

การพัฒนาวิธีโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับ สำหรับหาปริมาณเหล็ก (II) Development of Reverse Flow Injection Analysis for Determination of Iron (II)

วิรัช เรืองศรีตระกูล (Wirat Ruengsitagoon)^{1*}

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับสำหรับหาปริมาณเหล็ก (II) โดยมีตัวตรวจวัดแบบสเปกโตรโฟโตเมตริก ซึ่งมีหลักการพื้นฐานที่เมื่อฉีดสารละลายรีเอเจนต์เตตราไซคลิน 200 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสที่มีสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างของเหล็ก (II) อยู่ ด้วยอัตราการไหลของสารละลายที่เหมาะสมเท่ากับ 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที การดูดกลืนคลื่นแสงของสารประกอบเหล็ก (II) - เตตราไซคลินที่เกิดขึ้นจะถูกวัดที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร การศึกษาได้หาสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสมโดยใช้วิธีการศึกษาปัจจัยครั้งละหนึ่งปัจจัย ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสมนี้จะได้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 25.0 - 500.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความสัมพันธ์ของความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.9984 มีค่าขีดจำกัดต่ำสุด (s/n=3) เท่ากับ 2.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับตัวอย่างเหล็ก (II) วิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเหล็ก (II) ในตัวอย่างน้ำด้วยอัตราเร็วของการวิเคราะห์ 70 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

Abstract

A reverse flow injection analysis spectrophotometric procedure for the determination of iron (II) has been developed. The method is based on the injection of 200 μl of tetracycline reagent solution into the flowing stream of an iron (II) standard or sample solution with the optimum flow rate of 3.0 ml min^{-1} . The absorption of iron (II) - tetracycline complex is monitored at a wavelength of 440 nm. The flow injection system and the experimental conditions were optimized by means of the univariate method. Under the optimum conditions, linear calibration graphs over the concentration range of 25.0 - 500.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ were obtained with the correlation coefficient of 0.9984. The detection limit (s/n=3) was 2.31 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for iron (II). The method was successfully applied to the determination of iron (II) in water samples with a sample throughput of 70 h^{-1} .

คำสำคัญ: โพลินเจกชัน, สเปกโตรโฟโตเมตริก เหล็ก (II), เตตราไซคลิน ตัวอย่างน้ำ

Keywords: flow injection, spectrophotometric, iron (II), tetracycline, water samples

¹รองศาสตราจารย์ สาขาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*corresponding author, e-mail: wirat_ru@kku.ac.th

บทนำ

โพลินเจกชันอะนาไลซิส (Flow Injection Analysis; FIA) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์แบบต่อเนื่องซึ่งได้คิดค้นและนำเสนอเป็นครั้งแรกโดย Ruzicka และ Hansen (Ruzicka and Hansen, 1988) เทคนิคดังกล่าวมีหลักการพื้นฐานดังนี้คือเมื่อทำการผ่าน (flow) สารละลายตัวพา (carrier) และ/หรือ รีเอเจนต์ (reagent) เข้าไปในระบบท่อของสารละลายและเมื่อฉีดสารตัวอย่าง (sample) ที่ต้องการวิเคราะห์เข้าไปผสมสารทั้งหมด จะเกิดปฏิกิริยากันภายในบริเวณท่อทางเดินของสารละลาย บริเวณที่เกิดปฏิกิริยานี้เรียกว่าคอยล์สำหรับผสมสารละลาย (mixing coil) หลังจากที่สารได้ทำปฏิกิริยากันสมบูรณ์แล้ว จะส่งผ่านสารที่เกิดจากปฏิกิริยาเข้าไปสู่ตัวตรวจวัด (detector) ซึ่งจะสามารถตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นได้ สัญญาณที่เกิดขึ้นนี้จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของสารตัวอย่าง ซึ่งเป็นหลักการพื้นฐานของการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ระบบพื้นฐานของโพลินเจกชันอะนาไลซิสจะประกอบไปด้วย (Calatayud, 1996) **หนึ่ง** ระบบขับเคลื่อนสารละลาย (propulsion system) ทำหน้าที่ขับเคลื่อนสารละลายเข้าไปในระบบซึ่งจะใช้ปั๊มแรงดันต่ำหรือที่เรียกว่าปั๊มแบบเพอร์ริสตาลติก **สอง** ระบบนำสารตัวอย่างเข้าสู่การวิเคราะห์ (sample introduction unit) เป็นวิธีที่จะนำสารละลายตัวอย่างเข้าไปสู่กระแสตัวพา (carrier) **สาม** การไหลของสารตัวอย่างและการเกิดปฏิกิริยา (sample transport and reaction) เป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาเฉพาะสำหรับการตรวจวัดแต่ละชนิด และ **สี่** ระบบตรวจวัดสัญญาณ (detection unit) เป็นส่วนที่ตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาเฉพาะต่างๆ

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์โพลินเจกชันอะนาไลซิสแบบย้อนกลับ (reverse flow injection analysis: rFIA) เพื่อวิเคราะห์

ปริมาณเหล็ก (II) โดยใช้เตตราไซคลินเป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยา เทคนิคโพลินเจกชันอะนาไลซิสแบบย้อนกลับจะเป็นเทคนิคที่ใช้สารละลายตัวอย่างทำหน้าที่เป็นสารละลายตัวพา (carrier) จะนำสารตัวอย่างเข้าสู่การวิเคราะห์โดยใช้ปั๊มแรงดันต่ำส่งผ่านสารละลายดังกล่าวไปรวมกับรีเอเจนต์ที่ฉีดผ่านระบบฉีดสาร (injector) ซึ่งวิธีการนี้เป็นระบบการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับกรณีที่มีสารละลายตัวอย่างปริมาณมาก และยังสามารถที่จะประหยัดรีเอเจนต์ได้ (Pojanagaroon et al., 2002) เตตราไซคลิน (Oka et al., 1995) มีลักษณะเป็นผลสีเหลือง ไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้ดี เป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้อย่างแพร่หลายมาเป็นเวลานานและยังคงใช้อยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากออกฤทธิ์ได้กว้างสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเหล็ก (II) ได้ (Sutan et al., 1992) จึงได้นำสารดังกล่าวมาใช้เป็นรีเอเจนต์สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

จากรายงานของงานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมามีหลายวิธีที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเตตราไซคลินและสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเฉพาะ (specific reagent) แล้วทำการวัดสัญญาณที่เกิดขึ้น เทคนิคที่ใช้มีวิธีต่างๆ เช่น วิธีทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical methods) (Galvez et al., 1999) วิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Visible spectrophotometry) (Gong and Zhang, 1997) วิธีฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) (Gracia et al., 2004) และวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลว (liquid chromatography) (Croubles et al., 1995) หรือการเกิดปฏิกิริยากับเตตราไซคลินยังอาจใช้สารที่เกิดปฏิกิริยาเฉพาะแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ (chemiluminescence) เช่น การทำปฏิกิริยากับโบรมีน (bromine) (Alwarthan and Townshend, 1988) หรือเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรท (hexacyano-ferrate(III)) (Pena et al., 2000) เป็นต้น

สารเคมี อุปกรณ์-เครื่องมือ และวิธีการศึกษา

1. สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

- เตตราไซคลิน (Tetracycline hydrochloride : $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$: Fluka[®])

เตรียมสารละลายเตตราไซคลินเข้มข้น 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งเตตราไซคลินมา 0.5000 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจะได้สารละลายเตตราไซคลินเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายที่เตรียมได้มา 90 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จะได้สารละลายเตตราไซคลินเข้มข้น 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- แอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟต (Ammonium ferrous sulfate : $(NH_4)_2 [Fe(SO_4)_2] \cdot 6H_2O$: Fluka[®])

เตรียมสารละลายเหล็ก (II) เข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยการชั่งแอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟตมา 7.0219 กรัม ละลายในกรดไนตริกเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตรในขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเหล็ก (II) เข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก (II) ที่มีความเข้มข้น 25, 50, 100, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยการเจือจางด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตรในปริมาตรที่เหมาะสม

- กรดไนตริก (Nitric acid : HNO_3 : J. T. Baker[®])

เตรียมกรดไนตริกเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร ทำได้โดยเปิดกรดไนตริกเข้มข้น 65 % มา 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร จะได้กรดไนตริกเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร จากนั้นเปิดสารละลายที่เตรียมได้มา 1 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร จะได้กรดไนตริกเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร

2. อุปกรณ์-เครื่องมือระบบโพลินเจกชัน

- ระบบนำส่งสารละลายแรงดันต่ำ (Peristaltic Pump EYERA[®] รุ่น MP1000, Japan)

- ระบบฉีดสารตัวอย่าง (Injector Rheodyne[®] รุ่น 5020, U.S.A.)

- ท่อนำส่งสารละลาย (PTFE tubing) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.8 mm (Elkay[®], Ireland)

- ระบบตรวจวัดสัญญาณแบบ UV-Visible Detector (LCD[®] รุ่น UV-3200, U.S.A.)

- เครื่องบันทึกสัญญาณ (Kip & Zonen[®] รุ่น BD50, The Netherlands)

3. การเตรียมตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำเก็บมาจากบึงศรีฐานซึ่งเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติภายในมหาวิทยาลัยขอนแก่น เก็บตัวอย่างน้ำในภาชนะที่ทำด้วยโพลีเอทิลีน (polyethylene container) ที่ผ่านการล้างด้วยกระบวนการล้างเครื่องแก้วแบบปกติ แล้วกลั้วภาชนะด้วยกรดไนตริกและน้ำกลั่นปราศจากไอออนก่อนการวิเคราะห์นำตัวอย่างน้ำมากรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No 40 และนำตัวอย่างน้ำมาทำการรีดักชัน (reduction) โดยใช้สารละลายของกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เพื่อทำการเปลี่ยนเหล็ก (III) ในสารละลายตัวอย่างน้ำให้อยู่ในรูปของเหล็ก (II) (Pascual-Reguera et al., 1997) และต้องทำสารละลายของตัวอย่างน้ำให้มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชัน (oxidation) ของเหล็ก (II) ในสารละลายตัวอย่างน้ำย้อนกลับไปเป็นเหล็ก (III) (Barry et al., 1994)

4. วิธีโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับ

ใช้แมนิโฟลด์ (manifold) สำหรับระบบโพลินเจกชันอะนาลิซิสที่ออกแบบไว้ดังแสดงในรูปที่ 1 ด้วยการฉีด (inject) สารละลายเตตราไซคลินที่ใช้เป็นรีเอเจนต์เข้มข้น 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณครั้งละ 200 ไมโครลิตร ผ่านเข้าไปในกระแสสารละลายมาตรฐาน (standard solution)

หรือสารละลายตัวอย่าง (sample stream) ที่ต้องการหาความเข้มข้นของเหล็ก (II) โดยใช้สารละลายของกรดไนตริกเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตรเป็นตัวทำละลาย สารละลายตัวอย่างนี้จะไหลด้วยอัตราเร็วในระบบโพลินเจกชันอะนาลิซิสเท่ากับ 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที มีความยาวของคอยล์สำหรับผสมสารละลาย (mixing coil) ยาว 75 เซนติเมตร ใช้ยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อน ที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลายเตตราไซคลินกับสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างเหล็ก (II) ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ทำการบันทึกลักษณะสัญญาณ FI-grams ที่ได้ด้วยเครื่องบันทึกสัญญาณ (chart recorder) นำค่าความสูงของสัญญาณที่ได้มาทำการคำนวณหาปริมาณตัวอย่างที่ทำการศึกษาต่อไป

ผลการศึกษา

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II) ด้วยวิธีโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับ ได้หาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมโดยใช้วิธีการศึกษาปัจจัยครั้งละหนึ่งปัจจัย (univariate method) การศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมดังกล่าวจะศึกษาจากสารละลายมาตรฐานเหล็ก (II) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาทั้งหมดได้แสดงในตารางที่ 1

การหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสม

ทำการบันทึกสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลายมาตรฐานเหล็ก (II) กับสารละลายเตตราไซคลินด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 200 - 700 นาโนเมตร พบว่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ให้ค่าความว่องไวในการวิเคราะห์ปริมาณสูงสุดที่ 440 นาโนเมตร โดยพบว่าการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลายตัวอย่างเหล็ก (II) กับสารละลายเตตราไซคลิน (Sultan et al., 1992) จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถแสดงได้ด้วยสมการเคมีในรูปที่ 2 จึงใช้ข้อมูลพื้นฐาน

ดังกล่าวนี้ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมต่อไป

ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเตตราไซคลินที่ใช้เป็นรีเอเจนต์ ได้ทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 100, 300, 500, 700 และ 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความสูงของสัญญาณมีค่าเท่ากับ 85.5, 138.5, 172.0, 190.5 และ 215.5 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ค่าที่เหมาะสมสำหรับความเข้มข้นของสารละลายเตตราไซคลินมีค่าเท่ากับ 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหากความเข้มข้นของเตตราไซคลินสูงมากกว่านี้ จะทำให้เกิดการอุดตันของตะกอนที่เกิดขึ้นจากสาร ประกอบเชิงซ้อนในระบบท่อได้ ผลการศึกษาได้แสดงในรูปที่ 3

ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดไนตริก ได้ทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 0.5, 0.05, 0.005 และ 0.0005 โมลต่อลิตร พบว่าความสูงของสัญญาณมีค่าเท่ากับ 56.5, 115.0, 222.0 และ 160.0 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ค่าที่เหมาะสมสำหรับความเข้มข้นของสารละลายกรดไนตริกมีค่าเท่ากับ 0.005 โมลต่อลิตร จากการศึกษาพบว่าหากความเข้มข้นของกรดไนตริกมีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.0005 โมลต่อลิตร จะพบว่าสารละลายที่เกิดขึ้นจะมีความขุ่นของสารละลายปรากฏขึ้นซึ่งจะมีผลต่อความคงที่ของสัญญาณที่ทำการบันทึก ผลการศึกษาได้แสดงในรูปที่ 4

ผลการศึกษาความยาวของคอยล์ผสมสารละลาย (mixing coil) และปริมาตรของเตตราไซคลินซึ่งใช้เป็นรีเอเจนต์ที่ฉีดเข้าไปในระบบโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับ ได้ทำการศึกษาความยาวของคอยล์ที่มีความยาว 25, 50, 75, 100 และ 125 เซนติเมตร และปริมาตรของรีเอเจนต์ในการวิเคราะห์ 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร จากการศึกษาได้ค่าความสูงของสัญญาณมีค่าเท่ากับ 107.5, 194.5, 200.0, 164.0, 159.0 และ 121.0, 136.5, 170.0, 191.0, 197.5 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ พบว่าความยาวของคอยล์ผสมสารละลายที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 75 เซนติเมตร และปริมาตรของเตตราไซคลินที่ใช้เป็นรีเอเจนต์ที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 200 ไมโครลิตร โดยพิจารณา

จากลักษณะของสัญญาณที่บันทึกได้ และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เหมาะสม ผลการศึกษาได้แสดงในรูปที่ 5 และรูปที่ 6

ผลการศึกษาอัตราเร็วของสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างเหล็ก (II) ที่ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับทำการศึกษาอัตราเร็วของสารละลายในช่วงที่เท่ากับ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่ออนาที ได้ค่าความสูงของสัญญาณมีค่าเท่ากับ 100.0, 170.0, 205.0, 159.5 และ 108.5 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ พบว่าอัตราเร็วที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์นี้มีค่าเท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่ออนาที ผลการศึกษาได้แสดงในรูปที่ 7

คุณลักษณะของการวิเคราะห์

ภายใต้สภาวะการทดลองที่ได้ทำการศึกษาค้นคว้าค่าที่เหมาะสมสำหรับวิธีโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับสำหรับหาปริมาณเหล็ก (II) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ทำการสร้าง กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเหล็ก (II) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 25.0 - 500.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม พบความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงสามารถแสดงได้ด้วยสมการ $y = 0.0276x + 2.2892$ เมื่อ x เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างเหล็ก (II) มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และ y เป็นค่าความสูงของสัญญาณที่วัดได้มีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์ ค่าสัมประสิทธิ์ของความเป็นเส้นตรง (correlation coefficient ; r^2) เท่ากับ 0.9984 ($n = 5$) ค่าขีดจำกัดต่ำสุด (LOD) ในการวิเคราะห์เท่ากับ 2.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และค่าขีดจำกัดต่ำสุด (LOQ) ของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 12.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

ค่าเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (%R.S.D.) ของความถูกต้องในการวิเคราะห์ซ้ำๆ (reproducibility) ในสารละลายตัวอย่างเหล็ก (II) ที่ความเข้มข้น 50 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ($n=12$) อยู่ในช่วง 0.93 - 1.86 % มีค่าเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับ (percentage of recoveries) ของสารละลายตัวอย่างเหล็ก (II) ที่มีความเข้มข้น 50 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

($n=3$) อยู่ในช่วง 101.25 - 115.33 % เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโทรโฟโตเมตรีที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับของสารละลายตัวอย่างเหล็ก (II) ที่มีความเข้มข้น 50 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ($n=3$) อยู่ในช่วง 91.71 - 103.75 % การวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II) โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่าไอออน Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+} มีการรบกวนการวิเคราะห์เล็กน้อยจนไปถึงปานกลางซึ่งให้ค่าความสูงสัมพัทธ์ของพีค (relative of peak height) อยู่ระหว่าง 82.25 - 114.37 % เมื่อเทียบกับกรณีที่ไม่มีสารรบกวนอยู่ในสารละลายตัวอย่างน้ำแม้ว่าจะมีไอออนเหล่านี้อยู่ในปริมาณถึง 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมก็ตาม

ในการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II) ในตัวอย่างน้ำได้ทำการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ระหว่างวิธีโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับ และวิธีอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโทรโฟโตเมตรีดังผลการศึกษาได้แสดงในตารางที่ 2 ได้ทำการทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้ student t -test จากข้อมูลดังกล่าวสามารถคำนวณค่า $t = 0.56$ ซึ่งเป็นค่าน้อยกว่าค่าทางทฤษฎี (2.57, $n = 6$) ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 % ($p \text{ value} = 95 \%$) สามารถสรุปได้ว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II) ที่ได้จากทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือกล่าวได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II) ด้วยวิธีโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับมีความถูกต้องไม่แตกต่างกันจากวิธีการวิเคราะห์เหล็ก(II) ด้วยวิธีมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

วิธีโพลินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ ได้แสดงแล้วว่าเป็นวิธีที่ง่ายมีความถูกต้องที่สูงและมีความไวที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II) ช่วงความกว้างของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วงที่สามารถใช้ประโยชน์ในด้านการวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็ก (II) ได้อย่างสมเหตุผล วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ใช้สารเคมีปริมาณน้อย มีค่าใช้จ่าย

ต่อตัวอย่างที่ต่ำและประหยัด มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เร็วถึง 70 ตัวอย่างต่อชั่วโมง วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ในกรณีที่มีตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนมาก สำหรับงานประจำทั่วไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

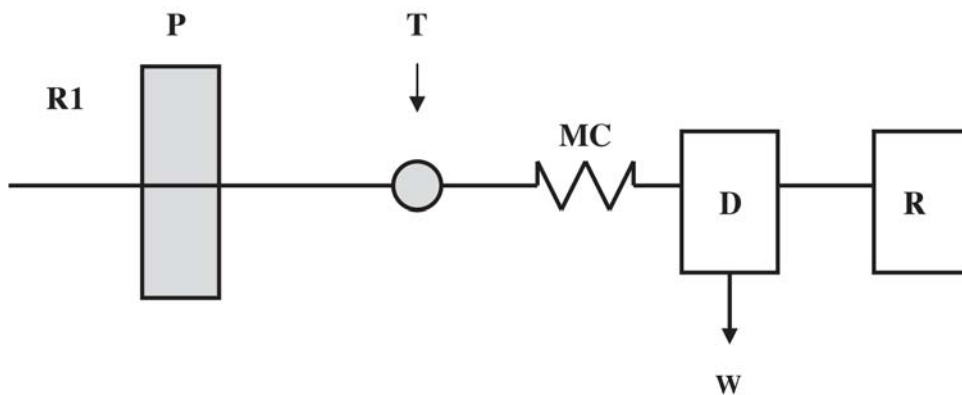
กิตติกรรมประกาศ

ผู้ศึกษาวิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัย สำหรับโครงการวิจัยนี้ ผ่านทุนอุดหนุนทั่วไปมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2548 และขอขอบคุณงานบริการทางวิชาการและวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ ที่สนับสนุนอุปกรณ์บางส่วนสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

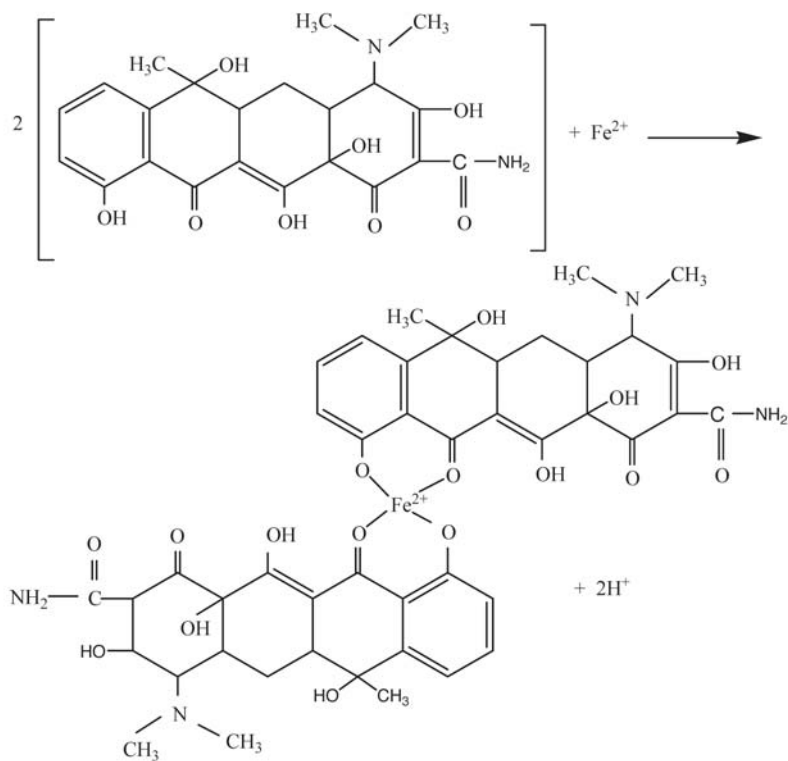
- Alwarthan, A.A. and Townshend, A. 1988. Determination of tetracycline by flow injection with chemiluminescence detection. **Anal. Chim. Acta** 205(1): 261-265.
- Barry, R.C., Schnoor, J.L., Sulzberger, B., Sigg, L. and Stumm, W. 1994. Iron oxidation kinetics in an acidic alpine lake. **Water Res.** 28(2): 323-333.
- Calatayud, J.M. 1996. **Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals**. London, Taylor & Francis. Chapter 3.
- Croubels, S., Baeyens, W. and Peteghem, C.V. 1995. Post-column zirconium chelation and fluorescence detection for the liquid chromatographic determination of tetracyclines. **Anal. Chim. Acta** 303(1): 11-16.
- Galvez, A.M., Mateo, J.V.G. and Calatayud, J. M. 1999. Study of various indicating redox systems on the indirect flow-injection biamperometric determination of pharmaceuticals. **Anal. Chim. Acta** 396(2-3): 161-170.
- Gong, Z. and Zhang, Z. 1997. Determination of tetracyclines with a modified β -cyclodextrin based fluorosensor. **Anal. Chim. Acta** 351(1-3): 205 - 210.
- Graciá, I., Sarabia, L.A. and Ortiz, M.C. 2004. Detection capability of tetracyclines analysed by a fluorescence technique: comparison between bilinear and trilinear partial least squares models. **Anal. Chim. Acta** 501(2): 193-203.
- Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K. and Macneil, J. D. 1995. **Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture**. Arlington, AOAC International, Chapter 10.
- Oka, H., Uno, K., Harada, K., Yasaka, K. and Suzuki, M. 1984. Improvement of chemical analysis of antibiotics : V. A simple method for the analysis of tetracyclines using reversed-phase high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A** 298(3): 435 - 443.
- Pascual-Reguera, M.I., Ortega-Carmona, I. and Molina-Diaz, A. 1997. Spectrophotometric determination of iron with ferrozine by flow injection analysis. **Talanta** 44(10): 1793-1801.
- Pena, A., Palilis, L.P., Lino, C.M., Silveira, M.I. and Calokerinos, A.C. 2000. Determination of tetracycline and its major degradation products by chemiluminescence. **Anal. Chim. Acta** 405(1-2): 51-56.

- Pojanagaroon, T., Watanesk, S., Rattanaphani, V. and Liawruangrath, S. 2002. Reverse flow injection spectrophotometric determination of iron (III) using norfloxacin. **Talanta** 58(6): 1293-1300.
- Ruzicka, J. and Hansen, E.H. 1988. **Flow Injection Analysis**. 2nd ed., New York, John Wiley & Son, Chapter 1-2.
- Sultan, S.M., Suliman, F.O., Duffuaa, S.O. and Abu-Abdoun, I.I. 1992. Simplex-optimizes and flow injection spectrophotometric assay of tetracycline antibiotics in drug formulations. **Analyst** 117(6): 1179-1183.

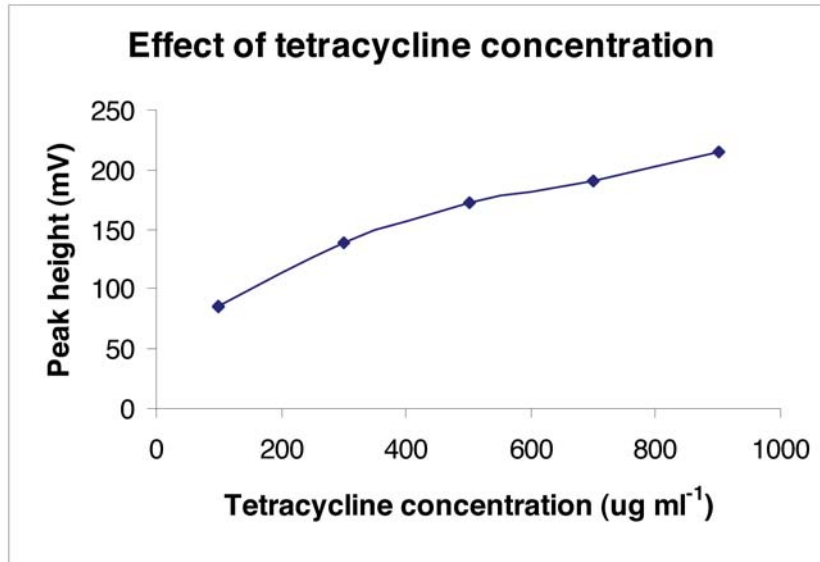


รูปที่ 1. ลักษณะเมนิโพลด์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II)

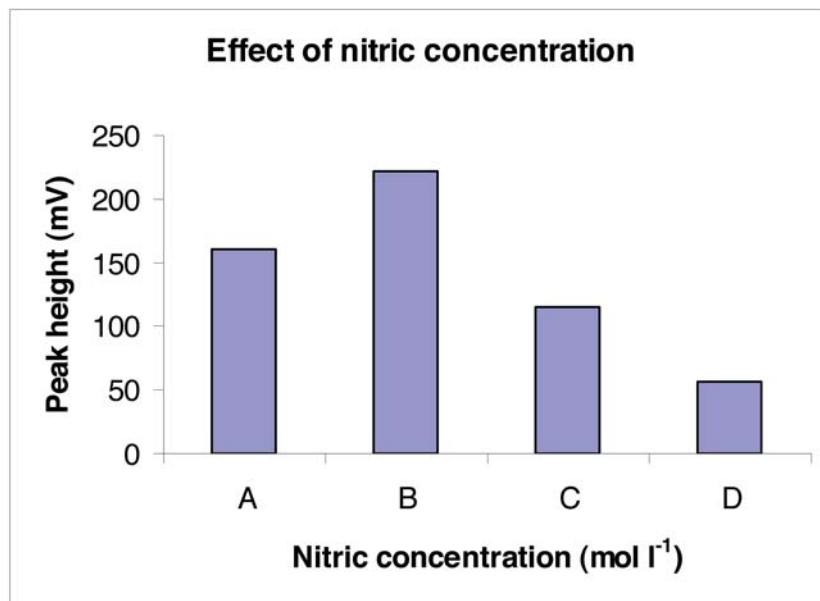
[R1, iron (II) standard/sample; P, Pump; T, Tetracycline reagent; MC, Mixing coils; D, Detector; R, Recorder; W, Waste]



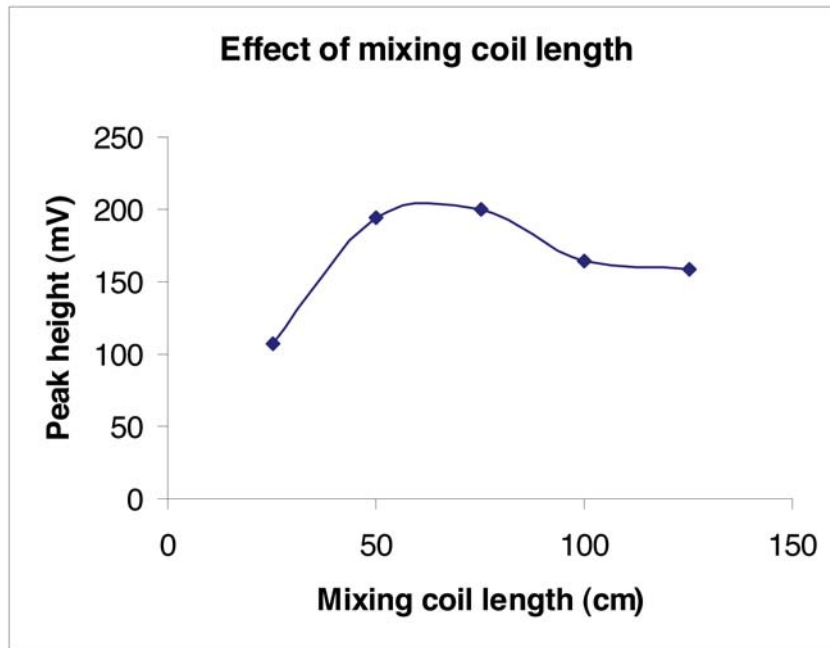
รูปที่ 2. สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลายเหล็ก (II) และเตตราไซคลิน



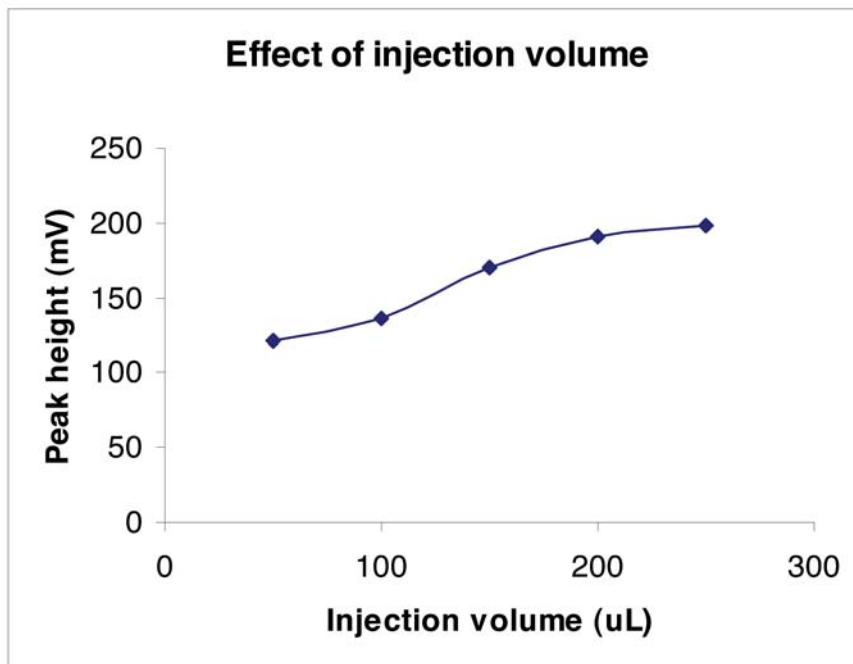
รูปที่ 3. ความเข้มข้นของเตตราไซคลินที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II)



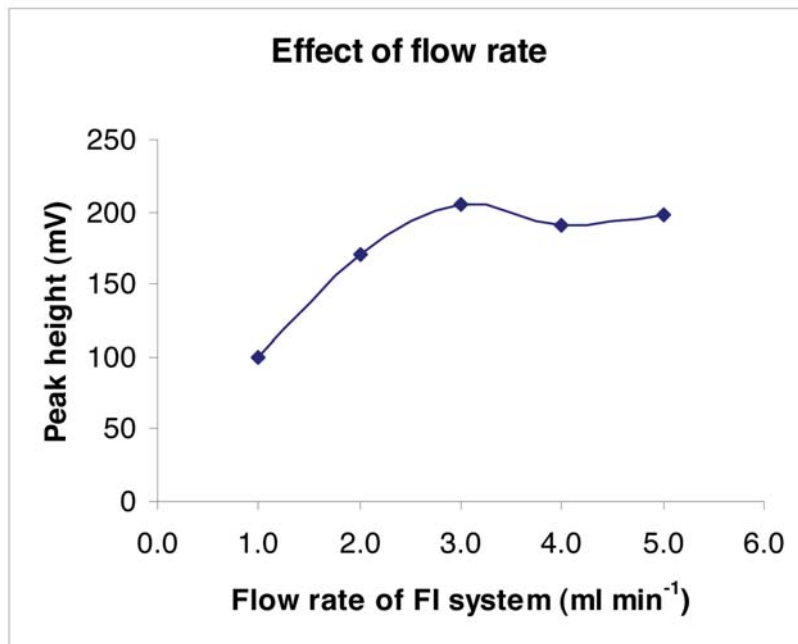
รูปที่ 4. ความเข้มข้นของกรดไนตริกที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II)
 (A: 5 x 10⁻⁴; B: 5 x 10⁻³; C: 5 x 10⁻²; D: 5 x 10⁻¹ mol l⁻¹)



รูปที่ 5. ความยาวของคอยล์สำหรับผสมสารละลายที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II)



รูปที่ 6. ปริมาตรของเตตราไซคลินที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II)



รูปที่ 7. อัตราเร็วของระบบโพลินเจกชันที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II)

ตารางที่ 1. สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก (II) โดยใช้เทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับ

สภาวะการทดลองที่ทำการศึกษา	สภาวะการทดลองที่เหมาะสม
ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ (200-700 nm)	440
ความเข้มข้นของสารละลายเตรนโซลีน (100, 300, 500, 700, 900 µg ml ⁻¹)	900
ความเข้มข้นกรดไนตริก (0.5, 0.05, 0.005, 0.0005 mol l ⁻¹)	0.005
ความยาวของคอยล์สำหรับผสมสารละลาย (25, 50, 75, 100, 125 cm)	75
ปริมาตรเตรนโซลีนที่ใช้ในการวิเคราะห์ (50, 100, 150, 200, 250 µl)	200
อัตราเร็วในการไหลของสารละลายเหล็ก (II) (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ml min ⁻¹)	3.0
Detector : UV-Visible Spectrophotometer	
: Rise time (sec)	1.0
: Display	AU
: Range (AUFS)	0.20
: อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิห้อง
กราฟมาตรฐาน : Linear equation	$y = 0.0276x + 2.2892$
: Linearity (µg ml ⁻¹)	25.0-500.0
: Correlation coefficient ; r ²	0.9984
: LOD (µg ml ⁻¹)	2.31
: LOQ (µg ml ⁻¹)	12.46

ตารางที่ 2. เปรียบเทียบวิธีโฟลอินเจกชันอะนาลิซิสแบบย้อนกลับที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโทรโฟโตเมตรี

ตัวอย่าง ^a	ปริมาณเหล็ก (II) ที่ตรวจพบ (µg ml ⁻¹)		
	rFIA ^b	FAAS ^c	t-test
A	137.78	128.27	9.51
B	81.51	83.10	-1.59
C	360.65	378.28	-17.63
D	224.05	218.65	5.4
E	171.77	165.51	6.26
F	346.93	333.49	13.44
			$D = 2.56$
			$S.D. = 11.08$
			$t = 0.56$
			$t\text{-distribution (95\%)} = 2.57$

^a Average from five determinations

^b Reverse flow injection analysis

^c Flame atomic absorption spectrophotometry