

การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยใช้เทคนิคโวลแทมเมตรี  
ที่มีไส้ดินสอด่เป็นขั้วไฟฟ้า  
ปริญญามาสาวัตดี

**The Determination of Tetracycline Antibiotics by Voltammetry  
Using Pencil Lead Electrode**

Prinya Masawat

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ จังหวัดพิจิตร 65000

Corresponding author. E-mail: prinyam@nu.ac.th

**บทคัดย่อ**

ในงานวิจัยนี้ได้มีการออกแบบและสร้างขั้วไฟฟ้าราคาถูกสำหรับการวิเคราะห์ในเทคนิคโวลแทมเมตรี โดยการใช้ไส้ดินสอด่ 5H เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ใช้ลวดสแตนเลสเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย และใช้ลวดเงินเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ในการตรวจหายาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในตัวอย่างนม สารตัวอย่างนมและสารละลายมาตรฐานกลุ่มเตตราซัยคลินจะเตรียมอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์แมกเนซียมที่มีพีเอชเท่ากับ 4.4 และเติม 0.1 โมลาร์ อีดีทีเอ และ 10 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย แล้วทำการวิเคราะห์ในสแตติก เซลล์ โดยการเปิดสารละลายตัวอย่างในปริมาณที่เหมาะสมลงไป จากการศึกษาด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรีพบว่าให้แคโทดิกเวฟที่มีกระแสสูงสุดในช่วง -0.2 ถึง -0.6 โวลต์ และในการหาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำนมตัวอย่าง จะต้องทำการสกัดสารกลุ่มนี้ออกจากน้ำนมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งซึ่งใช้ฟอริซิลเป็นตัวดูดซับ ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลโวลแทมเมตรี โดยพบว่าวิธีดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.5 – 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าร้อยละการคืนกลับของเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ ดอกซีซัยคลิน เท่ากับ 104, 103, 105 และ 102 ตามลำดับ และพบว่าค่าต่ำสุดของการตรวจวัด คือ 0.26, 0.29, 0.30 และ 0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ ดอกซีซัยคลิน ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน ขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอด่ เทคนิคโวลแทมเมตรี

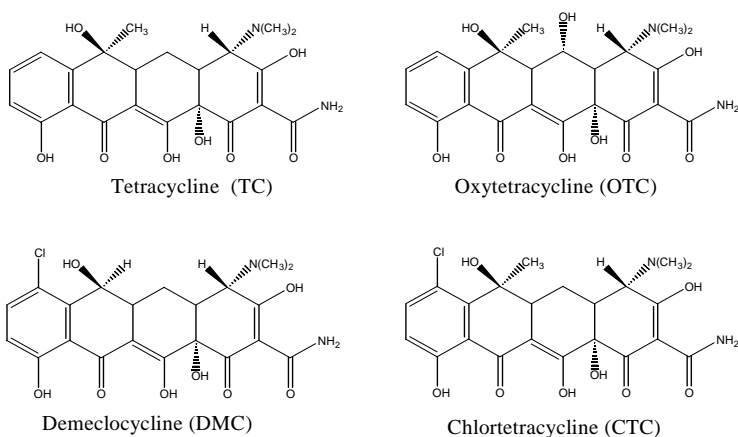
### Abstract

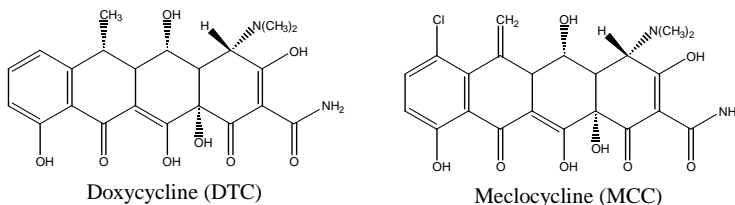
A low – cost electrochemical electrode is designed and fabricated to used in voltammetry. The 5H pencil lead electrode was used as a working electrode, a stainless steel wire was used as an auxiliary electrode and silver wire was used as a reference electrode in the voltammetric cell. For the determination of tetracyclines antibiotics residues in milk, appropriate volume of sample and / or standard solution containing tetracyclines in pH 4.4 McIlvaine buffer solution + 0.1 M EDTA + 10 mM KCl was pipetted into the static cell. The well defined cyclic voltammogram exhibited an cathodic wave on negative scan in the region of -0.2 to -0.6 V. Milk samples were extracted and purified using a solid – phase extraction florisil cartridge followed by analysed using differential pulse voltammetry. The linear range was obtained between 0.5 to 2.5 mg L<sup>-1</sup>, the percentage recoveries of tetracycline hydrochloride (TCH), chotetracycline hydrochloride (CTCH), oxytetracycline hydrochloride (OCH) and doxycycline hydrochloride (DCH) were obtained at 104, 103, 105 and 102, respectively. The detection limit were found to be 0.26, 0.29, 0.30 and 0.29 mg L<sup>-1</sup> for TCH, CTCH, OCH and DCH, respectively.

*Keywords:* tetracycline antibiotics pencil lead electrode voltammetry

### บทนำ

เตตราซัยคลินและอนุพันธ์เช่น คลอเตตราซัยคลินและดอกซีซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะดังกล่าวมีโครงสร้างตามรูป 1





**รูป 1** โครงสร้างทางเคมีของเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน ดิมิโคลซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ดอกซีซัยคลินและมีโคลซัยคลิน (Yang *et al.*, 2005)

ในปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ โดยจะใช้เพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียต่าง ๆ และใช้เพื่อชะลอการเน่าเปื่อยของเนื้อสัตว์ ซึ่งปริมาณยาที่ตกค้างอยู่ในกล้ามเนื้อหรือขนของสัตว์ อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ถ้าได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากเกินไปกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งอาจมีพิษและฤทธิ์แทรกซ้อนเกี่ยวกับระบบต่าง ๆ ของร่างกาย (บุญเจือ ธรณินทร์, 2522) เช่น ระบบทางเดินอาหาร มีผลต่อกระดูกและฟัน และเกิดผลกระทบต่อตับและไตได้ จึงมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หายาปฏิชีวนะดังกล่าวด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น ยูวี-วิซิเบิล สเปกโทร โฟโตเมตรี (Poiger and Schlatter, 1976; Gong and Zhang, 1997; Liu *et al.*, 1997), เคมีลูมิโนเมตรี (Halvatzis *et al.*, 1993; Goicoechea and Olivieri, 1999), โครมาโทกราฟีของเหลว (Croubels *et al.*, 1995) และ เทคนิคเคมีไฟฟ้า (Palaharn *et al.*, 2003; Wangfuengkanagul *et al.*, 2004; Townshend *et al.*, 2005) จากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องข้างต้นยังไม่มีรายงานการหาปริมาณสารเตตราซัยคลินในนมโดยใช้ขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอด (Pencil lead electrode) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (working electrode) เลย ซึ่งจากการศึกษาหาส่วนประกอบของไส้ดินสอด 5H (Steadler, Germany) ที่นำมาเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ด้วยเทคนิค X-ray Diffraction (XRD) พบว่าไส้ดินสอดมีปริมาณของแกรไฟต์ (graphite) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งแกรไฟต์สามารถเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดีจึงสามารถนำมาใช้เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานแทนแกลสซี คาร์บอน (glassy carbon) ซึ่งมีราคาแพงกว่าได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนมโดยใช้ขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอดที่มีราคาถูก ร่วมกับเทคนิคโพลาร์เรสเซียลพัลส์โวลแทมเมตรี (differential pulse voltammetry)

**อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง**

**1. สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง**

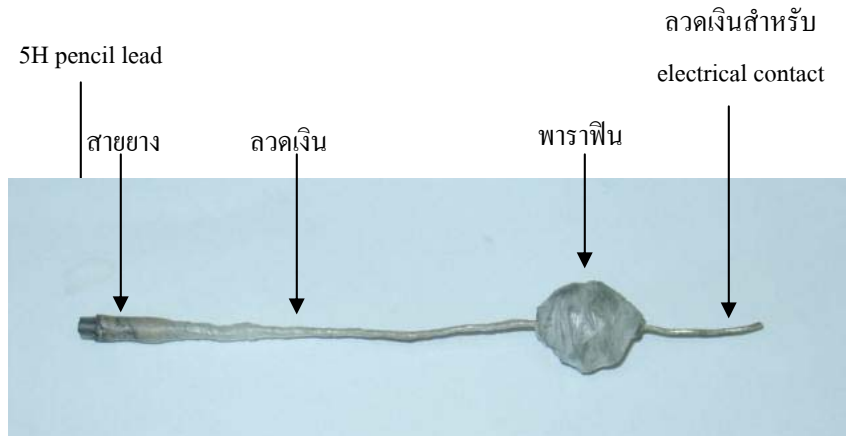
ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานสองชนิดคือ ขั้วปรอทและไส้ดินสอด ในการศึกษาปฏิกิริยารีดอกซ์ของเตตราซัยคลิน โดยระบบที่ใช้ขั้วปรอทเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานจะใช้ขั้วไฟฟ้าช่วยเป็นลวด

แพลทตินัม และใช้ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วยเป็น 0.1 โมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ (pH = 4) ซึ่งเตรียมโดยการชั่ง  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 2.3950 กรัม ละลายด้วย 0.1 โมลาร์ กรดอะซิติก และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้ได้ pH = 4 โดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วทำการศึกษาช่วงศักย์ไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเตรียมได้จากการชั่งเตตราซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ จำนวน 0.0120 กรัม นำมาละลายใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ (pH = 4) ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 25 มิลลิลิตร แล้วจึงเปิดสารละลายมาตรฐานที่ได้มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน static cell ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีโดยมีช่วงศักย์ไฟฟ้าของการสแกนจาก -1200 ถึง 0 มิลลิโวลต์ (drop size = 9, sweep rate = 500 มิลลิโวลต์ต่อวินาที)

สำหรับระบบที่ใช้สี่ดินสอด 5H (Steadler, Germany) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานจะใช้ขั้วไฟฟ้าช่วยเป็นลวดสแตนเลส และใช้ลวดเงินเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วยเป็น McIlvaine buffer (pH = 4.4) + 0.1 โมลาร์ EDTA + 10 มิลลิโมลาร์ KCl ซึ่งเตรียมโดยการชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 20.95 กรัม และ citric acid 40.39 กรัมละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ด้วย NaOH จากนั้นเติม 0.1 โมลาร์ EDTA จำนวน 37.224 กรัม และ 10 มิลลิโมลาร์ KCl 0.7455 กรัม จากนั้นปรับ pH = 4.4 แล้วทำการศึกษาช่วงศักย์ไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเตรียมได้จากการชั่งเตตราซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ จำนวน 0.0120 กรัม นำมาละลายในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 25 มิลลิลิตร แล้วจึงเปิดสารละลายมาตรฐานที่ได้มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน static cell ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีโดยมีช่วงศักย์ไฟฟ้าของการสแกนจาก 1900 มิลลิโวลต์ ถึง -600 มิลลิโวลต์ (sweep rate = 20 มิลลิโวลต์ต่อวินาที)

#### การสร้างขั้วไฟฟ้าใช้งานทำได้ดังนี้

นำสี่ดินสอด 5H ขาวเท่ากับ 5 มิลลิเมตร มาเจาะรูด้านหนึ่งให้ลึกประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วต่อกับลวดเงิน โดยมีกาว epoxy ชนิดนำไฟฟ้าได้เป็นตัวเชื่อม จากนั้นนำสายยางหุ้มสี่ดินสอดและลวดเงิน แล้วใช้กาว epoxy เชื่อมอีกครั้งเพื่อเพิ่มความแข็งแรง เมื่อขั้วไฟฟ้าแห้งแล้วนำไปขัดผิวด้านหน้าของสี่ดินสอดให้เรียบจนมันวาวและมีระดับเท่ากับสายยางที่หุ้มโดยก่อนการใช้งานทุกครั้งต้องทำการขัดผิวหน้าให้เรียบเสมอโดยวิธี metal polishing ขั้วไฟฟ้าที่ประกอบสำเร็จพร้อมใช้งานเป็นดังรูป 2



รูป 2 ขั้วไฟฟ้าใช้งานไส้ดินสอด (5H pencil lead working electrode) ที่สร้างขึ้น

ในการทำการกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) เพื่อการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ ดอกซีซัยคลิน ด้วยเทคนิค differential pulse voltammetry โดยระบบที่ใช้ไส้ดินสอด 5H เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเปิดสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วยใส่ใน static cell ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เปิดสารละลายมาตรฐานของแต่ละชนิด ลงใน static cell โดยเปิดแต่ละความเข้มข้นๆ ละ 5 ครั้งๆ ละ 10 ไมโครลิตร ทำการวัดกระแสของแต่ละความเข้มข้น โดยช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ใช้คือ 100 มิลลิโวลต์ ถึง -600 มิลลิโวลต์ (pulse amplitude = 50 มิลลิโวลต์, pulse time = 40.0 มิลลิวินาที, measurement time = 20.0 มิลลิวินาที, sweep rate = 20.0 มิลลิโวลต์ต่อวินาที) พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นกับกระแสเพื่อทำการกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน

การหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Detection limit) สามารถทำได้โดยการเปิดสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วยปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน static cell แล้วทำการวัดกระแสของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย 20 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และคำนวณหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดตามสูตร (Skoog *et al.*, 1998)

การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำนมตัวอย่าง ทำได้โดยนำตัวอย่างนม ซึ่งใช้นมกล่องพาสเจอร์ไรต์ที่มีขายตามท้องตลาดมา 15 มิลลิลิตร แล้วเปิดสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ ดอกซีซัยคลิน ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปให้มีความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvanine-EDTA จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง 15 นาที แล้วเก็บส่วนใส นำไปสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction, SPE) โดยทำได้ดังนี้

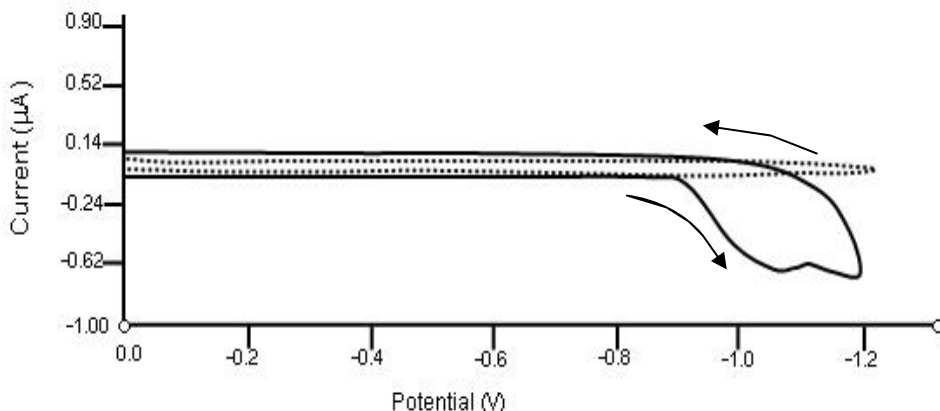
ค่อยๆ เท Florisil 0.5 กรัม ใน methanol ลงในหลอดฉีดขนาด 3 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อปรับสภาพของ Florisil จากนั้นเท Hexane, Dichloromethane และ Methanol อย่างละ 2 มิลลิลิตรลงไปตามลำดับอย่างต่อเนื่อง ระวังอย่าให้คอลัมน์แห้งและ Florisil ไม่จับตัวกัน จากนั้นเท ส่วนใสของตัวอย่างนมลงไป 3 มิลลิลิตร เริ่มเก็บตัวอย่าง จากนั้น เท McIlvaine buffer ( pH = 4.4 ) + 0.1 โมลาร์ EDTA + 10 มิลลิโมลาร์ KCl ลงไป 8 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างรวมกับส่วนแรก นำน้ำนม ตัวอย่างที่ได้จากการสกัด ซึ่งมีความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมาความเข้มข้น ละ 10 มิลลิลิตร เทลงใน static cell แล้วจึงทำการวัดกระแสของแต่ละความเข้มข้น โดยช่วงศักย์ไฟฟ้า ที่ใช้คือ 100 มิลลิโวลต์ ถึง -600 มิลลิโวลต์ (pulse amplitude = 50 มิลลิโวลต์, pulse time = 40.0 มิลลิวินาที, measurement time = 20.0 มิลลิวินาที, Sweep rate = 20.0 มิลลิโวลต์ต่อวินาที) พล็อตกราฟ ระหว่างความเข้มข้นกับกระแสเพื่อทำกราฟมาตรฐาน

การหาร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ของการสกัดสารกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างนม ทำได้โดยการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีการข้างต้น แล้วทำการเติมสารละลายมาตรฐานลงไปให้มีความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรของเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ คอกซีซัยคลิน แล้วทำการทดลองด้วยเทคนิค differential pulse voltammetry ใช้สภาวะ เดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นทำการวัดกระแสของแต่ละความเข้มข้น ทำการพล็อตกราฟระหว่าง ความเข้มข้นกับกระแส แล้วหา % recovery โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน

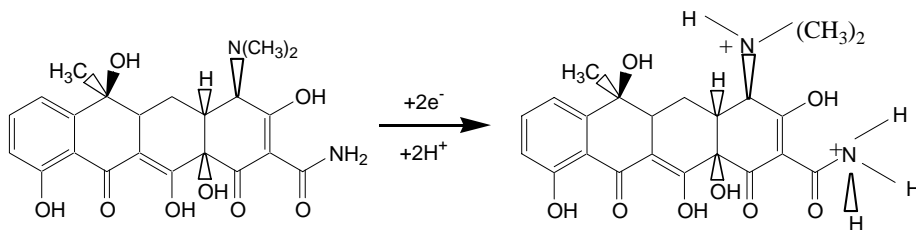
### ผลการทดลองและการวิจารณ์

1. การศึกษาช่วงศักย์ไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี เมื่อใช้ขั้วปรอทและใช้ดินสอเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน

เมื่อใช้ขั้วปรอทเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่เกิดขึ้น ดังรูป 3 พบว่า ปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินจะเกิดในช่วง -0.9 ถึง -1.2 โวลต์ ซึ่งเป็นการ เกิดแคโทดิกพีคของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ขั้วปรอทโดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังรูป 4

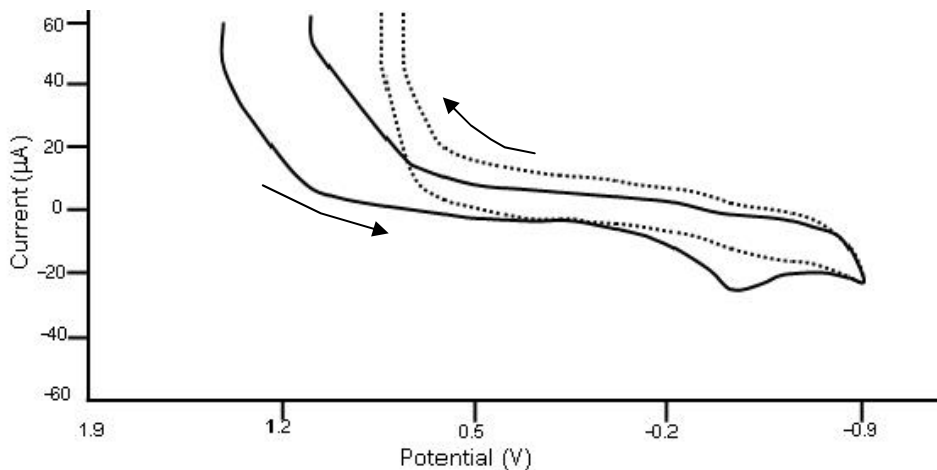


รูป 3 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิโมลาร์ เตตราซัยคลิน ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ (pH = 4) (—) และ ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ 0.1 โมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ (pH = 4) (···) เมื่อใช้ขั้วปรอท เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน



รูป 4 ปฏิกิริยารีดักชันของเตตราซัยคลิน

เมื่อใช้ไส้ดินสอด 5H เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่เกิดขึ้น ดังรูป 5 พบว่า เกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ในช่วง -0.2 ถึง -0.4 โวลต์ ซึ่งเป็นการเกิด แคโทดิกฟลิกของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินที่ไส้ดินสอด ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังรูป 4



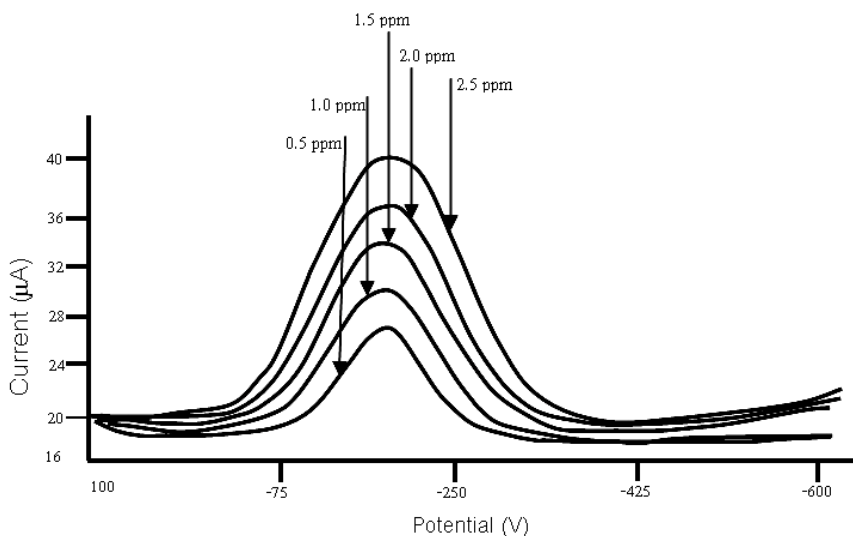
**รูป 5** ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิโมลาร์ เตตราซัยคลินในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย (-) และ ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย (....) เมื่อใช้ใส่ดินสอ 5H เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน

เมื่อเปรียบเทียบไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้ของสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิโมลาร์ ของเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ ไดออกซีซัยคลิน พบว่า โวลแทมโมแกรมที่ได้มีลักษณะคล้ายกัน คือ เกิดเป็นแคโทดิกพีค ในช่วง -0.2 ถึง -0.4 โวลต์ และเกิดปฏิกิริยารีดักชันซึ่งทำให้โมเลกุลมี H เพิ่มขึ้น 2 ตัวในโครงสร้าง

## 2. การวิเคราะห์เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ ไดออกซีซัยคลิน ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry โดยมีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นใส่ดินสอ 5H

จากดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมโมแกรมดังรูป 6 พบว่า กระแสแคโทดิกของเตตราซัยคลินแปรตามความเข้มข้นของสาร เมื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดกับกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ และคำนวณค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดได้ผลดังแสดงในตาราง 1





**รูป 6** คิวเฟอว์เรสเชียลพัลส์โวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน  
เข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย  
เมื่อใช้ไส้คินสอเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน

**ตาราง 1** ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและกระแสไฟฟ้าของสารละลายมาตรฐานเตตรา  
ซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ คอกซีซัยคลิน

สารละลาย มาตรฐาน	ค่าความเป็น เส้นตรง (mg/L)	ค่าสัมประสิทธิ์ ความสัมพันธ์ ( $r^2$ )	สมการเชิงเส้น	Detection limit (mg/L)
เตตราซัยคลิน	0.5-2.5	0.9907	$Y = 3.5092x + 0.672$	0.26
คลอเตตรา ซัยคลิน	0.5-2.5	0.9915	$Y = 3.4128x + 0.8296$	0.29
ออกซีเตตรา ซัยคลิน	0.5-2.5	0.9875	$Y = 3.3726x + 1.0939$	0.30
คอกซีซัยคลิน	0.5-2.5	0.9916	$Y = 3.4242 + 0.8885$	0.29

### 3. การวิเคราะห์เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ คอกซีซัยคลิน ในน้ำนมตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry โดยมีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นไส้ดินสอด 5H

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในน้ำนมตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งและวิเคราะห์โดยวิธี Standard addition พบว่ามีร้อยละการกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 104, 103, 105 และ 102 สำหรับเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ คอกซีซัยคลิน ตามลำดับ ซึ่งถือว่าการสกัดอยู่ในช่วงที่เชื่อถือได้

#### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการนำวัสดุที่มีราคาถูก หาซื้อได้ง่ายและคงทน คือ ไส้ดินสอด 5H มาใช้เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานทดแทนการใช้ขั้วปรอท เพราะปรอทเป็นสารพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากได้มีรายงานการวิจัยที่มีการใช้ไส้ดินสอด 5H มาเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานแล้ว (Masawat *et al.*, 2002) ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวได้ทำการเปรียบเทียบไส้ดินสอดสองชนิด คือ ไส้ดินสอด 5H และ 2B โดยไส้ดินสอด 2B จะมีเนื้อที่อ่อนกว่าไส้ดินสอด 5H เพราะมีปริมาณของกราฟต์มากกว่า นอกจากกราฟต์แล้วในไส้ดินสอดยังมีส่วนประกอบของพวกโพลีเมอร์และดินเหนียวด้วย เมื่อนำไส้ดินสอดทั้งสองชนิดมาเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน พบว่าให้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารที่วิเคราะห์ได้แต่ไส้ดินสอด 5H จะให้พีคที่มีรูปร่างชัดเจนกว่า จึงเลือกไส้ดินสอดชนิดนี้มาใช้งานวิจัยต่อไป นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้งานของไส้ดินสอด 5H กับขั้วไฟฟ้าคาร์บอนมาตรฐานคือ แกลสซีคาร์บอน (GC electrode) ด้วย โดยพบว่า ถึงแม้ว่าไส้ดินสอดจะให้ความไวในการตรวจวัดน้อยกว่าแกลสซีคาร์บอน แต่ผลการทดลองกับตัวอย่างจริงก็ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และจากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า ไส้ดินสอด 5H สามารถใช้เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานในการวิเคราะห์เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ คอกซีซัยคลิน ร่วมกับด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry ได้เป็นอย่างดี โดยระบบที่สร้างขึ้นจะใช้ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเป็นลวดเงิน และขั้วไฟฟ้าช่วยเป็นลวดสแตนเลส โดยมี McIlvaine buffer ( pH = 4.4 ) + 0.1 โมลาร์ EDTA และ 10 มิลลิโมลาร์ KCl เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย ช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ใช้อยู่ในช่วง 1.0 ถึง -0.6 โวลต์ ซึ่ง จะเกิดแคโทดิกพีคขึ้นในช่วง -0.2 ถึง -0.4 โวลต์ โดยความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ทั้ง 4 ชนิด กับ กระแสไฟฟ้าเป็นสมการเชิงเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ ( $r^2$ ) อยู่ในช่วง 0.9875 – 0.9916 และมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ทั้ง 4 ชนิดอยู่ในช่วง 0.26-0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อทำการสกัดน้ำนมตัวอย่างด้วยเทคนิคสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE) พบว่ามีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง

102 – 105 โดยการที่จะทำให้ผลการทดลองถูกต้องและแม่นยำต้องมีการขัดผิวหน้าของไส้ดินสอให้ใหม่ อยู่เสมอเมื่อจะทำการวิเคราะห์ในแต่ละความเข้มข้น

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้าน เครื่องมือและอุปกรณ์รวมทั้งเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

### เอกสารอ้างอิง

บุญเจือ ธรนิษฐ์. (2522). ตำราเภสัชวิทยา. คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร.

Croubels, S., Baeyens, W. and Peteghem, C. (1995). Post-column zirconium chelation and fluorescence detection for the liquid Chromatographic determination of tetracyclines. *Analytica Chimica Acta.*, 303, 11-16.

Goicoechea, H.C. and Olivieri, A.C. (1999). Enhanced synchronous spectrofluorometric determination of tetracycline in blood serum by chemometric analysis. Comparison of partial least-squares and hybrid linear analysis calibrations. *Entrez PubMed.*, 71(19), 4361-4368.

Gong, Z. and Zhang, Z. (1997). Determination of tetracyclines with a modified  $\beta$  - cyclodextrin based fluorosensor. *Analytica Chimica Acta.*, 351, 205-210.

Halvatzis, S.A., Timotheou-Potamia, M.M. and Calokerinos, A.C. (1993). Continuous-flow chemiluminometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with N-bromosuccinimide. *Entrez PubMed.*, 118(6), 633-637.

Liu, X.J., Li, Y.Z. and Ci, Y.X. (1997). Time-resolved fluorescence studies of the interaction of the  $\text{Eu}^{3+}$  complexes of tetracycline analogues with DNA. *Analytica Chimica Acta.*, 315, 213-217.

Masawat, P., Liawrungrath, S., Vaneesorn, Y. and Liawruangrath, B. (2002). Design and fabrication of a low-cost flow-through cell for the determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations by flow injection cyclic voltammetry., 58, 1221-1234.

- Palaharn, S., Charoenraks, T., Wangfuengkanagul, N., Grudpan, K. and Chailapakul, O. (2003). Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection. *Analytica Chimica Acta.*, 499, 191-197.
- Poiger, H. and Schlatter, C. (1976). Fluorimetric determination of tetracyclines in biological materials. *Entrez PubMed.*, 101(1207), 808-814.
- Skoog, D.A, Holler, FJ. and Neiman, T.A. (1998). *Principle of Instrument Analysis*. (5<sup>th</sup> ed). Florida : Harcourt Brace & Company.
- Townshend, A., Ruengsitagoon, W., Thongpoon, C. and Liawruangrath, S. (2005). Flow injection chemiluminescence determination of tetracycline. *Analytica Chimica Acta.*, 541, 103-109.
- Wangfuengkanagul, N., Siangproh, W. and Chailapakul, O. (2004). A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode. *Talanta.*, 64, 1183-1188.
- Yang, S., Cha, J., and Carlson, K. (2005). Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1097. 40-53.