที่ยอดแอโนดิก (anodic peak current ,i_{pa}) กระแสที่ยอดแคโทดิก (cathodic peak current, i_{pc}) ศักย์ไฟฟ้าที่ยอดแอโนดิก (anodic peak potential, E_{pa}) ศักย์ไฟฟ้าที่ยอดแคโทดิก (cathodic peak current,E_{pc}) , ศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นการสแกน(initial potential,E_i) formal potential ($E^{o'}$)

จากเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีสามารถศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ว่าเป็นแบบใด reversible, quasireversible และ irreversible

- ระบบ reversible กระแสที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ รีดักชัน จะที่ค่าเท่ากัน ซึ่งกระแสที่เกิดขึ้นนี้เป็นกระแสจากการ diffusion และได้พีกที่สมมาตร สมการที่เกี่ยวของในระบบนี้

$$i_p = (2.69\times10^5)n^{3/2}AD^{1/2}\ CV^{1/2}$$

i_p = peak current ,A

n = electron stoichiometry , eq/mol

A = electrode area,cm2

D = diffusion coefficient,cm2/s

C = concentration, mol/cm2

V = scan rate,V/s

จากสมการดังกล่าวจะเห็นว่ากระแสที่เกิดขึ้นจะแปรผันตาม $C,V^{1/2}$ แต่ค่า E_p จะไม่ขึ้นอยู่กับ V

- ระบบ irreversible

กระแสที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ รีดักชัน จะที่ค่าเท่ากันและได้เพื่อที่ไม่สมมาตร สมการที่เกี่ยวของในระบบนี้

$$i_p = (2.99\times10^5)\alpha^{1/2}AC^*D^{1/2}v^{1/2}$$

$$E_p = E^{o'} - \frac{RT}{\alpha F}\left[0.780 + \ln\left(\frac{D^{1/2}}{ko}\right) + \ln\left(\frac{\alpha FV}{RT}\right)^{1/2}\right]$$

จากสมการดังกล่าวจะเห็นว่ากระแสที่เกิดขึ้นจะแปรผันตาม $C,V^{1/2}$ แต่ค่า E_pขึ้นอยู่กับ $V^{1/2}$

- นอกการกระแสที่เกิดจากการ diffusion แล้วยังมีกระแสที่เกิดจาก electroactive species อื่นๆ ที่ทำหน้าที่คล้าย capacitor เรียกว่า charging current (i_c) มีสมการที่เกี่ยวข้อง

$$i_c = AC_dV$$

C_d = differential capacitance of the double layer

จากสมการดังกล่าวจะเห็นว่ากระแสที่เกิดขึ้นจะแปรผันตาม $V^{1/2}$

เครื่องมือที่ใช้สำหรับไซคลิกโวลแทมเมตรี ประกอบด้วย

1) เซลล์อิเล็กโตรไลติก โดยทั่วไปเป็นเซลล์ชนิดสามอิเล็กโทรด อิเล็กโทรดทำงานส่วนใหญ่เป็น solid disk electrode นิยมใช้ชนิด แพลทินัม กล๊าสซีคาร์บอน
2) แหล่งกำเนิดสัญญาณ หน้าที่ให้สัญญาณศักย์ไฟฟ้าแบบรอบกับเซลล์ที่ศึกษา
3) โพเทนชิออสแตท เป็นวงจรควบคุมศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ในช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่ต้องการ
4) แอมมิเตอร์ ทำหน้าที่วัดกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งเปลี่ยนแปลงขณะเกิดปฏิกิริยา
5) เครื่องบันทึก ทำหน้าที่บันทึกโวลแทมโมแกรม

2.3.1.1 การประยุกต์ใช้ประโยชน์

ไซคลิกโวลแทมเมตรีเป็นเทคนิคที่ใช้อย่างกว้างขวางที่สุดสำหรับการตรวจหาข้อมูลเชิงกายภาพของปฏิกิริยาเคมี ข้อดีของ CV เกิดจากความสามารถของวิธีที่ให้ข้อมูลที่ต้องการพิจารณาอย่างรวดเร็วเกี่ยวกับอุณหพลวัตศาสตร์ของกระบวนการรีดอกซ์ และจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาที่มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่แตกต่างกัน ซึ่ง CV เป็นวิธีที่ถูกใช้กันบ่อยครั้งในการศึกษาเชิงเคมีไฟฟ้า ลักษณะสำคัญของ CV คือ การหาตำแหน่งอย่างรวดเร็วของศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ของสปีชีส์ที่มีฤทธิ์ทางไฟฟ้าและสะดวกในการประเมินผลของตัวกลางที่มีผลต่อกระบวนการรีดอกซ์ แต่ CV เป็นวิธีที่ใช้น้อยมากในการวิเคราะห์เชิงประมาณ

2.3.2 แอมเพอโรเมตรี (Amperometry)

เป็นเทคนิคที่ประยุกต์โดยใช้หลักการของโวลแทมเมตรี ด้วยการให้ศักย์ไฟฟ้าที่คงที่แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ที่เพียงพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าและวัดค่ากระแสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (19)

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 pH meter (Metrohm)

3.1.2 Milli-Q water system, model Millipore ZMQS 5 VOOY, Millipore, USA.

3.1.3 High-voltage

3.1.4 เครื่องชั่ง (Metler)

3.1.5 Sonicator (USA)

3.1.6 0.45 μm Nylon membrane syringe filter with polypropylene (PP) housing (Orange Scientific filter)

3.1.7 0.2 μm Nylon membrane filter (Altech)

3.1.8 Teflon tubing (1/16 inch o.d., Upchurch)

3.1.9 Autolab Potentiostat (PG-30, Methrom)

3.1.10 Auto pipette และ tips (Eppendrof, Germany)

3.1.11 Digital microscope (Keyence)

3.1.12 Glassy carbon electrode (0.07 cm^2, Bioanalytical system Inc)

3.1.13 Ag/AgCl electrode (TCI) กับสะพานเกลือ

3.1.14 glass cell

3.1.15 platinum wire

3.1.16 O-ring viton (0.07 cm^2)

3.1.17 Centrifuge, CENTAURA 2, (Sanyo)

3.1.18 Microcentrifuge (MINI CENTRIFUGE, Cole Parmer)

3.2 อุปกรณ์ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

Glass chip จะประกอบด้วยส่วนที่เป็น cross 1 ส่วนและ channel 1 ส่วนสำหรับแยกสาร (16 mm x 95 mm x 2.2 mm) จาก Micralyne (model MC-BF4-001,Canada) ไมโครชิพจะมี 4 ช่องบริเวณ cross เชื่อมต่อกับช่องใส่สารและ channel สำหรับแยกสาร ที่ปลายของ channel เป็นส่วนตรวจวัดสารด้วยเทคนิคเคมีไฟฟ้า ความยาว channel ที่ใช้แยกสารยาว 90 mm ความยาวของ channel นำสารเข้า 10 mm

รูปที่ 3.1 แสดง glass chip (1) หลุมใส่สารละลายบัฟเฟอร์และสารตัวอย่าง (2) หลุมสารละลายที่แยกแล้วและส่วนการตรวจวัด (3) channel สำหรับแยกสาร (4) channel นำสารเข้า

3.2.1 **ขั้วไฟฟ้า**

Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode)

Platinum wire เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode)

Screen-printed carbon เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode)

ขั้วไฟฟ้าที่ใช้สำหรับการตรวจวัดอยู่บริเวณหลุมสารละลายที่ใช้แล้ว

3.3 **สารเคมี**

3.3.1 Lead(II)nitrate (Aldrich)

3.3.2 Cadmium sulfate (Baker Analyzed)

3.3.3 Copper(II) sulphate (BDH)

3.3.4 2-Morpholinoethanesulfonic acid ; MES (Fluka)

3.3.5 (s)-2-Amiono-3-(4-imidazyl)propionic acid ; L-histidine (Fluka)

3.3.6 Potassium hexacyanoferrate(Merck)

3.3.7 Potassium chloride (Merck)

3.3.8 Boron trioxide (Wako)

3.3.9 Acetone (Wako)

3.3.10 Sulfuric acid (Merck)

3.3.11 Acetic acid (Merck)

3.3.12 Methanol (Merck)

3.3.13 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, Riedel de Haën)

3.3.14 Potassium dihydrogen orthophosphate (BDH)

3.3.15 Di-sodium hydrogen orthophosphate-dihydrate (BDH)

3.3.16 Sodium hydroxide (Merck)

3.3.17 Hydrochloric acid (Merck)

3.3.18 Phosphoric acid (Merck)

3.3.19 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (Fluka)

3.3.20 Citric acid monohydrate (Baker analyzed)

3.3.21 A standard buffer solution pH 4 and pH 7 (Metrohm)

3.3.22 Nitric acid (Merck)

3.3.23 Pyroatechol (Fluka)

3.3.24 3,4-Dihydroxyphenethylamine hydrochloride (Dopamine, Wako)

3.3.25 Ethanol (Merck)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีในระบบ Batch

ทำการวิเคราะห์ภายใน glass cell ซึ่งมี Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Platinum wire เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย และ Screen-printed carbon เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้สารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอส (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic) และแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ scan rate 50 mVs^{-1} โดยเครื่อง Potentiostat ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน

3.4.1.1 ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของ copper (II) ion

นำ copper (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ไปวิเคราะห์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ที่ scan rate 50 mVs^{-1}

3.4.1.2 ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของ cadmium (II) ion

นำ cadmium (II) ionที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ไปวิเคราะห์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ที่ scan rate 50 mVs^{-1}

3.4.1.3 ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของ lead (II) ion

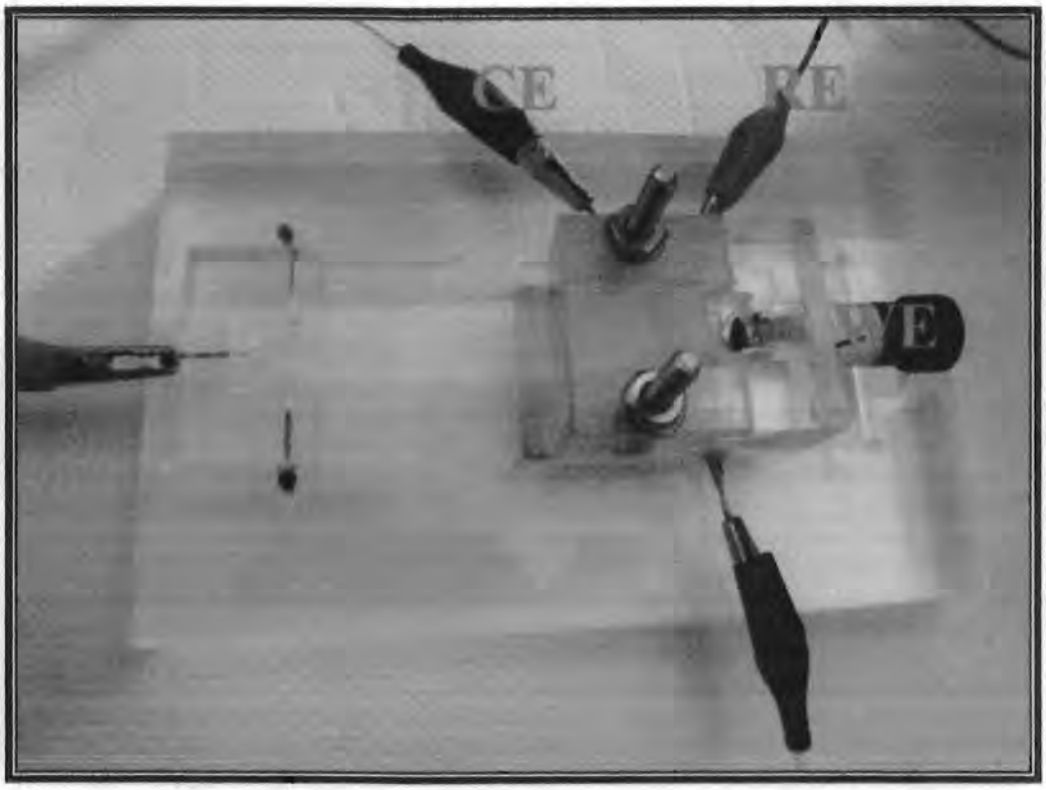
นำ lead (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ไปวิเคราะห์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ที่ scan rate 50 mVs^{-1}

3.4.1.4 ศึกษาผลของ scan rate

นำสารละลายโลหะทั้ง 3 ที่ความเข้มข้ม 1mM ไปวิเคราะห์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ที่ scan rate 10 20 50 100 200 และ 300 mVs^{-1}

3.4.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีในไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

3.4.2.1 ไมโครชิฟคะพิลลรีอิเล็กโทรฟอริซิส



รูปที่ 3.2 ไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสกับการตรวจวัดด้วยเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรี

ในรูปแสดงไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสที่ใช้ในงานวิจัย ประกอบด้วย glass chip, chip hold, high voltage power supply และ การตรวจวัดเคมีไฟฟ้า โดยนำขั้วไฟฟ้าทั้ง Ag/AgCl (RE) Platinum wire (CE) และ Screen-printed carbon (WE) สอดเข้าที่ปลายของ channel ที่ใช้แยกสาร เมื่อทำการทดลองนำสารละลายใส่หลุมบรรจุสารละลายหลังจากนั้นให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก high voltage power supply

3.4.2.2 ขั้นตอนอิเล็กโทรฟอริซิส

การเตรียม glass chip ก่อนการแยกสาร นำ deionized water ล้างตามด้วย NaOH ที่ความเข้มข้น 0.1 M และ deionized water ล้างตามอีกครั้งพร้อมทั้งทำความสะอาดหลุมสารละลาย หลังจากนั้นบรรจุสารตัวอย่าง สารละลายบัฟเฟอร์ให้เต็มหลุมให้ศักย์ไฟฟ้าแก่สารละลายด้วย high voltage power supply ที่ 1200 V ภายในเวลา 3 วินาที แล้วให้ศักย์ไฟฟ้าจากเครื่อง Potentiostat ใช้แยกสาร

ในการทดลองสารตัวอย่างเป็นสารละลายผสมโลหะ copper(II), lead(II) และ cadmium(II) ion และสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสความเข้มข้น 25 mM และแอลฮีสทีดีนความเข้มข้น 25 mM พีเอช 7 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง

3.4.2.3 **ศึกษาผลของพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีน**

3.4.2.4 **ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีน**

3.4.2.5 **ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดโลหะ** copper(II), lead(II) **และ**cadmium(II) ion

3.4.2.6 **ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการแยกโลหะ** copper(II), lead(II) **และ**cadmium(II) ion

3.4.2.7 **ศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการนำสารเข้า** channel

3.4.2.8 **ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัด** (Linearity)

3.4.2.9 **ศึกษาหาค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์** (Limit of Determination; LOD) **หาได้จาก** 3 S/N**และ ค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้** (Limit of Quantitative ; LOQ) **หาได้จาก** 10 S/N

3.4.2.10 **ศึกษาหาความแม่นยำ** (Precision) **หาได้จาก** % RSD **และ ความถูกต้อง** (Accuracy) **ในการตรวจวัดโลหะ** copper(II), lead(II) **และ**cadmium(II) ion

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{standard deviation}}{\text{Mean}} \times 100$$

3.5 **หาปริมาณโลหะ** copper(II), lead(II) **และ**cadmium(II) ion **ในเครื่องดื่ม**

นำน้ำผลไม้ 2 mL ใส่ centrifuge tube นำไป certrifuged เป็นเวลา 10 นาทีที่ 3500 rpm นำส่วนใสมา 0.5 mL ใส่ filter-centrifuge tube (0.45 μm Nylon membrane) นำไป centrifuged เป็นเวลา 5 นาที นำน้ำผลไม้ที่ผ่านการกรองมา spiked สารละลายมาตราฐานโลหะตะกั่ว แคดเมียม และทองแดง ที่ความเข้มข้น 100 200 400 800 และ 1000 μM หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

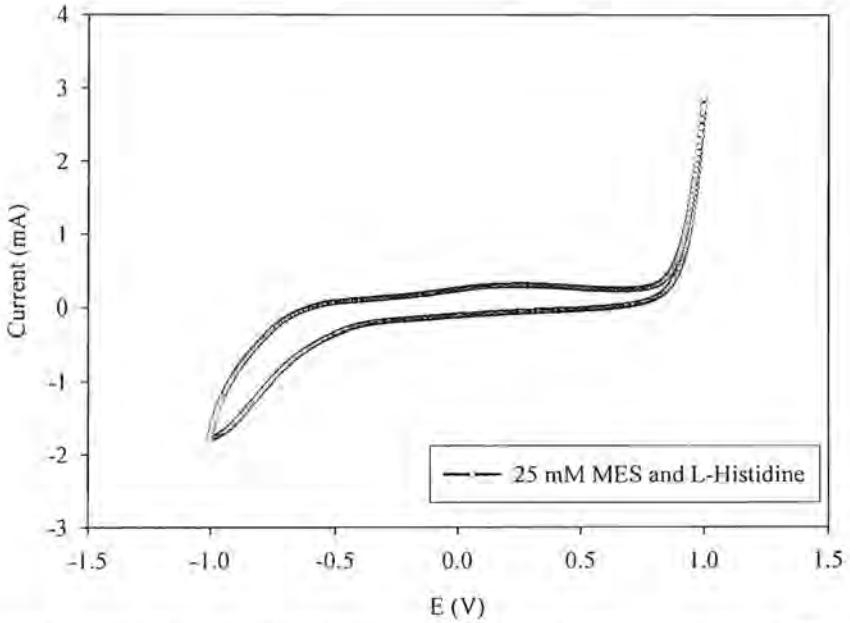
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีในระบบ Batch

ไซคลิกโวลแทมเมตรีเป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาปฏิกิริยาของโลหะหนัก (Pb^{2+}, Cd^{2+} และ Cu^{2+}) เบื้องต้นโดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของโลหะทั้ง 3 คือ ปฏิกิริยารีดักชัน

4.1.1 Background current

ค่ากระแสที่เกิดขึ้นของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM พีเอช 7 ซึ่งทำการตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ทดลอง +1.0 ถึง -1.0 V เทียบกับ Ag/AgCl ซึ่งเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง

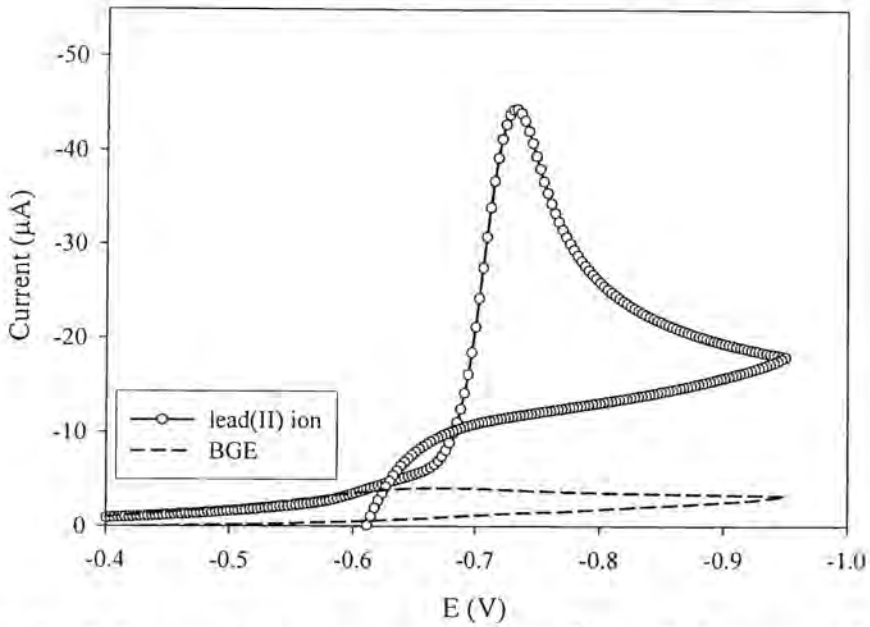


รูปที่ 4.1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 50 mV/s

4.1.2 ปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของโลหะ

4.1.2.1 ปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของ lead (II)

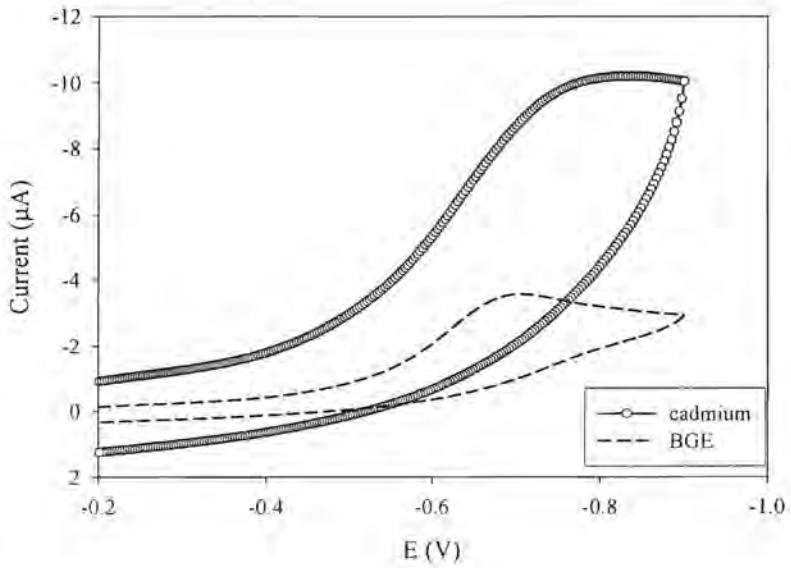
ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ ปฏิกิริยารีดักชันของ lead(II) ion โดยศักย์ไฟฟ้าที่ถูกต้องหลังหัก background current แล้วเกิดปฏิกิริยาที่ศักย์ไฟฟ้า -0.73 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ศึกษา -0.2 ถึง 0.95 V



รูปที่ 4.2 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ lead (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 50 mV/s

4.1.2.2 ปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของ Cadmium (II)

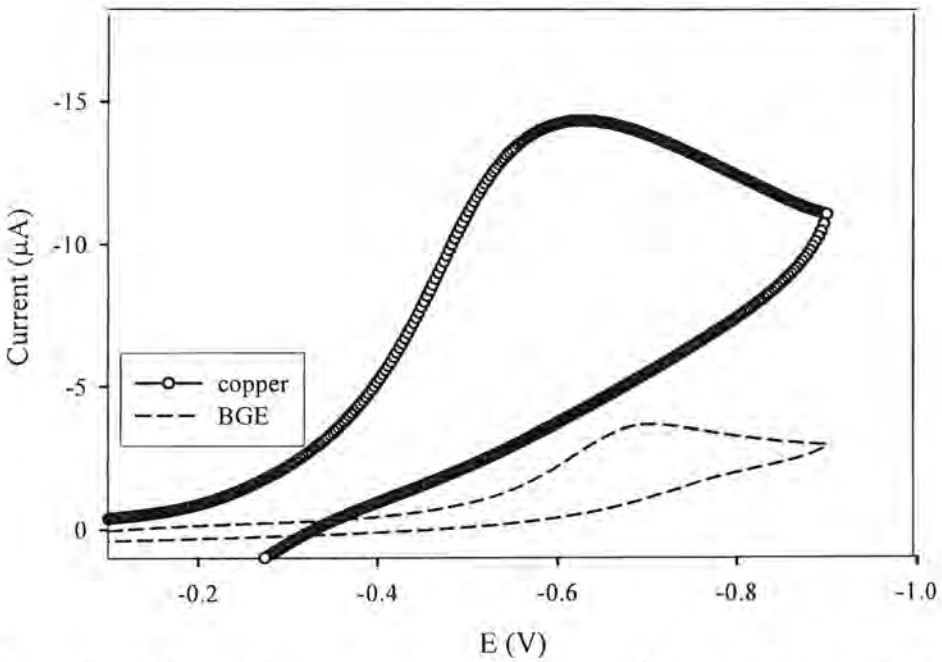
ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ ปฏิกิริยารีดักชันของ Cadmium (II) ion โดยศักย์ไฟฟ้าที่ถูกต้องหลังหัก background current แล้วเกิดปฏิกิริยาที่ศักย์ไฟฟ้า -0.84 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ศึกษา -0.2 ถึง 0.90 V



รูปที่ 4.3 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ cadmium (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 50 mV/s

4.1.2.3 ปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของ Copper (II)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ ปฏิกิริยารีดักชันของ Copper (II) ion โดยศักย์ไฟฟ้าที่ถูกต้องหลังหัก background current แล้วเกิดปฏิกิริยาที่ศักย์ไฟฟ้า -0.62 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ศึกษา 0 ถึง 0.95 V



รูปที่ 4.4 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ copper (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 50 mV/s

ตารางที่ 4.1 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดด้วยเทคนิคไมโครซิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรีของโลหะทั้งสาม

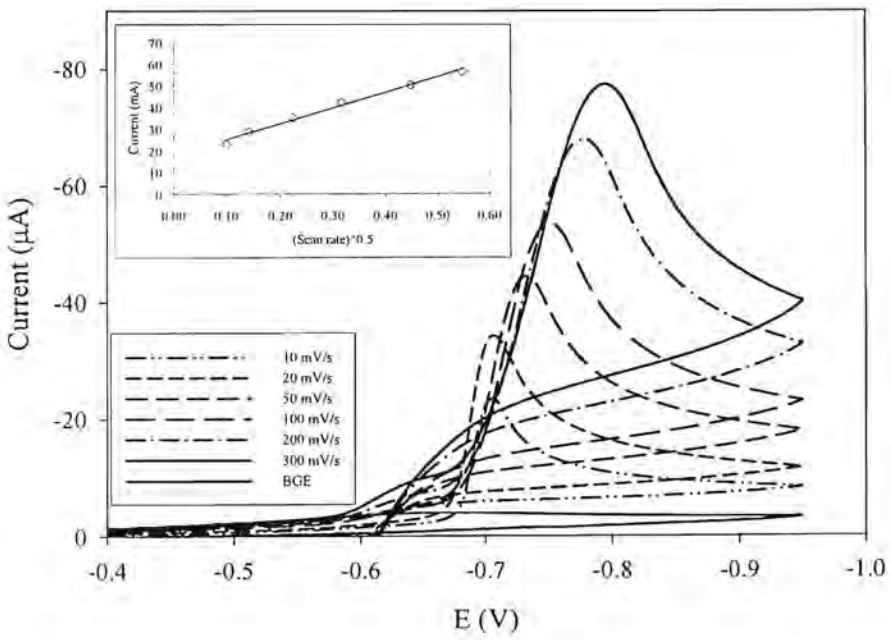
Analyte	Potential (V)
Lead (II)	-0.73
Cadmium (II)	-0.84
Copper (II)	-0.62

4.1.3 **ศึกษาผลของ** scan rate

จากสมการกระแสที่เกิดแปรผันตาม รากที่สองของ scan rate ($v^{1/2}$) นั่นหมายถึงกระแสที่เกิดขึ้นเป็นกระแสจากการ diffusion

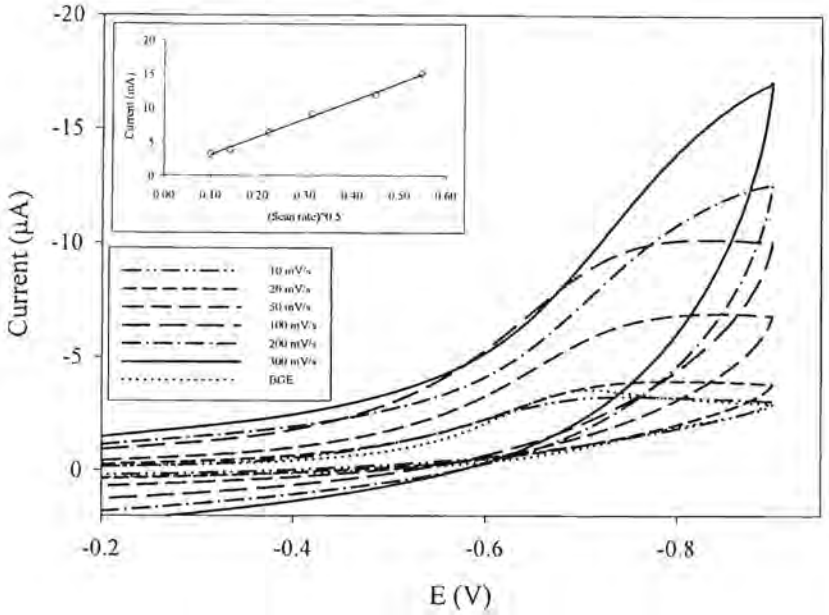
$$i_p = (2.99x10^5)\alpha^{1/2}AC^*D^{1/2}v^{1/2}$$

4.1.3.1 **ผลของ** scan rate **ต่อปฏิกิริยารีดักชันของ** lead (II)



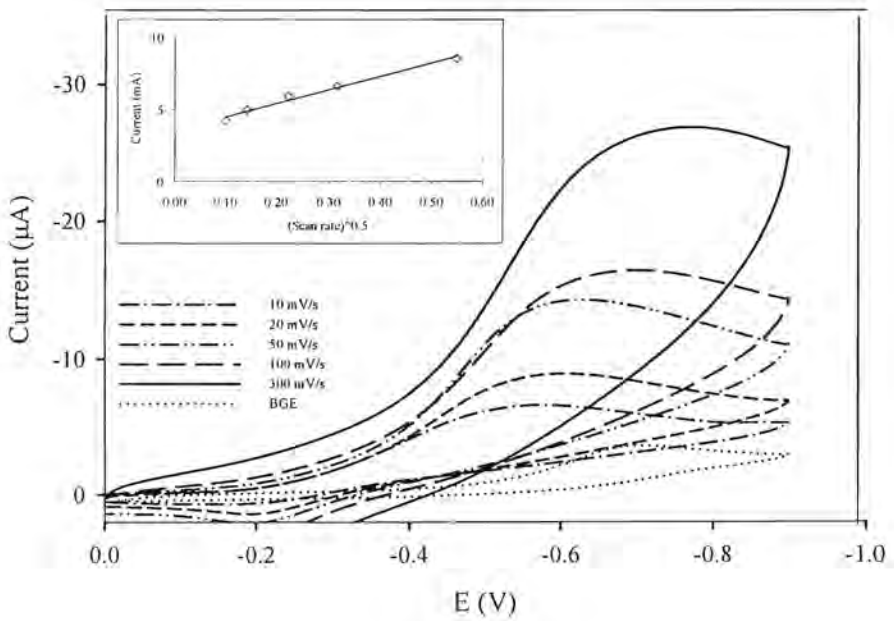
รูปที่ 4.5 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ lead (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 10-300 mV/s และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับรากที่สองของ scan rate

4.1.3.2 ผลของ scan rate ต่อปฏิกิริยารีดักชันของ cadmium (II)



รูปที่ 4.6 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ cadmium (II) ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 10-300 mV/s และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับรากที่สองของ scan rate

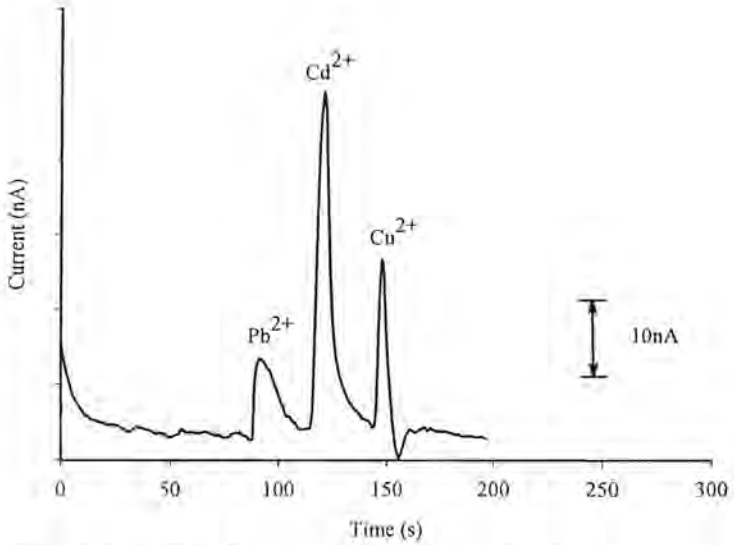
4.1.3.3 ผลของ scan rate ต่อปฏิกิริยารีดักชันของ copper (II)



รูปที่ 4.7 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ copper (II) Ion ที่ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon ที่ scan rate 10-300 mV/s และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับรากที่สองของ scan rate

4.2 เทคนิคไมโครชิพคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสสำหรับการแยกและการตรวจวัดของโลหะหนัก

4.2.1 ลักษณะทางเคมีไฟฟ้าของโลหะ lead (II), cadmium (II) และ copper (II)



รูปที่ 4.8 อิเล็กโทรฟิโรแกรมของโลหะ lead (II), cadmium (II) และ copper (II) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM สารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1100 V ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตรวจวัดที่ -0.8 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon

4.2.2 ผลพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีน

พีเอชมีผลต่อ EOF การเคลื่อนที่ของสาร และ ประสิทธิภาพการแยก (Resolution) ของสาร ช่วงของพีเอชที่ทำการศึกษา 6.0 – 8.5 ของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ได้ผลดังตาราง

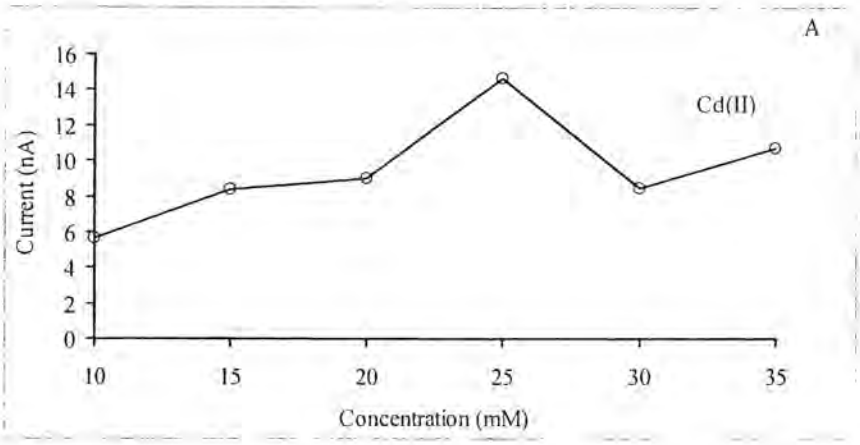
ตารางที่ 4.2 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าและ ค่าประสิทธิการแยกของโลหะทั้ง 3 ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 20 mM ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1200 V ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตรวจวัดที่ -0.85 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon

pH Of BGE	Current (nA)			Resolution	
	Pb(II)	Cd(II)	Cu(II)	$R_{Pb,Cd}$	$R_{Cd,Cu}$
6	7.35	7.35	1.87	-	7.75
6.5	1.98	14.81	7.88	2.58	2.51
7	13.49	25.71	17.09	1.91	3.33
7.5	13.25	18.48	10.99	2.18	2.31
8	14.69	20.42	13.69	1.45	1.18
8.5	11.38	11.89	10.35	1.79	1.05

พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโลหะทั้ง 3 คือ พีเอช 7.0

4.2.3 ผลความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีน

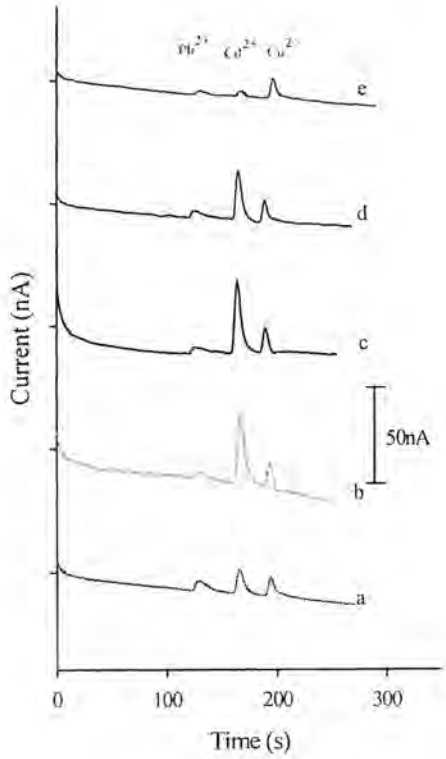
ช่วงที่ทำการศึกษา 10-25 mM ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนสำหรับการแยกที่ 25 mM



รูปที่ 4.9 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนต่อกระแสที่เกิดขึ้นของ cadmium (II) ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1000 V ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตรวจวัดที่ -0.8 V ที่ขั้วไฟฟ้า Screen-printed carbon

4.2.4 **ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดโลหะ** lead(II) cadmium(II) ion **และ** copper(II)

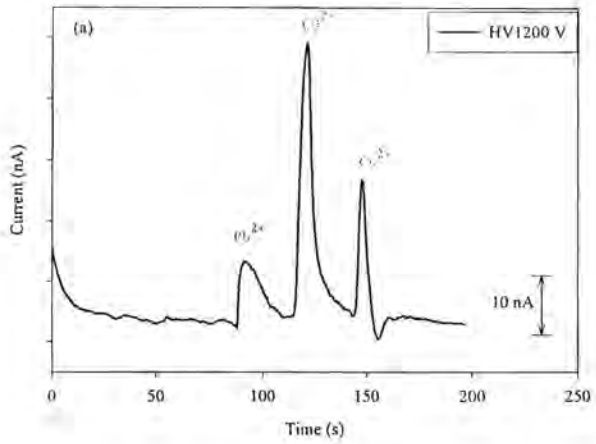
ศักย์ไฟฟ้าที่สามารถให้ค่ากระแสที่สูงคือ -0.8 V

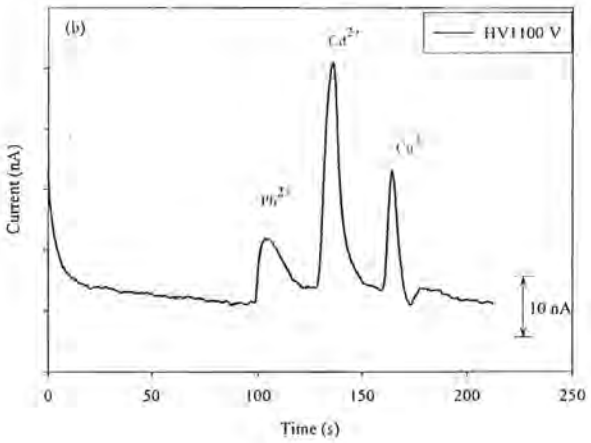


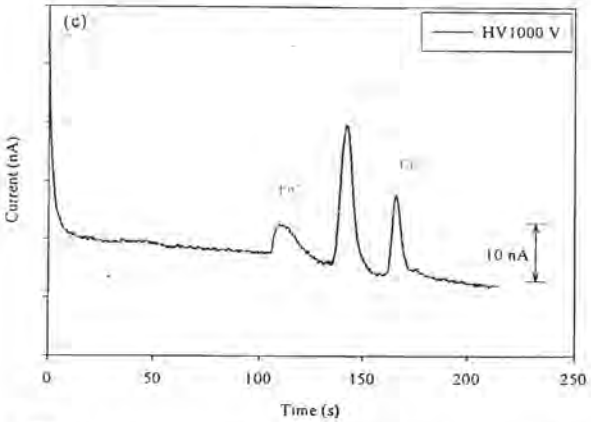
รูปที่ 4.10 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของ lead(II) cadmium(II) ion และcopper(II) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM ที่ศักย์ไฟฟ้าตรวจวัด (a) -0.99 V (b) -0.85 (c) -0.80 (d) -0.75 (e) -0.70 V ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1000 V ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ใช้เวลาในการแยก 3 วินาที

4.2.5 **ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการแยกโลหะ** lead(II)cadmium(II) ion **และ** copper(II)

ศักย์ไฟฟ้าที่สามารถแยกโลหะทั้ง 3 ได้ดีคือ 1200 V

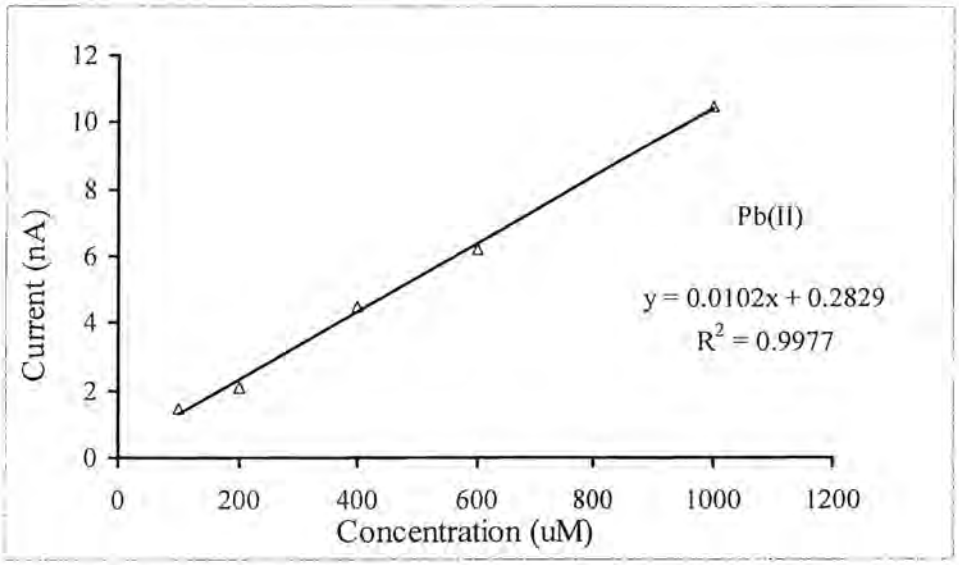




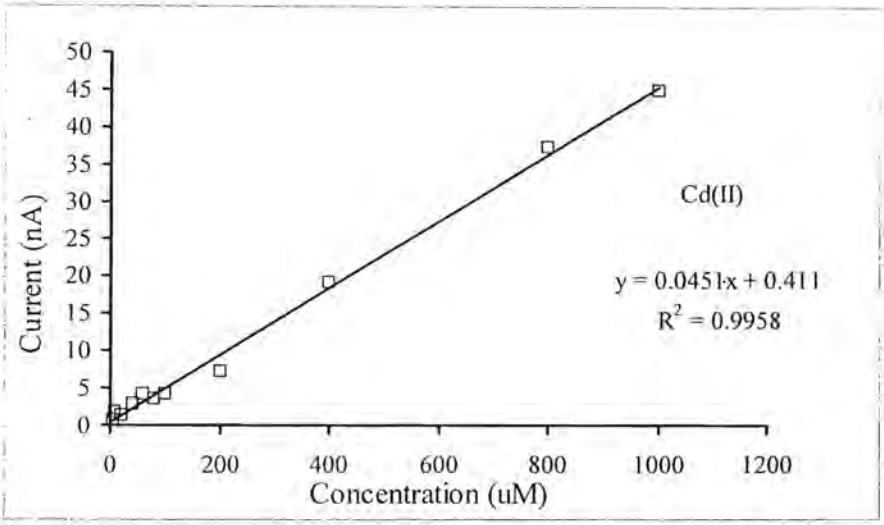


รูปที่ 4.11 อิเล็กโทรฟิโรแกรมของสารละลาย lead(II)cadmium(II) ion และcopper(II) ที่ความเข้มข้น 1 mM ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก (a) 1200, (b) 1100, (c) 1000 V

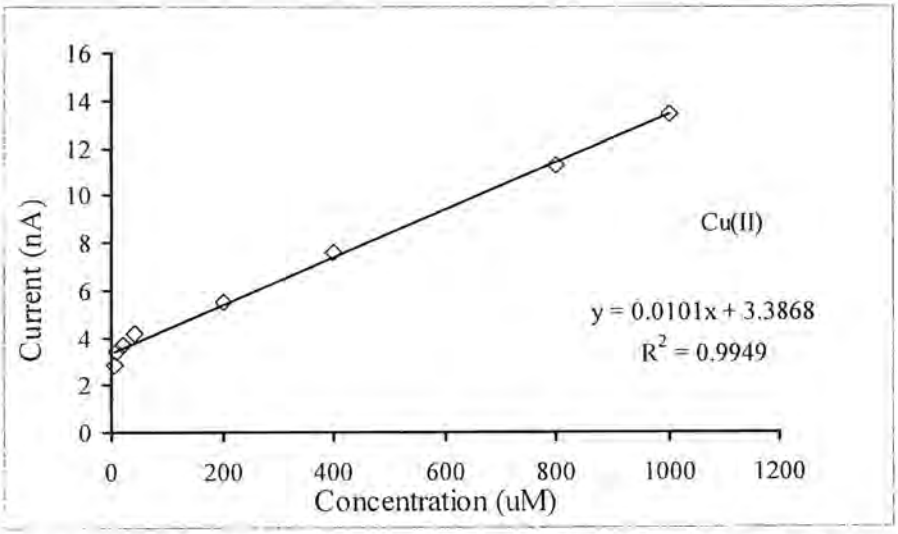
4.2.6 **ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัด** (Linearity) **และขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์** (Limit of Determination; LOD)



รูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น lead (II) กับค่ากระแสไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1200 V ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัดที่ -0.8 V ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ใช้เวลาในการแยก 3 วินาที



รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น cadmium (II) กับค่ากระแสไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1200 V ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัดที่ -0.8 V ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ใช้เวลาในการแยก 3 วินาที



รูปที่ 4.14 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น copper (II) กับค่ากระแสไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 1200 V ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัดที่ -0.8 V ในสารละลายบัฟเฟอร์เอ็มอีเอสและแอลฮีสทีดีนที่ความเข้มข้น 25 mM ใช้เวลาในการแยก 3 วินาที

ขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of Determination; LOD) หาได้จาก 3 S/N ของโลหะทั้ง 3 อยู่ในช่วง 0.13-1.74 μM

4.2.7 **หาความแม่นยำ** (Precision) **และ ความถูกต้อง** (Accuracy) **ในการตรวจวัดโลหะ** copper(II), lead(II) **และ**cadmium(II) ion

ตารางที่ 4.3 แสดง % RSD ของค่ากระแสที่ได้จากโลหะทั้ง 3

Metals	Peak current (average)	SD	%RSD
Pb(II)	9.28	0.39	4.20
Cd(II)	26.23	1.38	5.27
Cu(II)	13.15	0.52	3.92

4.3 **หาปริมาณโลหะ** lead (II), cadmium (II) **และ**copper (II) ion **ในเครื่องดื่ม**

ตารางที่ 4.4 แสดง %recovery ของ lead (II) ในน้ำผัก

Concentration (μM)	%recovery					
	Pb(II) ion					
	1	2	3	average	SD	%RSD
1000	101.71	101.20	106.68	103.20	3.03	2.93
750	100.14	99.26	103.77	101.06	2.39	2.37
500	94.45	100.97	96.76	97.39	3.31	3.40
250	81.76	82.33	90.63	84.91	4.96	5.85

ตารางที่ 4.5 แสดง %recovery ของ cadmium (II) ในน้ำผัก

Concentration (μM)	%recovery					
	Cd(II) ion					
	1	2	3	average	SD	%RSD
1000	98.67	96.73	97.11	97.50	1.03	1.05
750	103.36	105.58	107.80	105.58	2.22	2.10
500	95.46	97.69	93.13	95.43	2.28	2.39
250	109.03	109.41	105.26	107.90	2.30	2.13

ตารางที่ 4.6 แสดง %recovery ของ copper (II) ในน้ำผัก

Concentration (μM)	%recovery					
	Cu(II) ion					
	1	2	3	average	SD	%RSD
1000	100.91	97.74	99.00	99.22	1.59	1.61
750	102.05	105.58	106.11	104.58	2.21	2.11
500	90.75	94.75	90.28	91.93	2.46	2.67
250	101.49	102.82	95.77	100.03	3.75	3.75

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ใช้เทคนิคไมโครชิพอิเล็กโทรโฟริซิสร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบแอมเพอโรเมตรีในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในเครื่องดื่มประเภทน้ำผักผลไม้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เสนอให้เห็นถึงผลดีของการใช้เทคนิคนี้ เช่น สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 3 วินาที ประสิทธิภาพการแยกสูง ไวต่อการตรวจวัด ง่ายต่อการวิเคราะห์และใช้ปริมาณสารน้อย การนำเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีเข้ามาร่วมตรวจวัดเนื่องจากโลหะมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีเมื่อนำมาร่วมกับไมโครชิพคะพิลลารีทำให้เป็นเทคนิคที่ไวต่อการตรวจวัดและให้ขีดความสามรถในการตรวจวัดต่ำ

ลักษณะโดยทั่วไปของไมโครชิพมีขนาดเล็กเหมาะสำหรับการพกพาเคลื่อนที่ (portable) และตรวดวัดได้เร็ว เหมาะกับการวิเคราะห์สารในสถานที่จริงได้สะดวก ซึ่งในงานวิจัยชิ้นนี้สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดโลหะ lead (II) cadmium (II) และ copper (II) ได้พร้อมทั้งประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวหาปริมาณโลหะทั้ง 3 ในเครื่องดื่มประเภท น้ำผัก ให้ %recovery เป็นที่ยอมรับอยู่ในช่วง 91.93 ถึง 107.90

บรรณานุกรม

[18] ธรรมนูญ หนูจักร, "คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส ทฤษฎี หลักการ และการประยุกต์", กรุงเทพ, พิมพ์ครั้งที่ 1, (2550)

[19] ลาวัลย์ ศรีพงษ์, "การวิเคราะห์เชิงเคมีไฟฟ้า", โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, กรุงเทพ, พิมพ์ครั้งที่ 1, (2543).

[1] Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M. J., Fettinger, J. C., Paulus, A., Ludi, H., and Widmer, H. M. "Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems : Capillary electrophoresis on a chip" Journal of Chromatography A (1992). *593*, 253-258

[2] Huikko, K., Kostiainen, R., and Kotiaho, T. "Introduction to micro-analytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications" European Journal of Pharmaceutical Sciences (2003). *20*, 149-171

[3] Chovan, T., and Guttman, A. "Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing" Trends in Biotechnology (2002). *20*, 116-122

[4] Szumski, M., and Buszewski, B. "State of the Art in Miniaturized Separation Techniques" Critical Reviews in Analytical Chemistry (2002). *32*, 1-46

[5] Suzuki, H. "Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring" Materials Science and Engineering: C (2000). *12*, 55-61

[6] Steenland, K., Boffetta, P. "Lead and cancer in humans: where are we now?" An. J. Ind. Med. (2000). *38*, 295-299

[7] WHO. Lead. Environmental Health Criteria(1995), 165, Geneva

[8] Pitot, C. H., Dragan, P.Y. Chemical carcinogenesis. Toxicology International Edition (ed., F., Ed.)(1996), McGraw Hill, New York

[9] Hultberg, B., Andersson, A., and Isaksson, A. "The effects of homocysteine and copper ions on the concentration and redox status of thiols in cell line cultures" Clinica Chimica Acta (1997). *262*, 39-51

[10] Cerpa, W., Varela-Nallar, L., Reyes, A. E., Minniti, A. N., and Inestrosa, N. C. "Is there a role for copper in neurodegenerative diseases?" Molecular Aspects of Medicine Trace Elements and Human Health (2005). *26*, 405-420

[11] Suarez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J. F., and Simal-Lozano, J. "Rapid capillary zone electrophoresis method for the determination of metal cations in beverages" Talanta (2006). *68*, 1143-1147

[12] Bao, N., Zhang, Q., Xu, J.-J., and Chen, H.-Y. "Fabrication of poly(dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer" Journal of Chromatography A (2005). *1089*, 270-275

[13] Pumeraa, M., Wanga, J., Loweb, H., and Hardtb, S."Poly(methylmethacrylate) Microchip Electrophoresis Device with Thick-Film Amperometric Detector: Towards Fully Disposable Lab-on-a-chip" Journal of the Association for Laboratory Automation (2002). *7*, 73-74

[14] Lenigk, R., Liu, R. H., Athavale, M., Chen, Z., Ganser, D., Yang, J., Rauch, C., Liu, Y., Chan, B., Yu, H., Ray, M., Marrero, R., and Grodzinski, P. "Plastic biochannel hybridization devices: a new concept for microfluidic DNA arrays" Analytical Biochemistry (2002). *311*, 40-49

[15] Castano-Alvarez, M., Fernandez-Abedul, M. T., and Costa-Garcia, A.

"Amperometric detector designs for capillary electrophoresis microchips" Journal of Chromatography A 19th International Symposium on MicroScale Bioseparations (2006). *1109*, 291-299

[16] Chuang, Y.-J., Tseng, F.-G., Cheng, J.-H., and Lin, W.-K. "A novel fabrication method of embedded micro-channels by using SU-8 thick-film photoresists" Sensors and Actuators A: Physical (2003). *103*, 64-69

[17] Lion, N., Reymond, F., Girault, H. H., and Rossier, J. S. "Why the move to microfluidics for protein analysis?" Current Opinion in Biotechnology (2004). *15*, 31-37

[20] Roybal, J. E., Pfenning, A. P., Turnipseed, S. B., Gonzales, S. A., "Application of size-exclusion chromatography to the analysis of shrimp for sulfonamide residues", Analytica Chimica Acta,483. (2003) : 147-152.

[21] Shao, B., Dong, D., Wu, Y., Hu, J., Meng, J., Tu, X., Xu, S., "Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry", Analytica Chimica Acta, 546. (2005) : 174-181.

[22] Preechaworapun, A., Chuanuwatanakul, S., Einaga, Y., Grudpan, K., Motomizu, S., Chailapakul,O., "Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode",Talanta, 68 . (2006) : 1726-1731.

[23] Cubarsi, M. G., Castellari, M., Valero, A., Regueiro, J. A., "A simplified LC-DAD method with an RP-C_{12} column for routine monitoring of three sulfonamides in edible calf and pig tissue" Analytical Bioanalytical Chemistry, 385. (2006) : 1218-1224.

[24] Tanaka, N., Kobayashi, H., "Monolithic column for liquid chromatography", Analytical Bioanalytical Chemistry, 76. (2003) : 298-301.

[25] Posyniak, A., Zmudzki, J., Mitrowska, K., "Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography", Journal of Chromatography A,1087. (2005) : 259-264.

[26] ehring, T. A., Griffin, B., Williams, R., Geiseker, C., Rushing, L. G., Siitonen, P. H., "Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection", Journal of Chromatography B, 840. (2006) : 132-138.

[27] Kishida, K., Furusawa, N., "Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken", Journal of Chromatography A, 937. (2001) : 49-55.

[28] Fuh, M. S., Chu, S., "Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis", Analytica Chimica Acta, 499. (2003) : 215-221.

[29] Thompson, T. S., Noot, D. K., "Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry", Analytica Chimica Acta, 551. (2005) : 168-176.

[30] Cavaliere, C., Curini, R., Corcia, D. A., Nazzari, M., Samperi, R., "A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51. (2003) : 558-566.

[31] Li, H., Kijak, P. J., Turnipseed, S. B., Cui, W., "Analysis of veterinary drug residues in shrimp a multi- class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry", Journal of Chromatography B, 836. (2006) : 22-38.

[32] Wang, X., Li, K., Shi, D., Xiong, N., Jin, X., Yi, J., Bi, D., "Development of an immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55. (2007) : 2072-2078.