การวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Analysis of Sulfonamide Group by High Performance Liquid Chromatography

อนุรักษ์ จันทร์แก้ว[2], นันทิยา สุหร่ายเพชร[1], และ อภิญญา นวคุณ[1*]

Anurak Chankaew[2], Nuntiya Suraipet[1] and Apinya Navakhun[1*]

[1] *ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2] *โครงการบัณฑิตศึกษาสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าซัลฟาเมอราซีน, ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน, ซัลฟิโซซาโซล, ซัลฟาไดเมธอกซีนและซัลฟาควินอกซาลีนถูกแยกภายในเวลา 17 นาที และตรวจวัดด้วยไดโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร สารซัลโฟนาไมด์ถูกแยกด้วยคอลัมน์ Hypersil gold C_{18} (4.6 mm x 150 mm), เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 5.0 mM โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พีเอช 3.0 (A) และเมทานอล (B) โดยใช้สภาวะเกรเดียนดังนี้ 0.0 – 5.0 นาที B 30%, 5.1 – 15.0 นาที B 55% และ 15.1 – 17.0 นาที B 55% ตามลำดับ โดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด พบว่าให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณอยู่ในช่วง 0.10-0.35 และ 0.40-1.40 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 0.40-20.00 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.9970 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ (n=6) มีค่าน้อยกว่า 4.10% และค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 87.13-100.46%

คำสำคัญ : ซัลโฟนาไมด์ / โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Abstract

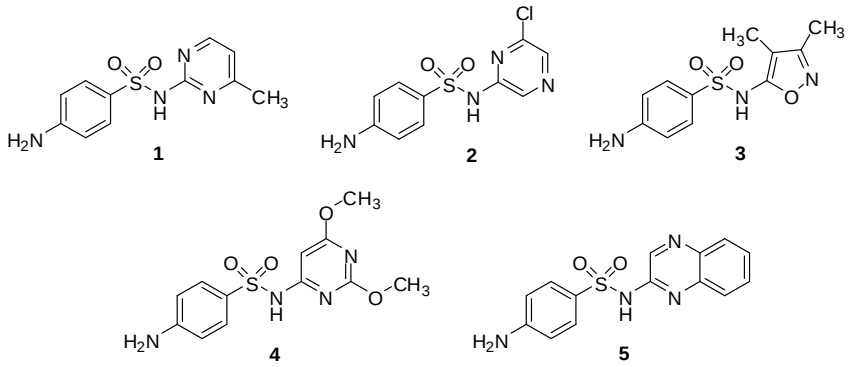
The optimum condition for determination of sulfonamide group by high performance liquid chromatography was studied in this research. Sulfamerazine, sulfachloropyridazine, sulfisoxazole, sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline were separated within 17 minute and detected at 270 nm by diode array detector. The sulfonamides were separated by Hypersil gold C_{18} column (4.6 mm x 150 mm). The mobile phase consists of 5.0 mM KH_2PO_4 pH 3.0 (A) and methanol (B). The gradient program was set for using 0.0 – 5.0 min B 30%, 5.1 – 15.0 min B 55%, and 15.1 – 17.0 min B 55%, respectively with a flow rate of 0.80 mL/min. Under the optimum conditions, the limit of detection and limit of quantification of 5 sulfonamides were 0.10-0.35 and 0.40-1.40 mg/L, respectively. The linearity was in range of 0.40-20.00 mg/L and correlation coefficient more than 0.9970 were achieved. The precision (n=6) was less than 4.10% and %recovery was in range of 87.13-100.46%.

Keywords : Sulfonamide / High Performance Liquid Chromatography

***Corresponding author. E-mail** : apinyan@buu.ac.th

1. บทนำ

ซัลโฟนาไมด์เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มใหญ่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในร่างกายมนุษย์ ปัจจุบันมีการใช้ยากลุ่มนี้ในการรักษาสัตว์และผสมอาหารเพื่อป้องกันโรคและเร่งการเจริญเติบโต (Manzanares, Gracia & Campaña, 2014) ทำให้มีการตกค้างในอาหาร เมื่อผู้บริโภคได้รับสารกลุ่มนี้บางรายเกิดอาการแพ้อย่างรุนแรงอาจถึงแก่ชีวิตและทำให้เกิดการดื้อยาในผู้ป่วยโรคมะเร็ง (Galarini et al., 2014) ดังนั้นทางกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) ได้มีประชุมในปี 2010 เพื่อกำหนดปริมาณของสารเคมีที่ตกค้างในอาหาร (MRL) ซึ่งสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ตกค้างในอาหารได้ไม่เกิน 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Galarini et al., 2014; Won et al., 2011) ทำให้มีผู้สนใจหาปริมาณซัลโฟนาไมด์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่นยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (Nagaraja, Sunitha, Vasantha & Yathirajan, 2002) จำเป็นต้องมีการเตรียมอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์, ระบบการไหลแบบอัตโนมัติ (Catelani et al., 2014) ซึ่งต้องหาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในการวิเคราะห์ โดยเทคนิคทั้ง 2 เทคนิคที่กล่าวมาแล้วนั้นไม่สามารถบอกได้ว่าสารที่วิเคราะห์คือสารชนิดใด ดังนั้นจึงพัฒนาเทคนิคที่มีความเฉพาะขึ้น เช่น เคมีเชิงไฟฟ้าบนระบบอิมมูน (Galarini et al., 2014; Conzuelo et al., 2013; Won, Chandra, Hee & Shim, 2013) ซึ่งเทคนิคนี้มีการใช้เอนไซม์ซึ่งมีราคาแพงและอายุการใช้งานต่ำ, แก๊สโครมาโทกราฟี (Chiavarino, Crestoni, Marzio & Fornarini, 1998) ที่ต้องมีการทำอนุพันธ์เพื่อให้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ได้ซึ่งขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์มีความยุ่งยาก จากข้อเสียของเทคนิคที่กล่าวมาแล้วนั้นทำให้มีการพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งเทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ไม่ต้องมีการเตรียมอนุพันธ์ที่ยุ่งยากแต่ก็ยังมีข้อเสียคือระบบของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้มีความยุ่งยาก (Granja, Nino, Rabone & Salerno, 2008; Stoev & Michailova, 2000) มีการให้ความร้อนแก่คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร (Bernala et al., 2009) และร้อยละการกลับคืนที่ได้ต่ำถึง 31.9% (Malintan & Mohd, 2006) ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ระบบของเฟสเคลื่อนที่ที่ง่าย ใช้อุณหภูมิห้องในการแยกสาร เพื่อง่ายและสะดวกอีกทั้งประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ 5 ชนิดได้แก่ ซัลฟาเมอราซีน, ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน, ซัลฟิโซซาโซล, ซัลฟาไดเมธอกซีนและซัลฟาควินอกซาลีน (ดังรูปที่ 1) เนื่องจากเป็นสารกลุ่มที่นิยมวิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และในผลิตภัณฑ์นม (Furusawa & Hanabusa, 2002; Chung et al., 2009; Lopes et al., 2012; Won et al., 2011) โดยศึกษาวิธีการหาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ในตัวอย่างเนื้อไก่



รูปที่ 1 โครงสร้างของซัลฟาเมอราซีน (1), ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน (2), ซัลฟิโซซาโซล (3), ซัลฟาไดเมธอกซีน (4) และซัลฟาควินอกซาลีน

2. วิธีการ

2.1 อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้

วิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น 1050 ที่มีโฟโตไดโอดแอร์เรย์รุ่น 1050 ของบริษัท Hewlett Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา คอลัมน์สำหรับแยกใช้ Hypersil Gold C_{18} (4.6 มม. X 150 มม.) ของบริษัท Thermo Electron ประเทศสหรัฐอเมริกา น้ำที่ใช้ในการทดลองคือน้ำปราศจากไอออนโดยใช้เครื่องทำน้ำปราศจากไอออนของบริษัท Branstead ประเทศสหรัฐอเมริกา ซัลฟาเมอริซีนและซัลฟาคลอโรไพริดาซีนของบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ซัลฟิโซซาโซลของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา ซัลฟาไดเมธอกซีนของบริษัท TCI ประเทศญี่ปุ่น ซัลฟาควินอกซาลีนของบริษัท Supelco ประเทศสหรัฐอเมริกา โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี เมทานอลของบริษัท Burdick & Jackson ประเทศเกาหลีใต้ สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์

2.2 วิธีการทดลอง

สารมาตรฐานและสารตัวอย่างเตรียมในเมทานอลจากนั้นฉีดสารผสมกลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด โดยแต่ละชนิดเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรไปยังเครื่อง HPLC และตรวจวัดด้วยไดโอดแอร์เรย์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3.0 และเมทานอลที่อัตราการไหล 0.80 มิลลิลิตรต่อนาทีในการแยกและวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ซึ่งสภาวะที่ศึกษาได้แก่ ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์, อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่, พีเอช และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์โดยการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด, ขีดจำกัดการหาปริมาณ, ช่วงความเป็นเส้นตรง, กราฟมาตรฐาน, ความเที่ยงและความแม่น

3. ผลและอภิปราย

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วย HPLC และตรวจวัดด้วยไดโอดแอร์เรย์โดยจะพิจารณาจากค่าการแยกและรูปร่างพีกเป็นหลัก โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ทำการศึกษามีดังนี้

3.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

นำสารทั้ง 5 ชนิดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้ค่าความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 266-269 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงสูงสุดโดยการวิเคราะห์ด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มาประยุกต์ในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วยเครื่อง HPLC และตรวจวัดด้วยไดโอดแอร์เรย์ ผลการทดลองพบว่าที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตรให้สภาพไวของการแยกสารทั้ง 5 ชนิดดีที่สุดซึ่งใกล้เคียงกับค่าความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงสูงสุดที่ได้จากเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เนื่องจากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือต่างชนิดกันและอิทธิพลของระบบเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ทำให้ความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงสูงสุดที่ได้ไม่เท่ากัน แต่จากความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงสูงสุดจากเครื่องไดโอดแอร์เรย์แตกต่างจากสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ไม่เกิน 5 นาโนเมตรซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงตั้งค่าความยาวคลื่นของไดโอดแอร์เรย์ที่ 270 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Won et al., 2011

3.2 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

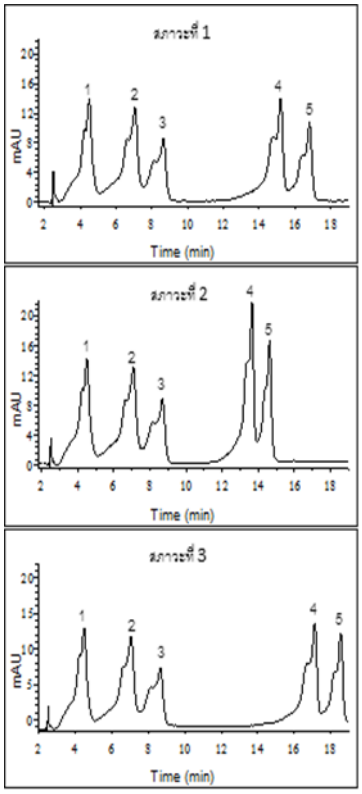
จากการศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3.5 เข้มข้น 5.0 mM (A) และเมทานอล (B) โดยการวิเคราะห์เป็นแบบเกรเดียน 3 สภาวะดังตารางที่ 1 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 สภาวะให้รีเทนชั่นไทม์ของสารแต่ละชนิดไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญโดยมีลำดับการชะของสารดังนี้ ซัลฟาเมอราซีน ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน ซัลฟิโซซาโซล ซัลฟาไดเมธอกซีนและซัลฟาควินอกซาลีนตามลำดับ ดังนั้นจึงพิจารณาค่าการแยกของซัลฟาคลอโรไพริดาซีนกับซัลฟิโซซาโซลและซัลฟาไดเมธอกซีนกับซัลฟาควินอกซาลีนพบว่าค่าที่ได้มีค่ามากกว่า 1 ซึ่งเป็นค่าการแยกที่ยอมรับได้ในการใช้หาปริมาณดังตารางที่ 2 จึงเลือกสภาวะที่ 2 เป็นสภาวะที่เหมาะสมเพราะให้เวลาการวิเคราะห์น้อยที่สุดซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ 17 นาที เมื่อเปรียบเทียบเวลาในการวิเคราะห์พบว่าวิธีการนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่น้อยเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นที่ใช้เวลามากกว่า 30 นาที (Malintan & Mohd, 2006) ตัวอย่างโครมาโทแกรมการแยกสารซัลโฟนาไมด์ 5 ชนิดแสดงดังรูปที่ 2

ตารางที่ 1 สภาวะเกรเดียนที่ใช้ในการศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

สภาวะที่ 1		**สภาวะที่ 2**		**สภาวะที่ 3**	
เวลา (นาที)	**% เมทานอล**	**เวลา**	**% เมทานอล**	**เวลา**	**% เมทานอล**
0.0 – 5.0	30	0.0 – 5.0	30	0.0 – 10.0	30
5.1 – 13.0	40	5.1 – 15.0	55	10.1 – 20.0	55
13.1 – 18.0	50	15.1 – 17.0	55	20.1 – 22.0	55
18.1 – 20.0	50	-	-	-	-

ตารางที่ 2 ค่าการแยกของซัลฟาคลอโรไพริดาซีนกับซัลฟิโซซาโซลและซัลฟาไดเมธอกซีนกับซัลฟาควินอกซาลีน

สภาวะที่	**ค่าการแยก**		**เวลาในการวิเคราะห์ (นาที)**
	ซัลฟาคลอโรไพริดาซีนกับซัลฟิโซซาโซล	**ซัลฟาไดเมธอกซีนกับซัลฟาควินอกซาลีน**	
1	1.047	1.304	20
2	1.115	1.070	17
3	1.185	1.102	22



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมการแยกสารซัลโฟนาไมด์ 5 ชนิด ภายใต้สภาวะการแยกที่ 1, 2, และ 3 (สภาวะตามตารางที่ 1) โดยพีคที่ 1: ซัลฟาเมอราซีน, 2: ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน, 3: ซัลฟิโซซาโซล, 4: ซัลฟาไดเมธอกซีน และ 5: ซัลฟาควินอกซาลีน

3.3 พีเอชของเฟสเคลื่อนที่

ทำโดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.2 แต่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 2.5 – 4.0 เข้มข้น 5.0 mM ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการประกอบการเลือกคือค่าการแยก, รูปร่างพีกและเวลาในการวิเคราะห์ ผลการทดลองพบว่าทุกพีเอชให้ค่าการแยก, รูปร่างพีกและเวลาในการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงพิจารณาจากพื้นที่พีก พบว่าที่พีเอช 3.0 พื้นที่พีกของสารมาตรฐานที่ได้มีค่ามากกว่าที่พีเอชอื่น ๆ แสดงดังตารางที่ 3 ดังนั้นจึงเลือกที่พีเอช 3.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาพีเอชของเฟสเคลื่อนที่

ตารางที่ 3 พื้นที่พีกของสารมาตรฐานกับพีเอชที่ศึกษา

พีเอช	พื้นที่พีก (mAU*min)				
	ซัลฟาเมอราซีน	ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน	ซัลฟิโซซาโซล		ซัลฟาควินอกซาลีน
2.5	440.1	411.3	253.4	392.7	362.8
3.0	580.2	439.9	359.8	480.0	449.8
3.5	580.5	401.1	247.5	456.4	449.4
4.0	399.8	403.2	203.8	294.5	254.2

3.4 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในเฟสเคลื่อนที่

ทำโดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.3 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3.0 เป็น 5.0 – 15.0 mM จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 5.0 mM ค่ารีเทนชั่นไทม์ของซัลฟิโซซาโซลมีค่าน้อยกว่าที่ความเข้นข้นอื่น และเมื่อเทียบค่าการแยกของซัลฟาคลอโรไพริดาซีนกับซัลฟิโซซาโซลและซัลฟาไดเมธอกซีนกับซัลฟาควินอกซาลีนพบว่าที่ความเข้มข้น 5.0 mM มีค่าการแยก 1.212 และ 1.048 ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นอื่นค่าการแยกที่บริเวณดังกล่าวน้อยกว่า 1.0 ดังนั้นจึงเลือกฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3.0 เข้มข้น 5.0 mM

เป็นสภาวะที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถแยกสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิดได้ภายในเวลา 17 นาที ซึ่งค่ารีเทนชั่นไทม์ของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิดแสดงในตารางที่ 4

3.5 ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ

นำสภาวะที่เหมาะสมมาหาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยพิจารณาจากความเข้มข้นที่ให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของสารมาตรฐานและสัญญาณรบกวน (S/N) เท่ากับ 3 และ 10 สำหรับขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณตามลำดับ ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4 จากค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ได้มีค่ามากกว่ารายงานวิจัยอื่นเป็นเพราะในรายงานการวิจัยอื่นได้มีเทคนิคการเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ (Hela et al., 2003; Tsai et al., 2010)

ตารางที่ 4 ค่ารีเทนชั่นไทม์ ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด

ชนิดสาร	รีเทนชั่นไทม์ (นาที)	ขีดจำกัดการตรวจวัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ขีดจำกัดการหาปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ซัลฟาเมอราซีน	4.45	0.15	0.60
ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน	7.11	0.10	0.40
ซัลฟิโซซาโซล	9.08	0.35	1.40
ซัลฟาไดเมธอกซีน	13.65	0.20	0.80
ซัลฟาควินอกซาลีน	14.66	0.30	1.20

3.6 ช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาโดยหาความเข้มข้นที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยศึกษาดังนี้ ซัลฟาเมอราซีน (0.60-20.00 มิลลิกรัมต่อลิตร), ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน (0.40-20.00 มิลลิกรัมต่อลิตร), ซัลฟิโซซาโซล (1.40-20.00 มิลลิกรัมต่อลิตร), ซัลฟาไดเมธอกซีน (0.80-20.00 มิลลิกรัมต่อลิตร) และซัลฟาควินอกซาลีน (1.20-20.00 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่คาดว่าจะพบในตัวอย่างจริง จากการทดลองพบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.9970 แสดงว่าให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ดีแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นที่ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง สมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (n=3)

ชนิดสาร	ความเข้มข้นที่ศึกษา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
ซัลฟาเมอราซีน	0.60 – 20.00	y = 112.980x – 41.421	0.9976
ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน	0.40 – 20.00	y = 94.536x – 35.830	0.9982
ซัลฟิโซซาโซล	1.40 – 20.00	y = 76.342x – 37.536	0.9986
ซัลฟาไดเมธอกซีน	0.80 – 20.00	y = 112.420x – 21.204	0.9992
ซัลฟาควินอกซาลีน	1.20 – 20.00	y = 82.615x – 22.343	0.9992

3.7 กราฟมาตรฐาน

ทำเช่นเดียวกับการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงแต่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้คือ 15.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ดีโดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.9937 แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นที่ศึกษากราฟมาตรฐาน สมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (n=3)

ชนิดสาร	ความเข้มข้นที่ศึกษา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
ซัลฟาเมอราซีน	0.60 – 15.00	y = 99.213x – 2.556	0.9981
ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน	0.40 – 15.00	y = 83.437x – 12.667	0.9976
ซัลฟิโซซาโซล	1.40 – 15.00	y = 60.707x + 0.666	0.9939
ซัลฟาไดเมธอกซีน	0.80 – 15.00	y = 98.980x – 0.870	0.9973
ซัลฟาควินอกซาลีน	1.20 – 15.00	y = 69.324x – 8.900	0.9937

3.8 ความเที่ยงของการวิเคราะห์

ศึกษาโดยการเลือกวิเคราะห์ 3 ความเข้มข้นได้แก่ความเข้มข้น 6.00, 9.00 และ 12.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยการวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง ผลการทดลองพบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของรีเทนชั่นไทม์มีค่า 0.05-1.10% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่พีกมีค่า 0.18-4.10% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC ซึ่งมีค่าไม่เกิน 7.3% (AOAC international, 1993)

3.9 ความแม่นของการวิเคราะห์

ศึกษาโดยนำสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จากนั้นเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) จากการทดลองพบว่าค่าร้อยละการกลับคืนที่ได้อยู่ในช่วง 87.13 ถึง 100.46% แสดงดังตารางที่ 7 ซึ่งค่าที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 80-110% (AOAC international, 1993) ตามมาตรฐาน AOAC ที่ความเข้มข้นระดับมิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 7 ร้อยละการกลับคืนของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (n=3)

ชนิดสาร	ร้อยละการกลับคืน
ซัลฟาเมอราซีน	95.25 ± 2.05
ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน	90.45 ± 1.09
ซัลฟิโซซาโซล	89.05 ± 1.23
ซัลฟาไดเมธอกซีน	100.46 ± 1.32
ซัลฟาควินอกซาลีน	87.13 ± 0.28

4. บทสรุป

สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ 5 ชนิด ได้แก่ ซัลฟาเมอราซีน, ซัลฟาคลอโรไพริดาซีน, ซัลฟิโซซาโซล, ซัลฟาไดเมธอกซีนและซัลฟาควินอกซาลีนด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ตรวจวัดด้วยไดโอดแอร์เรย์ที่ 270 นาโนเมตร คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกคือ Hypersil Gold C_{18} (4.6 mm X 150 mm) ใช้สารผสมระหว่างฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3.0 เข้มข้น 5.0 mM (A) และเมทานอล (B) เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้สภาวะเกรเดียนดังนี้ 0.0 – 5.0 นาที B 30%, 5.1 – 15.0 นาที B 55% และ 15.1 – 17.0 นาที B 55% ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณคือ 0.10 – 0.35 และ 0.40 – 1.40 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ สำหรับช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าระหว่างขีดจำกัดการหาปริมาณของสารแต่ละชนิดจนถึงความเข้มข้น 20.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่ามากกว่า 0.9970 สำหรับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (n=6) และค่าร้อยละการกลับคืนที่ได้คือ 0.18 – 4.10% และ 87.13 – 100.46% ตามลำดับ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ใช้ทำงานวิจัยและสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน

6. เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพาณิชย์, (2556). สิค้าไก่และผลิตภัณฑ์. http://www.dft.go.th/Portals/0/ContentManagement/Document_Mod785/สถานการณ์ไก่_21022556@25560221-1029149310.pdf

AOAC International. (1993). *AOAC® peer-verified method program: manual on policies and procedures*. United States of America.

Bernala, J., Nozalb, M. J., Jimenezb, J. J., Martinb, M. T. and Sanzb, E. (2009). A new and simple method to determine trace levels of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A, 1216,* 7275-7280.

Catelani, T. A., Tóth, I. V., Lima, J. L. F. C., Pezza, L. and Pezza, H. R. (2014). A simple and rapid screening method for sulfonamides in Honey using a flow injection system coupled a liquid waveguide capillary cell. *Talanta, 121,* 281-287.

Chiavarino, B., Crestoni, M. E., Marzio, A. D. and Fornarini, S. (1998). Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. *Journal of Chromatography B, 706,* 269-277.

Chung, H. H., Lee, J. B., Chung, Y. H., and Lee, K. G. (2009). Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry,* 113, 297-301.

Conzuelo, F., Campuzano, S., Gamella, M., Pinacho, D.G., Reviejo, A. J., Marco, M. P. and Pingarrón, J. M. (2013). Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics, 50,* 100-105.

Furusawa, N., and Hanabusa, R. (2002). Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. Food Research International, 35, 37-42.

Galarini, R., Diana, F., Moretti, S., Puppimi, B., Saluti, G. and Persic, L. (2014). Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed. *Food Control, 35,* 300-310.

Granja, R. H. M. M., Nino, A. M. M., Rabone, F and Salerno, A.G. (2008). A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. *Analytica Chimica Acta, 613,* 116-119.

Hela, W., Brandtner, M., Widek, R., and Schuh, R. (2003). Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods,* 83, 601-608.

Lopes, R. P., Passos, E. E. D. F., Filho, J. F. D. A., Vargas, E. A., Augusti, D. V., and Augusti, R. (2012). Development and validation of a method for determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *Food Control, 28*, 192-198.

Malintan, N. T. and Mohd, M. A. (2006). Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A, 1127,* 154-160.

Manzanares, N. A., Gracia, L. G. and Campaña, A. M. G. (2014). Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry, 143,* 459-464.

Milintan, N. T., and Mohd, M. A. (2006). Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performane liquid chromatography. Journal of Chromatography A., 1127, 154-160.

Nagaraja, P., Sunitha, K. R., Vasantha, R. A. and Yathirajan, H. S. (2002). Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 53,* 187-192.

Stoev, G. and Michailova, A. (2000). Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A, 871,* 37-42.

Tsai, W. H., Huang, T. C., Chen, H. H., Wu, Y. W., Huang, J. J., Chuang H. Y. (2010). Determination of sulfonamides in swine muscle after salting-out assisted liquid extraction with acetonitrile coupled with back-extraction by water/acetonitrile/dichloromethane ternary component system prior to high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.,* 1217, 250-255.

Won, S. Y., Chandra, P., Hee, T. S. and Shim, Y. B. (2013). Simultaneous detection of antibacterial sulfonamides in microfluidic device with amperometry. *Biosensors and Bioelectronics, 39,* 204-209.

Won, S. Y., Lee, C. H., Chang, H. S., Kim, S. O., Lee, S. H. and Kim, D .S. (2011). Monitoring of 14 sulfonamides antibiotic residue in marine products using HPLC-PAD and LC-MS/MS. *Food Control, 22,* 1101-1107.