NU Science Journal 2007; 3(2): 215 - 230

การออกแบบและสร้างเครื่องตรวจวัดสารที่มีสี พร้อมชุดต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์แบบเบ็ดเสร็จ สำหรับการตรวจหายาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน

ปริญญา มาสวัสดิ์

Design and Fabrication of Low-Cost Home-made All-in-set Colorimetric Detector with PC-interface Embed for the Determination of Tetracycline Antibiotics

Prinya Masawat

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

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

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบและสร้างเครื่องตรวจวัดสารที่มีสี พร้อมชุดต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์แบบเบ็ดเสร็จ ในระบบโฟลอินเจคชันคัลเลอริเมทรี โดยการใช้หลอดไดโอดเปล่งแสงสีฟ้า (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสง และใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณ (LDR) ทำหน้าที่ในการตรวจจับสัญญาณการเปลี่ยนแปลง โดย LED และ LDR นั้นจะทำงานควบคู่กันในการตรวจวัดสัญญาณของตัวอย่าง และส่งสัญญาณที่ได้ผ่านอุปกรณ์อิเล็กทรอนิคส์ ซึ่งประกอบด้วยชุดขยายสัญญาณและตัวแปลงสัญญาณอนาลอคเป็นดิจิตอล (A/D) ที่รวมกันอยู่ในชุดทดลองขนาดเล็กและส่งข้อมูลที่วัดได้เข้าสู่เครื่องคอมพิวเตอร์

เครื่องมือที่ได้พัฒนาขึ้นใช้เป็นหลักพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวิธีเอฟไอเอ-สเปกโทรโฟโตเมตรีในการตรวจหายาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินโดยมีการใช้ยูรานิล อะซิเตท (Uranyl acetate) เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้ม-แดง โดยที่สารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 410, 415, 409 และ 410 nm สำหรับ เตราซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (Tetracycline hydrochloride (TCH)) คลอเตตราซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (Chlortetracycline hydrochloride (CTCH)) ออกซีเตตราซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (Oxytetracycline hydrochloride (OTCH)) และด๊อกซีซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (Doxycycline hydrochloride (DCH)) ตามลำดับ วิธีที่นำเสนอนี้ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดคือ 2.85, 2.89, 3.60 และ 3.88 มิลลิกรัม

ต่อลิตร สำหรับ เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน โดยมีค่าความเป็นเส้นตรงของยาแต่ละตัวในช่วงความเข้มข้น 10-150 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้นำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างยาแคปซูลด้วย

คำสำคัญ : ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน โฟลอินเจคชันอะนาไลซิส คัลเลอริเมทรี

Abstract

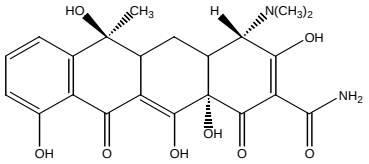
A low-cost home-made all-in-set colorimetric detector with PC-interface embed was designed and fabricated. Light emitting diodes (LEDs) are the most energy-efficient means of producing monochromatic light, and provide a concentrated small cool emitter ideal for miniature analytical devices in the FIA system. A small blue LED and a light dependent resistor (LDR) were used as a light source and a sensor. The detector's electronic components, including a signal amplifier and an A/D converter, were integrated on one small board connected to a personal computer for measuring the signals.

The proposed device was used as a basis to develop a FIA-spectrophotometric method for the determination of tetracycline antibiotics by forming orange-red complexes with uranyl acetate. These complexes show the maximum absorption at 410, 415, 409 and 410 nm for tetracycline hydrochloride (TCH), chlotetracycline hydrochloride (CTCH), oxytetracycline hydrochloride (OTCH) and doxycycline hydrochloride (DCH), respectively. The detection limits were found to be 2.85, 2.89, 3.60 and 3.88 mg/L for TCH, CTCH, OTCH and DCH, respectively. The linear range of calibration graph for each drug was obtained at 10-150 mg/L. This method was successfully applied to the determination of tetratycline in the bulk drugs and pharmaceutical formulations.

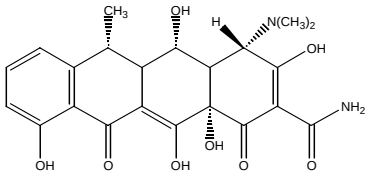
Keywords : Tetracycline antibiotics, FIA-Colorimetry, Home-made FIA system

บทนำ

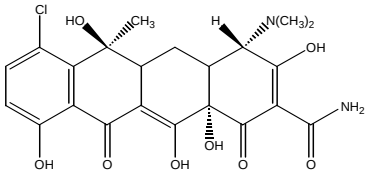
เตตราซัยคลินและอนุพันธ์เช่น คลอเตตราซัยคลินและดอกซีซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะดังกล่าวมีโครงสร้างตามรูป 1



Tetracycline (TC)



Doxycycline (DTC)



Chlortetracycline (CTC)

รูป 1 โครงสร้างทางเคมีของเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลินและดอกซีซัยคลิน (Yang *et al*., 2005)

ในปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ โดยจะใช้เพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียต่าง ๆ และใช้เพื่อชะลอการเน่าเปื่อยของเนื้อสัตว์ ซึ่งปริมาณยาที่ตกค้างอยู่ในกล้ามเนื้อหรือนมของสัตว์ อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ถ้าได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งอาจมีพิษและฤทธิ์แทรกซ้อนเกี่ยวกับระบบต่างๆ ของร่างกาย (บุญเจือ ธรณินทร์, 2522) เช่น ระบบทางเดินอาหาร มีผลต่อกระดูกและฟัน และเกิดผลกระทบต่อตับและไตได้ จึงมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หายาปฏิชีวนะดังกล่าวด้วยเทคนิคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น ยูวีวิซิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี (Gong and Zhang, 1997; Liu *et al*., 1997; Poiger and Schlatter, 1976) เคมิลูมิโนเมทรี (Goicoechea and Olivieri, 1999; Halvatzis *et al*., 1993) โครมาโทกราฟีของเหลว (Croubels *et al*., 1995) และ เทคนิคเคมีไฟฟ้า (Paraharn *et al*., 2003; Townshend *et al*., 2005; Wangfuengkanagul *et al*., 2004) จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นพบว่ามีข้อจำกัดคือ การใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง และยังไม่มีรายงานการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินโดยใช้ระบบเอฟไอเอ-คัลเลอริเมทรีโดยใช้เครื่องมือทำเองและใช้ยูรานิล อะซิเตทเป็นรีเอเจนต์เลย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาระบบเอฟไอเอคัลเลอริเมทรีสำหรับวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยได้ทำการสร้างและออกแบบเครื่องตรวจวัดสารที่มีสี ซึ่งได้มีการพัฒนามาจากเครื่องตรวจวัดสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ในระบบเอฟไอเอสเปกโทรโฟโตเมทรีใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนม (สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์และคณะ, 2548)

ในงานวิจัยดังกล่าว (สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์และคณะ, 2548)ได้มีการสร้างและออกแบบโฟลทรูเซล (Flow-through cell) ซึ่งประกอบไปด้วยการทำงานควบคู่กันของหลอดไดโอดเปล่งแสงสีฟ้า (LED) และตัวตรวจวัดสัญญาณ (LDR) 2 ชุด โดยชุดแรกทำการตรวจวัดสัญญาณของสารตัวอย่าง

(Sample) และชุดที่สอง ทำการตรวจวัดสัญญาณของสารอ้างอิง (Blank) ซึ่งในการวิเคราะห์จะใช้หลักการการดูดกลืนแสง โดยสารกลุ่มเตตราซัยคลินสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีส้มแดงกับยูรานิล อะซิเตทในตัวกลางของไดเมทิลฟอร์มาไมน์ (DMF) ได้ ในช่วงความยาวคลื่น 410, 416, 408 nm สำหรับเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน โดยความยาวคลื่นดังกล่าวจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นของแสงสีฟ้าประมาณ 435-480 nm ดังนั้นจึงใช้หลอดไดโอดเปล่งแสงสีฟ้าเป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคดังกล่าว คือ 100 mg/L ยูรานิล อะซิเตทและ 0.01 M DMF โดยมีอัตราการไหลของยูรานิล อะซิเตทและ DMF เป็น 2 mL/min มีปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเหมาะสมที่ 135 mL มีค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 1.0-3.0, 3.0-5.0, 3.0-10.0 mg/L สำหรับเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด คือ 0.389, 0.757 และ 1.447 mg/L สำหรับเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ตามลำดับ

เมื่อทำการวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนม โดยนำตัวอย่างนมมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Standard addition แล้วนำมาผ่านฟอริซิล ไซริงล์ คอลัมน์ (lorisil syringe column) พบว่าได้ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 1.0-3.0, 1.0-5.0, 1.0-5.0 และ 1.0-5.0 mg/L สำหรับ เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดคือ 0.19, 0.65, 0.95 และ 1.447 mg/L สำหรับเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ตามลำดับ

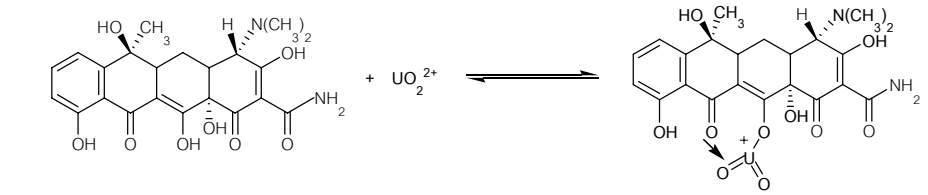
การออกแบบเครื่องตรวจวัดสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ในระบบเอฟไอเอ-สเปกโทรโฟโตเมทรีสำหรับวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนมดังกล่าวพบว่ามีข้อจำกัดอยู่หลายประการ ดังนี้

ประการแรก การออกแบบโฟลทรูเซลโดยใช้หลอดไดโอดเปล่งแสงเป็นแหล่งกำเนิดแสง 2 ชุด ซึ่งไม่สามารถควบคุมปริมาณแสงของหลอดไดโอดเปล่งแสงให้มีปริมาณที่เท่ากันได้ จึงทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงออกแบบโฟลทรูเซลให้มีแหล่งกำเนิดแสงเพียงชุดเดียว โดยได้ออกแบบโปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์โดยเฉพาะ ซึ่งผู้ทำการวิเคราะห์สามารถที่จะตั้งค่าแบลงค์ (Blank) ได้เอง ทำให้มีความสะดวกและได้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำขึ้น

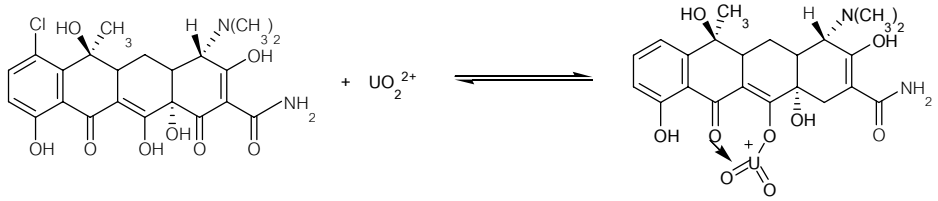
ประการที่สอง การประมวลผลในการวิเคราะห์ใช้ได้เฉพาะกับคอมพิวเตอร์รุ่นเก่าเท่านั้น ทำให้เสียเวลาและไม่สะดวกในการวิเคราะห์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเครื่องตรวจวัดสารที่มีสีให้เป็นระบบแบบเบ็ดเสร็จ (All-in-set) โดยได้ออกแบบชุดเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์และสร้างโปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์โดยเฉพาะ ซึ่งสามารถทำการวิเคราะห์กับคอมพิวเตอร์รุ่นใด ๆ ก็ได้

ประการสุดท้าย วิธีการวิเคราะห์ที่มีการใช้รีเอเจนต์ในการวิเคราะห์ 2 ชนิด ทำให้เสียเวลาและไม่สะดวกในการวิเคราะห์ โดยวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว จะใช้รีเอเจนต์ คือ ไดเมทิลฟอร์มาไมน์และยูรานิล อะซิเตท โดยไดเมทิลฟอร์มาไมน์ ทำหน้าที่เป็นกระแสตัวพาและตัวทำละลายของสาร

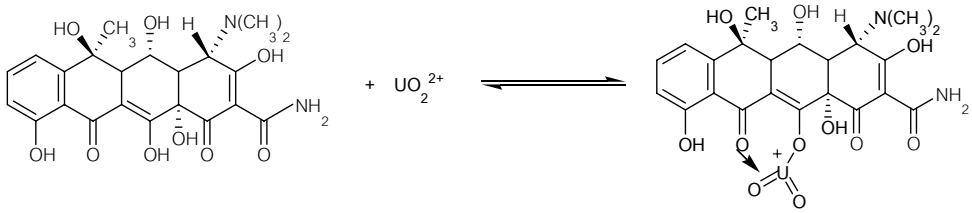
กลุ่มเตตราซัยคลิน ส่วนยูรานิล อะซิเตท เป็นสารเคมีในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ซึ่งผู้วิจัยได้พบรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยากันระหว่างสารกลุ่มเตตราซัยคลินกับยูรานิล อะซิเตท โดยสามารถทำปฏิกิริยากันได้โดยไม่ต้องอยู่ในตัวกลางของไดเมทิลฟอร์มาไมน์ ดังรูป 2 (Wei *et al*., 2005)



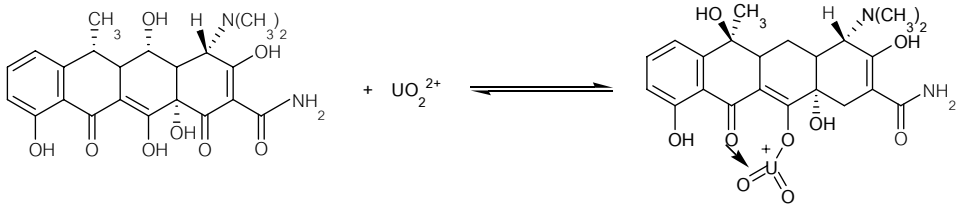
Tetracycline (TCH) uranyl acetate Tetracycline complex



Chlortetracycline (CTCH) uranyl acetate Chlortetracycline complex



Oxytetracycline (OTCH) uranyl acetate Oxytetracycline complex



Doxycycline (OTCH) uranyl acetate Doxycycline complex

รูป 2 ปฏิกิริยาเคมีแสดงการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารกลุ่มเตตราซัยคลินกับยูรานิล อะซิเตท (Wei *et al*., 2005)

และเมื่อทำการทดลองแล้วพบว่า การใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลายสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ให้ความไว (Sensitivity) ในการวิเคราะห์ที่ดีพอ ๆ กับการใช้ไดเมทิลฟอร์มาไมน์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์โดยใช้ยูรานิล อะซิเตท เป็นรีเอเจนต์เพียงชนิดเดียว ซึ่งทำให้การวิเคราะห์สะดวกรวดเร็วขึ้น ทั้งยังเป็นการประหยัดสารเคมีอีกด้วย

จากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมด ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาระบบเอฟไอเอ-คัลเลอรีเมทรี ที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย ซึ่งผู้วิจัยจะเสนอการพัฒนาระบบเอฟไอเอ-คัลเลอรีเมทรี ดังกล่าวโดยทำการออกแบบเครื่องตรวจวัดสารที่มีสีพร้อมชุดต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์แบบเบ็ดเสร็จ สำหรับการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

1. สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารละลายตัวพา (carrier solution) เป็น 200 mg/L ยูรานิล อะซิเตท เตรียมได้โดยการชั่งยูรานิล อะซิเตท จำนวน 0.0200 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 100 mL

การศึกษาหาการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเตตราซัยคลินด้วยวิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี ทำได้โดยการเตรียมสารละลายกลุ่มเตตราซัยคลินโดยชั่ง เตตราซัยคลิน 0.0015 g ปรับปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออนจะได้สารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ที่มีความเข้มข้น 150 mg/L นำมาผสมกับ 200 mg/L ยูรานิล อะซิเตท 10 mL จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งสารละลายมาตรฐานคลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด็อกซีซัยคลิน ก็ทดลองดังเช่นเดียวกัน

การศึกษาอัตราการไหล (Flow rate) ของสารละลายตัวพาที่มีผลต่อสัญญาณการวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 30, 60, 90, 120 และ 150 mg/L ในน้ำปราศจากไอออน โดยมี 200 mg/L ยูรานิล อะซิเตท เป็นสารละลายตัวพาโดยปรับเปลี่ยนอัตราการไหลเป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mL/min โดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฉีด 3 ครั้ง ทำการอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีค แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีคดังกล่าวและหาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์

การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายตัวพาที่มีผลต่อสัญญาณการวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลิน ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 30, 60, 90, 120 และ 150 mg/L ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของยูรานิล อะซิเตท เป็น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 mg/L ในน้ำปราศจากไอออน โดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฉีด 3 ครั้ง ทำการอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีค แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีคดังกล่าวและหาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์

การทำกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) สำหรับการหาค่าความเป็นเส้นตรงของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน ทำได้โดยการชั่งเตตราซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ 0.0250 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 50 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 500 mg/L จากนั้นปิเปตสารละลายเตตราซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์นี้ใส่ในขวดวัดปริมาตรจำนวน 0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 6.0 และ 8.0 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 10 mL จะได้สารละลายเตตราซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 300, 400 และ 500 mg/L ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าสู่ระบบเอฟไอเอ-คัลเลอริเมทรี ซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมดังการทดลองข้างต้น แต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฉีด 3 ครั้ง ซึ่งสารละลายมาตรฐานคลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ก็ทดลองดังเช่นเดียวกัน ทำการอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีค แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีคดังกล่าวและหาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์

การหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Detection limit) สามารถทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ที่ความเข้มข้น 15 mg/L โดยแต่ละชนิดฉีดซ้ำ 20 ครั้ง แล้วทำการหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และคำนวณหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลินในตัวอย่างยาแคปซูลนั้น จะนำตัวอย่างยาเตตราซัยคลิน ที่ระบุจำนวน mg/capsule เท่ากับ 250 mg/capsule มา 3 ตัวอย่าง ชั่งน้ำหนักยาภายในแคปซูล แล้วละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 100 mL จะได้สารละลายยาที่มีความเข้มข้น 2500 mg/L จากนั้นปิเปตสารละลายยาเตตราซัยคลินนี้ใส่ในขวดวัดปริมาตรจำนวน 0.4 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 10 mL จะได้สารละลายยาเตตราซัยคลิน เข้มข้น 100 mg/L ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าสู่ระบบเอฟไอเอ-คัลเลอรีเมทรี ซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมดังการทดลองข้างต้น โดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลายยา ฉีด 3 ครั้ง ซึ่งตัวอย่างยาคลอเตตราซัยคลิน และออกซีเตตราซัยคลิน ก็ทำการทดลองในทำนองเดียวกัน

ส่วนตัวอย่างยาด๊อกซีซัยคลิน จะระบุจำนวน mg/capsule เท่ากับ 100 mg/capsule นำตัวอย่างยามา 3 ตัวอย่าง ชั่งน้ำหนักยาภายในแคปซูล แล้วละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น

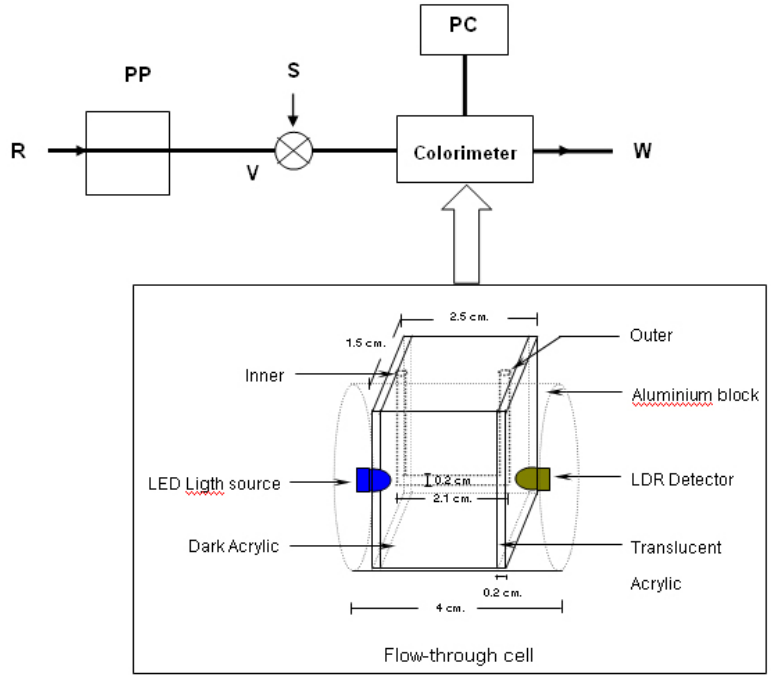
100 mL จะได้สารละลายยาที่มีความเข้มข้น 1000 mg/L จากนั้นปิเปตสารละลายยาด๊อกซีซัยคลินนี้ใส่ในขวดวัดปริมาตรจำนวน 1.0 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 10 mL จะได้สารละลายยาด๊อกซีซัยคลิน เข้มข้น 100 mg/L ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าสู่ระบบเอฟไอเอ-คัลเลอรีเมทรี ซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมดังการทดลองข้างต้น โดยทำการฉีดสารละลายในแต่ละความเข้มข้นซ้ำกัน 3 ครั้ง

ในการทดลองครั้งนี้จะเก็บสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด ในขวดสีชาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากสารกลุ่มเตตราซัยคลินจะสลายตัวอย่างรวดเร็วและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ ถ้าถูกแสงมากที่อุณหภูมิห้อง

2. ระบบเอฟไอเอ-คัลเลอรีเมทรี

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบและสร้างเครื่องตรวจวัดสารที่มีสี พร้อมชุดต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์แบบเบ็ดเสร็จ ในระบบเอฟไอเอ-คัลเลอรีเมทรี สำหรับการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน ซึ่งมีลักษณะอุปกรณ์ดังรูป 3

ในส่วนของเครื่องตรวจวัดสารที่มีสีออกแบบโดยใช้กล่องพลาสติก ขนาด 19 x 12.5 ซม. หนา 6 ซม. ภายในจะประกอบไปด้วยโฟลทรูเซล และวงจรอิเล็กทรอนิคส์ โดยในส่วนของโฟลทรูเซล จะออกแบบขึ้นโดยใช้แผ่นอะคิลิกใส จำนวน 2 แผ่น และแผ่นอะคิลิกทึบแสง จำนวน 7 แผ่น ซึ่งแผ่นอะคิลิกทั้งสองมีขนาด 1.5 x 3 ซม. หนา 0.2 ซม. การออกแบบจะใช้แสงเลเซอร์ยิงบริเวณกึ่งกลางของแผ่นอะคิลิกทึบแสงทั้ง 7 แผ่น โดยให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ซ.ม. แล้วนำแผ่นอะคิลิกทึบแสงดังกล่าวมาประกบติดกัน จะทำให้ได้ช่องทางเดินของสาร (Flow channel) ซึ่งมีขนาด 2.1 x 0.2 ซม. จากนั้นจึงนำแผ่นอะคิลิกใส จำนวน 2 แผ่น ประกบติดทั้งสองด้านของอะคิลิกทึบแสงดังกล่าว ซึ่งจะทำให้ได้โฟลทรูเซลที่มีขนาด 2.5 x 2.5 ซม. หนา 1.5 ซม. โฟลทรูเซลที่ออกแบบนี้จะวางอยู่ในฐานโลหะอะลูมิเนียม ขนาด 4 x 4 ซม. หนา 4 ซม. ซึ่งได้เจาะทั้งสองด้านสำหรับใส่หลอดไดโอดเปล่งแสงสีฟ้า (LED) และตัวตรวจวัดสัญญาณ (LDR) ดังรูป 3



รูป 3 FIA-colorimetry Manifold: PP: Peristaltic Pump, R: Reagent, S: Sample, V: injection Valve with appropriate sample volume loop, LED: Light Emitting Diode, LDR: Light Dependent Resistor, PC: Personal Computer, W: Waste

นอกจากการออกแบบโฟลทรูเซลดังที่กล่าวไปแล้ว ภายในเครื่องตรวจวัดสารที่มีสียังประกอบไปด้วยวงจรอิเล็กทรอนิคส์ ซึ่งประกอบด้วยตัวขยายสัญญาณและตัวแปลงสัญญาณอนาลอคเป็นดิจิตอล ในการประมวลผลการวิเคราะห์โดยการต่อเชื่อมกันระหว่างเครื่องตรวจวัดสารที่มีสีกับคอมพิวเตอร์นั้น ได้ทำการออกแบบชุดต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์และได้สร้างโปรแกรมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์โดยเฉพาะ ซึ่งผู้ทำการวิเคราะห์สามารถตั้งค่าแบลงค์ได้โดยตรงจากคอมพิวเตอร์ ก็จะได้เครื่องตรวจวัดสารที่มีสีพร้อมชุดต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง

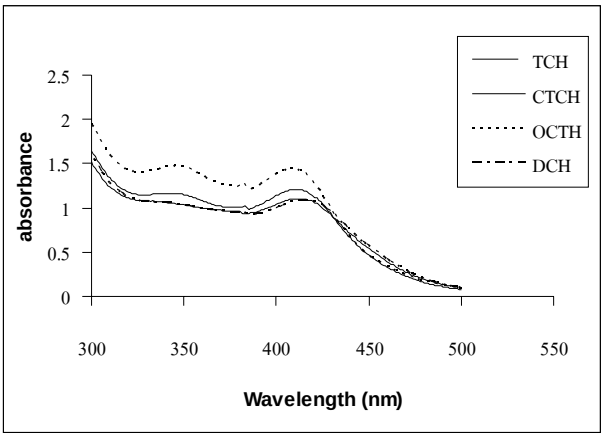
สำหรับการวิเคราะห์ในระบบเอฟไอเอ-คัลเลอริเมทรีนั้น เป็นเทคนิคการตรวจวัดสารสีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัดอยู่ในช่วงความยาวคลื่นสเปกตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 350-750 nm โดยอาศัยหลักการการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี โดยนำสารที่ต้องการวิเคราะห์มาเข้าทำปฏิกิริยารีเอเจนต์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเกิดขึ้น ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวสามารถดูดกลืนแสงจากแหล่งกำเนิดแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นที่จำเพาะกับสารประกอบเชิงซ้อนนั้น ซึ่งจะมีตัวตรวจวัดทำ

หน้าที่ในการตรวจจับสัญญาณที่เกิดขึ้น สัญญาณที่ได้จะถูกส่งไปยังชุดอุปกรณ์อิเลคทรอนิคส์ ซึ่งจะขยายสัญญาณและแปลงสัญญาณอนาลอคให้เป็นสัญญาณดิจิตอล แล้วส่งข้อมูลที่วัดได้เข้าสู่เครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อแสดงผลในรูปของพีคที่แปรผันตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ต่อไป

ผลการทดลองและการวิจารณ์

1. การหาสภาวะที่เหมาะสม

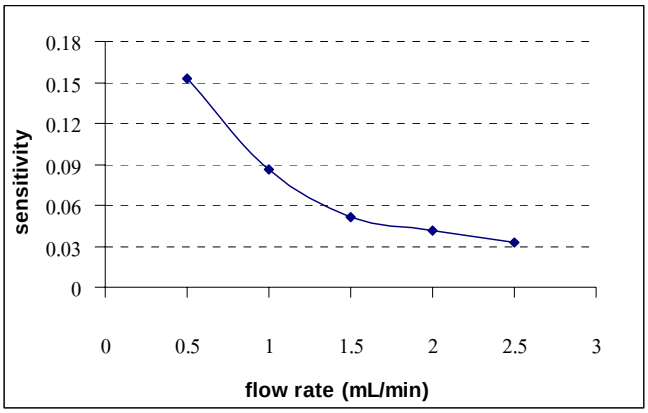
การวิเคราะห์หาปริมาณเตตราซัยคลิน จำเป็นต้องเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดเพื่อการดูดกลืนแสงได้สูงสุด และทำให้มีความไวของการวิเคราะห์สูงที่สุด โดยทำการศึกษาในช่วงความยาวคลื่น 300-500 nm จากการทดลองข้างต้น ได้ผลการทดลองดังรูป 4



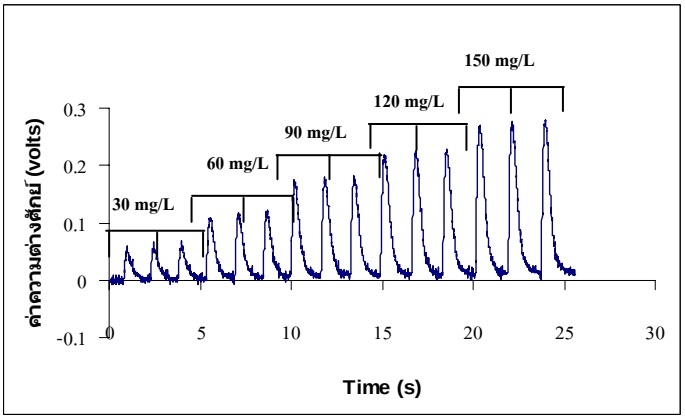
รูป 4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน

จากการศึกษาพบว่าสารกลุ่มเตตราซัยคลินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ณ ความยาวคลื่น 410, 415, 409 และ 410 nm สำหรับ เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารกลุ่มเตตราซัยคลินดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วงความยาวคลื่นของแสงสีฟ้า ซึ่งอยู่ระหว่าง 435-480 nm ดังนั้นในการศึกษาสภาวะอื่นๆ ต่อจากนี้จึงเลือกใช้ช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวในการทดลองต่อไป

ในการทดลองนี้ทำการศึกษาอัตราการไหลของยูรานิล อะซิเตท ซึ่งใช้เป็นสารละลายตัวพาในช่วง 0.5-2.5 mL/min ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูป 5



รูป 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของยูรานิล อะซิเตท และความไวของการวิเคราะห์



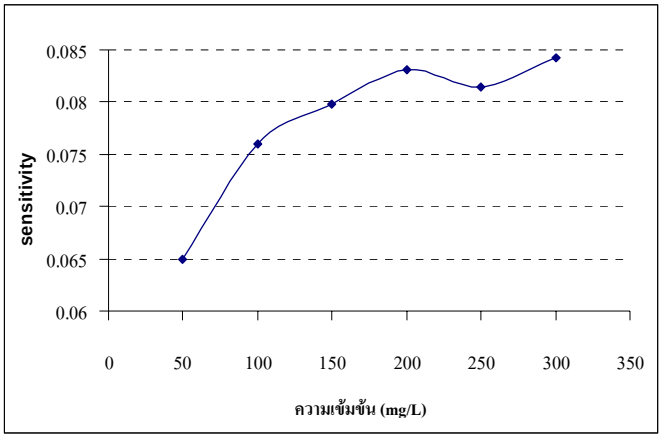
รูป 6 กราฟแสดง FIA-gram ของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน เข้มข้น 30-150 mg/Lที่อัตราการไหล 1.0 mL/min โดยมี 200 mg/L ยูรานิล อะซิเตทเป็นรีเอเจนต์

จากการศึกษาพบว่าอัตราการไหลของยูรานิล อะซิเตท ที่เหมาะสม คือ 1 mL/min แม้จะไม่ให้ความไวของการวิเคราะห์ดีที่สุด แต่ก็สูงพอที่จะตรวจวัดสารปริมาณน้อยได้ อีกทั้งยังมีรูปร่างพีคที่สมมาตรดังรูปที่ 6 จึงสะดวกในการวิเคราะห์ สำหรับการใช้อัตราการไหลต่ำกว่า 1 mL/min ให้ความไวของการวิเคราะห์ที่ดี แต่รูปร่างพีคกว้าง เพราะโซนของตัวอย่าง (sample zone) มีการกระจายตัวมากเกินไป จึงไม่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณ ดังนั้นจึงเลือกอัตราการไหลของยูรานิล อะซิเตท ที่ 1 mL/min เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายตัวพาเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่ง เนื่องจากยูรานิล อะซิเตท เป็นสารเคมีที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มเตตราซัยคลิน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน

เพื่อที่จะหาปริมาณเตตราซัยคลิน ในการทดลองนี้ทำการศึกษาความเข้มข้นของยูรานิล อะซิเตท ในช่วง 50-300 mg/L ได้ผลการทดลองดังรูป 7

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูรานิล อะซิเตท จะทำให้ความไวของการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น แต่การศึกษานี้เลือกใช้ความเข้มข้นของยูรานิล อะซิเตท ที่ 200 mg/L เนื่องจากให้ความไวของการวิเคราะห์ ที่สูงพอที่จะตรวจวัดสารปริมาณน้อย ๆ ได้



รูป 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยูรานิล อะซิเตท และความไวของการวิเคราะห์

2. การศึกษาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงและค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด กับพื้นที่ใต้พีคของสารทั้ง 4 ชนิดมีค่าความเป็นเส้นตรงแสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน

สารละลายมาตรฐาน	ค่าความเป็นเส้นตรง (mg/L)	สมการเชิงเส้น	ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r^2)
Tetracycline	10-150	Y=0.0909x-0.1759	0.9991
Chlortetracycline	10-150	Y=0.0801x-0.4010	0.9900
Chlortetracycline	10-150	Y=0.0585x+0.2169	0.9955
Doxycycline	10-150	Y =0.0739x-0.0862	0.9978

จากการศึกษาพบว่าสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดมีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากัน คือ 10 -150 mg/L

จากการทำการฉีดสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ชนิดละ 20 ครั้ง แล้วนำพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณตามสูตร (Skoog *et al*., 1998) พบว่าสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลินให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดต่ำพอๆ กับสารละลายมาตรฐานคลอเตตราซัยคลิน ส่วนสารละลายมาตรฐานด๊อกซีเตตราซัยคลินให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดสูงที่สุด ดังตาราง 2

ตาราง 2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของสารละลายมาตรฐานเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน

สารละลายมาตรฐาน	$\overline{X}$	S.D.	%RSD	Detection limit (mg/L)
Tetracycline	1.13	0.08	7.6	2.85
Chlortetracycline	1.06	0.07	7.2	2.89
Chlortetracycline	1.26	0.07	5.5	3.60
Doxycycline	1.16	0.09	8.2	3.88

3. การวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างยาเตรียม

เมื่อได้สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมแล้วก็นำไปใช้วิเคราะห์หาสารกลุ่มนี้ในตัวอย่างยาเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ได้ผลการทดลองดังตาราง 3

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเตตราซัยคลินในตัวอย่างยาแคปซูล ด้วยเทคนิคเอฟไอเอ-คัลเลอริเมทรี พบว่ามีร้อยละการกลับคืน (% recovery) อยู่ในช่วง 104-106, 103-108, 106-109 และ 116-121 สำหรับยาเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีค่ามากกว่าที่ทางบริษัทระบุไว้ เหตุผลที่น่าเป็นไปได้คือ กลุ่มยาเตตราซัยคลินสามารถสลายตัวเมื่ออุณหภูมิในการเก็บรักษาไม่เหมาะสม คุณสมบัติบางประการของยาเปลี่ยนแปลงไปเพราะความร้อน แสง และการเปลี่ยนค่า pH อาจทำให้เกิดแอนไฮโดรเตตราซัยคลิน (ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ, 2005) ซึ่งนอกจากจะไม่มีผลทางการรักษาแล้วยังเกิดอาการข้างเคียงได้อีก ดังนั้นทางบริษัทจึงอาจใส่ตัวยามากกว่าที่ระบุเพื่อป้องกันสิ่งที่เกิดขึ้นดังกล่าว และให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณยาไม่น้อยเกินกว่าที่กำหนด

ตาราง 3 ปริมาณที่ตรวจพบและ %Recovery ในตัวอย่างยาแคปซูลของสารกลุ่มเตตราซัยคลิน

ชื่อตัวอย่าง	เม็ดที่	$\overline{X}$ (n=3)	S.D.	%RSD	ปริมาณยา		
					mg/capsule ที่ระบุ	mg/capsule ที่พบ	%Recovery
Tetracycline	1	8.29	0.07	0.9	250	258	104
	2	8.42	0.03	0.3	250	262	105
	3	8.50	0.06	0.7	250	264	106
Chlortetracycline	1	9.03	0.18	2.0	250	271	108
	2	8.90	0.06	0.6	250	266	106
	3	8.60	0.11	1.2	250	259	103
Oxytetracycline	1	6.52	0.10	1.6	250	273	109
	2	6.33	0.12	1.9	250	265	106
	3	6.47	0.06	1.0	250	270	108
Doxycycline	1	6.75	0.05	0.7	100	116	116
	2	7.00	0.06	1.0	100	120	120
	3	7.11	0.19	2.6	100	121	121

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาระบบเอฟไอเอ-คัลเลอริเมทรี ที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย ในการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยทำการออกแบบเครื่องตรวจวัดสารที่มีสีพร้อมชุดต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์แบบเบ็ดเสร็จ ซึ่งจะใช้หลอดไดโอดเปล่งแสงสีฟ้าเป็นแหล่งกำเนิดแสงและ LDR เป็นตัวตรวจวัด เนื่องจากว่าสารกลุ่มเตตราซัยคลินทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์คือ ยูรานิล อะซิเตท แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง ซึ่งจากทฤษฎีสีที่ตรงกันข้ามกัน (Complementary color) แสงสีฟ้าสามารถดูดกลืนแสงสีส้มได้ ดังนั้นจึงเลือกหลอด LED สีฟ้าซึ่งมีความยาวคลื่นในช่วง 435-480 nm เป็นแหล่งกำเนิดแสง และจากยูวี-วิสิเบิล สเปกตรัม พบว่าสารกลุ่มเตตราซัยคลินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ณ ความยาวคลื่น 410, 415, 409 และ 410 nm สำหรับเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นของแสงสีฟ้า และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคเอฟไอเอ-คัลเลอริเมทรี ได้เลือกสภาวะที่เหมาะสมคือ 200 mg/L ยูรานิล อะซิเตท โดยมีอัตราการไหลของยูรานิล อะซิเตท เป็น 1 mL/min มีค่าความเป็นเส้นตรง

เท่ากันในช่วง 10-150 mg/L สำหรับเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดคือ 2.85, 2.89, 3.60 และ 3.88 mg/L สำหรับ เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ตามลำดับ

เมื่อทำการวิเคราะห์ในยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน พบว่าสามารถวิเคราะห์สารกลุ่มเตตราซัยคลินได้ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมีร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 104-106, 103-108, 106-109 และ 116-121 สำหรับยาเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และด๊อกซีซัยคลิน ตามลำดับ งานวิจัยนี้สามารถประยุกต์ใช้ในตัวอย่างอื่น ๆ ได้ เช่น นม ซึ่งในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างนมก่อนการวิเคราะห์ จะต้องทำการสกัดนมก่อนโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction) เพื่อเพิ่มความเข้มข้นให้กับสารตัวอย่าง ทั้งยังเป็นการกำจัดสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการออกจากตัวอย่างได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร. สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์ และ นายศุภโชค อุปาลี ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านโปรแกรมคอมพิวเตอร์และอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์

ขอขอบคุณ นายกฤษลักษณ์ วงษ์ศรี นิสิตปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์รวมทั้งเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ. (2005). *การค้นพบยาจากการสลายตัวของสาร* สืบค้นเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม 2548 จาก www.Pharm.su.ac.th**.**

บุญเจือ ธรณินทร์. (2522). *ตำราเภสัชวิทยา.* คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร.

สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์, ศุภโชค อุปาลี, ปริญญา มาสวัสดิ์ และ อมรรัตน์ เพ็งเทศ. (2548). *การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน โดยใช้ชุดตรวจวัดการดูดกลืนแสงในระบบโฟลอินเจคชันซึ่งใช้ไดโอดเปล่งแสงเป็นตัวตรวจวัด*. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.

Croubels, S., Baeyens, W. and Peteghem, C. (1995). Post-column zirconium chelation and fluorescence detection for the liquid Chromatographie 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 β - 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 Eu^{3+} complexes of tetracycline analogues with DNA. *Analytica Chimica Acta*., *315*, 213-217.

Palaharn, S., Charoenraks, T., Wangfuengkanagul, N., Grudpan, K. and Chailapakul, O. (2003). Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed mperometric detection. *Analytica Chimica Acta., 499*, 191-197.

Poiger, H. and Schlatter, C. (1976). Fluorimetric determination of tetracyclines in biologica materials. *Entrez PubMed*., *101*(1207), 808-814.

Skoog, D.A, Holler, FJ. and Neiman, T.A. (1998). *Principle of Instrument Analysis.* (5^{th}ed). Forida : Harcourt Brace and 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 phamacenutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped dimond thin film electrode**.** *Talanta*., *64*, 1183-1188.

Wei, X.Q., Liu, Z.F. and Liu, S. P. (2005). Resonance Rayleigh scattering method for the determination of tetracycline antibiotics with uranyl acetate and water blue*, Anal. Bioanal. Chem., 346*, 330-332.

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.