รายงานปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

การศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ตัวยาแลคตูโลส

EFFICACY STUDY OF THE LACTULOSE ANALYTICAL COLUMN

นางสาวเย็นฤดี นพธรรม รหัสนักศึกษา 6140201114

โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

การศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ตัวยาแลคตูโลส

EFFICACY STUDY OF THE LACTULOSE ANALYTICAL COLUMN

นางสาวเย็นฤดี นพธรรม รหัสนักศึกษา 6140201114

โครงงานสหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

2563

ชื่องานวิจัย การศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ตัวยาแลคตูโลส
หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)
ผู้วิจัย นางสาวเย็นฤดี นพธรรม
อาจารย์นิเทศ ดร.วนิดา ชูหมื่นไวย
สถาบัน มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
ปีการศึกษา 2564

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ตัวยาแลคตูโลส โดยจะมีการศึกษาหาสาเหตุที่ทำให้คอลัมน์นั้นเสื่อมประสิทธิภาพ โดยการเก็บสถิติการใช้งานคอลัมน์เมื่อนำผลการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบพบว่า คอลัมน์เริ่มเสื่อมประสิทธิภาพซึ่งสาเหตุเกิดจากเมื่อตรวจสอบสภาวะความเหมาะสมของเครื่องมือ แล้วค่า Resolution ไม่ผ่านตามมาตรฐานเภสัชตำรับของสหรัฐอเมริกา (United States Pharmacopeia 41 ; USP 41) จึงทำการหาวิธีแก้ปัญหา ด้วยการฟื้นฟูประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยการล้างคอลัมน์ด้วยอะซิโตไนไตรล์ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม 3 แบบด้วยกัน คือ แบบที่ 1 ล้างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบบที่ 2 ล้างที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และสุดท้ายแบบที่ 3 จะเป็นการกลับคอลัมน์แล้วล้างเหมือนแบบที่ 2 จากนั้นก็ทำการตรวจสอบการล้างคอลัมน์ในแต่ละครั้ง เมื่อนำมาตรวจสอบแล้วจะเห็นได้ว่า การล้างครั้งที่ 1 และ 2 มีผลไปในทางที่ดีขึ้น แต่เมื่อล้างครั้งที่ 3 ผลที่ได้ไม่ดีขึ้น

SENIOR PROJECT TITLE EFFICACY STUDY OF THE LACTULOSE ANALYTICAL COLUMN

DEGREE BACHELOR OF SCIENCE (CHEMISTRY)

BY MISS YENRUDEE NOPPATHAM

ADVISOR Dr. VANIDA CHOOMUENWAI

INSTITUTION NAKHON RATCHASIMA RAJABHAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2021

ABSTRACT

This research involved studying the efficacy of the lactulose column analyzed. There will be studies to find out the reasons that cause the column to deteriorate. By collecting statistics on column usage when comparing the results of the analysis, it was found that The column began to deteriorate due to the fact that when checking the suitability of the instrument and the Resolution value did not meet the United States Pharmacopeia 41 standard, a solution was sought. with the restoration of column efficiency The column was washed with acetonitrile, methanol, and chloroform in three ways: Type 1, washed at 25 ℃, Type 2 washed at 40 ℃, and finally Type 3, the column was inverted. Rinse like 2, and then perform a column cleanup check each time. When examined, it can be seen that The 1st and 2nd washes have a positive effect. But when washing the 3rd time, the result is not better.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิชาสหกิจศึกษาฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก คุณอภิภูชิต จำปามูล หัวหน้าหน่วยงานทดสอบวัตถุดิบ ซึ่งเป็นพี่เลี้ยงที่ปรึกษาโครงการสหกิจศึกษา และพี่ ๆ พนักงาน Lac QC บริษัทโอสถ อินเตอร์ แลบบอราทอรีส์ จำกัด ทุกท่าน ผู้ซึ่งได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนตรวจทานปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของรายงานวิจัยฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจและความทุ่มเทของทุกท่าน ขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วนิดา ชูหมื่นไวย ที่รับเป็นอาจารย์นิเทศศึกษาการฝึกประสบการณ์พร้อมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำแก่ข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติที่ใกล้ชิดทุกท่าน ที่คอยสนับสนุนให้โอกาสในการศึกษา ให้ความรัก ความห่วงใย และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา จนทำให้สามารถปฏิบัติงานสหกิจศึกษาเสร็จสมบูรณ์ลุล่วงด้วยดี

เย็นฤดี นพธรรม

2564

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
2.1.1 คอลัมน์ (Column)	3
2.1.2 การรักษาคอลัมน์	4
2.1.2.1 การล้างคอลัมน์	4
2.1.2.2 การเก็บคอลัมน์	5
2.1.3 การวิเคราะห์แลคตูโลส	5
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการ

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 9

3.2 สารเคมี 9

3.3 วิธีการทดลอง 10

3.3.1 หาสาเหตุของปัญหา 10

3.3.2 ทำความสะอาดและฟื้นฟูคอลัมน์ 10

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ข้อมูลการใช้งานของคอลัมน์ 13

4.2 ผลลัพธ์การฟื้นฟูประสิทธิภาพคอลัมน์ 15

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง 19

5.2 ข้อเสนอแนะ 19

5.3 ประโยชน์ที่ได้รับ 20

บรรณานุกรม 21

ประวัติผู้วิจัย 23

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของคอลัมน์ 3

2.2 ข้อมูลเบื้องต้นของแลคตูโลส แลคโตส และอิพิแลคโตส 6

3.1 เวลาและอัตราส่วนในการล้างคอลัมน์ 10

3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ HPLC 11

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
4.1 เปรียบเทียบพีคที่ได้จากการใช้งานคอลัมน์ในแต่ละครั้ง	13
4.2 พีค System Suitability ของแลคตูโลส	15
4.3 ผลการวิเคราะห์ก่อนการล้างคอลัมน์	15
4.4 การทดลองฉีดแบบที่ 1	16
4.5 การทดลองฉีดแบบที่ 2	17
4.6 การทดลองฉีดแบบที่ 3	18

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการวิจัย

การตรวจสอบคุณภาพหาปริมาณตัวยาสำคัญ Lactulose เราทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีตามมาตรฐาน United States Pharmacopeia 41 (USP41) โดยจะใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ในการวิเคราะห์ตัวยา และเทคนิค HPLC จำเป็นต้องมีคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ การวิเคราะห์ Lactulose ใช้คอลัมน์ L8 ในการวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของ USP41 โดยจากการสำรวจพบว่าคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Lactulose เสื่อมประสิทธิภาพเร็วโดยไม่ทราบสาเหตุ ผู้วิจัยจึงเห็นว่าเป็นปัญหาในการทำงาน และสูญเสียงบประมาณไปกับการจัดซื้อคอลัมน์ใหม่เป็นจำนวนมาก

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาหาสาเหตุของปัญหาที่ทำให้เกิดการเสื่อมประสิทธิภาพของคอลัมน์ Agilent Polaris NH_2 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Lactulose ไม่ว่าจะเป็นปัญหาด้านการใช้งาน การใช้สารเคมีที่เกี่ยวข้อง การเก็บรักษาคอลัมน์หรือสาเหตุอื่น ๆ ที่อาจเกี่ยวข้อง และทำการหาวิธีแก้ปัญหาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยจะนำสาเหตุที่รวบรวมมาได้ศึกษาหาวิธีแก้ปัญหาให้คอลัมน์มีอายุการใช้งานที่มากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อหาสาเหตุที่ทำให้คอลัมน์เสื่อมประสิทธิภาพ

1.2.2 เพื่อหาวิธีการแก้ปัญหาของคอลัมน์ Agilent Polaris NH_2 ที่เสื่อประสิทธิภาพ

1.2.3 ตรวจสอบผลลัพธ์ของวิธีการแก้ปัญหาที่ศึกษาได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาสาเหตุของการเสื่อมประสิทธิภาพของคอลัมน์ L 8 ที่ใช้วิเคราะห์ Lactulose ด้วยเทคนิค HPLC

บทที่ 2

เอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

การตรวจสอบสภาวะของเครื่องมือประเภทระบบโครมาโตกราฟิก คือ การทำระบบความเหมาะสม (System Suitability) เพื่อตรวจสอบว่าสภาวะที่ใช้นั้นเหมาะสมกับการวิเคราะห์สารนั้นหรือไม่ (จิราพรรณ ทองหยอด, 2549) โดยศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้อง คือ ข้อมูลของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ การเก็บรักษาคอลัมน์ ข้อมูลทั่วไปของสารเคมีที่เกี่ยวข้อง รวมไปถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษามนครั้งนี้

2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 คอลัมน์ (Column)

คอลัมน์อะมิโน สำหรับ HPLC ส่วนใหญ่เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้โครมาโตกราฟีแบบ Normal phase นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นเฟสคงที่สำหรับโครมาโตกราฟีแบบมีปฏิสัมพันธ์ที่ชอบน้ำสำหรับการวิเคราะห์เฟสบวกของสารประกอบเชิงขั้วการแลกเปลี่ยนประจุลบแบบอ่อน และการวิเคราะห์เฟสของเหลวแบบย้อนกลับในน้ำ คอลัมน์นี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์น้ำตาลน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส ไซโลส และแลคโตส (Hawach, n.d.)

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของคอลัมน์

ยี่ห้อ	• Polaris
แพลตฟอร์ม LC	• HPLC
ประเภทอนุภาค	• Fully Porous
บรรจุ	• Aminopropyl
ขนาดรูพรุน	• 180 ˚A
อุณหภูมิ	• Max 60 ˚C
ระดับความดัน	• 400 bar
พีเอช	• pH 2 – pH 9
ขนาด	• 4.6 mm x 15 cm

	• 3 μm
โหมดการแยก	• HILIC • Normal Phase • Reversed Phase • SFC
หมายเลขกำหนด USP	• L8

คอลัมน์อะมิโนมักใช้สำหรับแยกโมโนและไดแซ็กคาไรด์ ตามการใช้งาน Normal phase คอลัมน์อะมิโนถูกใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมยา เป็นต้น คอลัมน์อะมิโนที่มีซิลิกาเป็นพื้นฐานจะแยกโมโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ และไตรแซ็กคาไรด์บางตัวแยกกัน โดยทั่วไปการชะจะเป็นไปตามลำดับการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุล (Merck KGaA, 2022)

2.1.2 การรักษาคอลัมน์

การรักษาคอลัมน์ไม่ควรใช้ตัวทำละลายที่กัดกร่อนควรเลือกพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมกับคอลัมน์ที่ใช้ ไม่ควรทำคอลัมน์ตกหรือกระเทือนอย่างแรง ไม่ควรเก็บคอลัมน์ด้วยน้ำ เพราะจะทำให้เกิดเชื้อรา เป็นต้น (โอภาส บุญเกิด, n.d.)

2.1.2.1 การล้างคอลัมน์

การล้างคอลัมน์จะทำทั้งคอลัมน์ และเครื่อง HPLC ไปพร้อม ๆ กันหลังการใช้งานแต่ละครั้ง โดยทั่วไปมีหลักการ ดังนี้

1) กรณีเป็น Reverse Phase ไม่มี Buffer เช่น เมทานอลกับน้ำ ให้ใช้เมทานอล 80 – 100 % ล้างประมาณ 10 – 20 มิลลิลิตร แล้วจึงถอดคอลัมน์เก็บ

2) กรณีเป็น Reverse Phase มี Buffer อยู่ด้วย เช่น เมทานอล, น้ำ, KH_2PO_4 ให้ใช้อัตราส่วนเดิมของเมทานอลกับน้ำ ล้างประมาณ 20 – 30 มิลลิลิตร แล้วปิดเครื่องถ้าต้องการใช้ต่อในวันรุ่งขึ้น แต่ถ้าต้องการเก็บคอลัมน์เลย ให้ล้างต่อด้วยน้ำ 100 % 1 ครั้ง และเมทานอล 100 % 1 ครั้ง ในปริมาณ 20 – 30 มิลลิลิตร จึงเก็บคอลัมน์ (Geocities, n.d.)

3) กรณีเป็น Normal Phase ให้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล 50 % : คลอโรฟอร์ม 50% หรือ 100% เอทิลอะซิเตต เป็นต้น ล้างประมาณ 50 มิลลิลิตร โดยการทำความสะอาดคอลัมน์ Normal Phase อาจขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่วิเคราะห์ (Agilent, 2018)

2.1.2.2 การเก็บคอลัมน์

การเก็บคอลัมน์ไม่ควรเก็บไว้ในน้ำเพราะจะทำให้เกิดเชื้อราได้ (โอภาส บุญเกิด, n.d.) คอลัมน์ Normal Phase สามารถเก็บไว้ในเฟสเคลื่อนที่ของตัวเองได้สำหรับระยะเวลานาน (Agilent, 2018)

2.1.3 การวิเคราะห์แลคตูโลส

โดยการวิเคราะห์แลคตูโลสตามมาตรฐาน USP41 โดยใช้เทคนิค HPLC ต้องตั้งค่าระบบตามเอกสารกำหนด คือ วิเคราะห์ในโหมด LC ตรวจจับผลแบบ Refractive index ใช้คอลัมน์ขนาด 4.6 mm x 15 cm, 3 µm ประเภท L8 ทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (USP41, 2018)

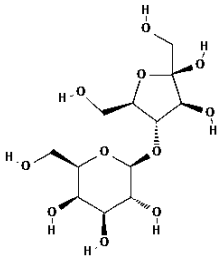
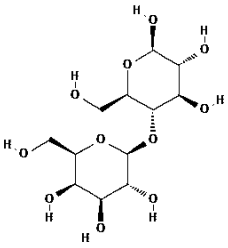
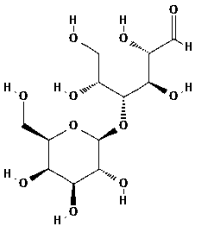
Mode: LC
Detector: Refractive index
Column: 4.6 mm x 15 cm, 3 μm Packing L8
Temperatures
Column: 40 ˚C Detector: 40 ˚C
Flow rate: 1.3 mL/min
Injection volume: 20 μL

แลคตูโลสเป็นน้ำตาลสังเคราะห์ช่วยรักษาอาการท้องผูก เมื่อรับประทานเข้าไปตัวยาจะแตกออกในลำไส้ใหญ่แล้วออกฤทธิ์ด้วยการดึงน้ำจากร่างกายมายังลำไส้ใหญ่ ทำให้อุจจาระนิ่มลงและ

ขับออกมาได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้รักษาผู้ป่วยโรคตับที่มีระดับแอมโมเนียในเลือดสูงโดยจะช่วยดูดแอมโมเนียมาที่ลำไส้แล้วขับออกไปทางทวารหนัก (Pobpad, 2016)

โดยการทำระบบความเหมาะสม (System Suitability) ของการวิเคราะห์แลคตูโลสนี้จะเป็นการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ประกอบไปด้วย แลคตูโลส (Lactulose) แลคโตสที่ปราศจากน้ำ (Anhydrous Lactose) และ อิพิแลคโตส (Epilactose) (USP41, 2018) โดยสารทั้งสามชนิดนี้เป็นไอโซเมอร์กัน คือ มีสูตรโมเลกุลที่เหมือนกัน แต่สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีต่างกันเนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกัน ข้อมูลดังตาราง

ตารางที่ 2.2 ข้อมูลเบื้องต้นของแลคตูโลส แลคโตส และอิพิแลคโตส

ชื่อ	Lactulose	Lactose	Epilactose
โครงสร้างโมเลกุล			
สูตรโมเลกุล	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{12}H_{22}O_{11}$
มวลโมเลกุล	342.30 กรัมต่อโมล	342.30 กรัมต่อโมล	342.30 กรัมต่อโมล
จุดหลอมเหลว	169 องศาเซลเซียส	222.8 องศาเซลเซียส	204 องศาเซลเซียส

จากข้อมูลในตารางจะเห็นได้ว่าสารทั้งสามชนิดเป็นไอโซเมอร์กัน แต่จะมีโครงสร้างที่ต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ตามระบบโครมาโตกราฟิก โดยจะสอดคล้องกับการตรวจสอบสภาวะของเครื่องมือคือการตรวจสอบความเหมาะสมตามที่มาตรฐาน USP41 กำหนดไว้ว่าค่าการแยกของสาร (Resolution) ระหว่าง แลคตูโลสกับแลคโตส ไม่น้อยกว่า 1.5 และ ค่าการแยกของสาร (Resolution) ระหว่าง แลคตูโลสกับอิพิแลคโตส ไม่น้อยกว่า 0.9 (USP41, 2018) โดยค่าการแยกสารสองชนิดสามารถคำนวณได้จากสมการ 2.1

$$R = \frac{2\times(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \qquad (2.1)$$

โดย

R คือ ค่าการแยกสารประกอบสองชนิดในสารผสม

t_1 และ t_2 คือ retention time ของสารสองชนิดที่แยกออกจากกันในโครมาโตแกรม

W_1 และ W_2 คือ ความกว้างที่ฐานพีคของสารสองชนิด

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

(Jiri Pazourek, 2019) การตรวจสอบการผลิตแลคตูโลสให้มีผลผลิตสูงด้วยเทคนิค HPLC พัฒนาการตรวจสอบโดยไอโซเมอไรเซชันจากแลคโตส ซึ่งจะทำการแยกแลคโตสและแลคตูโลสในโหมดโครมาโตกราฟีของเหลวปฏิสัมพันธ์ที่ชอบน้ำ (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography; HILIC) ค่าการแยกสารที่ได้ในการตรวจสอบเท่ากับ 1.5 ในเวลา 5 นาที การประยุกต์ใช้วิธีการนี้ตรวจสอบไอโซเมอไรเซชันของแลคตูโลสแสดงให้เห็นตัวเร่งปฏิกิริยาโซเดียมไฮดรอกไซด์ในโซเดียมเตตระบอเรตที่อุณภูมิ 70 องศาเซลเซียส และที่พีเอชเท่ากับ 17 ผลผลิตการแปลงที่ได้รับสำหรับแลคตูโลสคือ 86 % และความบริสุทธิ์ที่สอดคล้องกัน 76% เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานเฟสคงที่ของโพลีไฮดรอกซีสำหรับการแยกแลคโตสและแลคตูโลส

(Natalia Gonzaga et al, 2019)การสกัดแลคโตสและแลคตูโลสโดยใช้น้ำเพื่อเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และกำหนดในนมโดยเทคนิค HPLC ที่ใช้ตัวตรวจจับแบบกระเจิงแสง แลคโตสเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักที่พบในนม แลคตูโลสที่ความเข้มข้นสูงก็สามารถสะสมในทางเดินอาหารได้ จึงจำเป็นต้องกำหนดปริมาณและปริมาณสารประกอบเหล่านี้ในนมยูเอชที วิธีการที่นำเสนอมีความโดดเด่นโดยการใช้น้ำเพียงอย่างเดียวในขั้นตอนการแยกสาร โดยมีขั้นตอนการทำความสะอาดตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพซึ่งดำเนินการผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยความเข้มข้นสูง ในทำนองเดียวกัน น้ำยังถูกใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่สำหรับโครมาโตกราฟีของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูงด้วยการวิเคราะห์การตรวจจับแบบกระเจิงแสง

(Bernard A. Olsen, 2001) โครมาโตกราฟีแบบปฏิสัมพันธ์ที่ชอบน้ำ (HILIC) โดยใช้คอลัมน์อะมิโนและซิลิกาสำหรับการหาปริมาณยาและสิ่งเจือปนแบบมีขั้ว HILIC เป็นทางเลือกที่มีประโยชน์สำหรับโครมาโตกราฟีแบบเฟสย้อนกลับสำหรับการใช้งานที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบที่มีขั้ว ในโหมด HILIC เฟสเคลื่อนที่แบบน้ำและแบบอินทรีย์จะใช้กับเฟสคงที่แบบมีขั้วเพื่อให้เกิดพฤติกรรมการคงอยู่ของเฟสปกติ คอลัมน์ซิลิกาและอะมิโนที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำต่ออะซิโตไนไตรล์มีศักยภาพสำหรับการใช้งานในโหมด HILIC การตรวจสอบการกักเก็บและการแยกสารไพริมิดีน พิวรีน และเอไมด์บนคอลัมน์ซิลิกาและอะมิโนจากผู้ผลิตเปิดเผยว่าเฟสเคลื่อนที่ควรมีบัฟเฟอร์หรือกรดสำหรับการควบคุม pH เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่คล้ายคลึงกันและสามารถทำซ้ำได้ระหว่างคอลัมน์จากแหล่งต่าง ๆ

(Mustafa Karkacier et al, 2003) การเปรียบเทียบวิธีการสกัดและตรวจจับแบบต่าง ๆ สำหรับน้ำตาลโดยใช้เทคนิค HPLC และเฟสคงที่แบบพันธะอะมิโน ในการศึกษานี้มีการเปรียบเทียบวิธีการต่าง ๆ เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดที่สกัดจากตัวอย่างแอปเปิลโดยใช้เมทานอลและน้ำ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสจะถูกแยกออกที่เวลา 20 นาที โดยใช้คอลัมน์อะมิโนและเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนไตรล์ในน้ำที่อัตราส่วน 75 : 25 ตามด้วยการตรวจจับรังสียูวี (190 นาโนเมตร) และการตรวจจับแบบกระเจิงแสง ความแปรผันของคุณสมบัติน้ำตาลถูกสังเกตพบโดยใช้วิธีการสกัดหรือการตรวจจับที่ต่างกัน ที่อัตราการไหล 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography) รุ่น 1200 Series บริษัท Agilent Technologies

3.1.2 คอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงพันธะอะมิโน (Column HPLC L8) รุ่น Agilent Polaris NH_2 บริษัท Agilent Technologies

3.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า (Analytical balance) รุ่น Sartorius บริษัท Chemoscience (Thailand)

3.1.4 เครื่องทำความสะอาดด้วยคลื่นความถี่สูง (Degas Ulrasonic Cleaner) รุ่น S300H Elmasonic บริษัท Elma

3.1.5 ชุดกรวยกรองบุชเนอร์และปั๊มสุญญากาศ (Buchner Funnel and Vacuum Pump)

3.2 สารเคมี

3.2.1 แลคตูโลส (Lactulose ; $C_{12}H_{22}O_{11}$) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของบริษัท โอสถ อินเตอร์ แลบบอราทอรีส์ จำกัด

3.2.2 อิพิแลคโตส (Epilactose ; $C_{12}H_{22}O_{11}$) ยี่ห้อ USP

3.2.3 แลคโตสปราศจากน้ำ (Anhydrous Lactose ; $C_{12}H_{22}O_{11}$) ยี่ห้อ USP

3.2.4 อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile ; CH_3CN) (HPLC Grade) ยี่ห้อ Fisher

3.2.5 เมทานอล (Methanol ; CH_3OH) (HPLC Grade) ยี่ห้อ Fisher

3.2.6 คลอโรฟอร์ม (Chloroform ; $CHCl_3$) (AR Grade) ยี่ห้อ RCI Labscan

3.2.7 โมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (Monobasic Sodium Phosphate ; NaH_2PO_4) ยี่ห้อ Loba

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 หาสาเหตุของปัญหา

เก็บรวบรวมสถิติการใช้งานของคอลัมน์ Agilent Polaris NH_2 ที่ศึกษา จากนั้นนำผลการวิเคราะห์โดยคอลัมน์นี้ในแต่ละครั้ง เปรียบเทียบดูการเปลี่ยนแปลงของพีคที่ได้จาการวิเคราะห์

3.3.2 ทำความสะอาดและฟื้นฟูคอลัมน์ 3 แบบได้แก่

3.3.2.1 ล้างคอลัมน์แบบที่ 1 ด้วยอะซิโตไนไตรล์ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตามอัตราส่วนและเวลา ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เวลาและอัตราส่วนในการล้างคอลัมน์

เวลา (นาที)	Acetonitrile	Methanol	Chloroform
0 – 20	100	0	-
21 – 40	80	20	-
41 – 60	60	40	-
61 – 80	40	60	-
81 – 100	20	80	-
101 – 120	0	100	-
121 – 140	-	80	20
141 – 160	-	60	40
161 – 360	-	50	50
361 – 380	-	60	40
381 – 400	-	80	20
401 – 420	-	100	0
421 – 440	20	80	-
441 – 460	40	60	-
461 – 480	60	40	-
481 – 500	80	20	-
501 – 600	100	0	-

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ HPLC

Column	Agilent Polaris NH_2 4.6 x 150mm 3μm
Buffer	1.15 g Monobasic sodium phosphate in water 1000 mL
Mobile Phase	Monobasic sodium phosphate in water : Acetonitrile
Diluent	Acetonitrile : Water ; 1:1
UV-Detector	DAD 192 nm
Oven Temperature	40 °C
Volume Inject	10 μL
Run Time	50 mins

3.3.2.1.1 เตรียมสารละลายระบบความเหมาะสมมาตรฐาน โดยชั่งแลคตูโลสมาตรฐาน 400 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมิตรขนาด10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอิพิแลคโตส 4 มิลลิลิตร แลคโตสปราศจากน้ำ 2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Diluent เสร็จแล้วนำตัวอย่างใส่ขวดเล็กบรรจุของเหลว

3.3.2.1.2 เตรียมการฉีดตามสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ HPLC ตามตารางที่ 3.2 โดยทำการฉีดเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการล้างทั้งหมด 3 แบบ คือ

1) ทำการฉีดด้วยอัตราส่วนโมบายเฟส 22 : 78 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

2) ทำการฉีดด้วยอัตราส่วนโมบายเฟส 22 : 78 ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

3) ทำการฉีดด้วยอัตราส่วนโมบายเฟส 15 : 85 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

3.3.2.2 ล้างคอลัมน์แบบที่ 2 ด้วยอะซิโตไนไตรล์ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามอัตราส่วนและเวลา ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการล้างตามข้อที่ 3.3.2.1.2

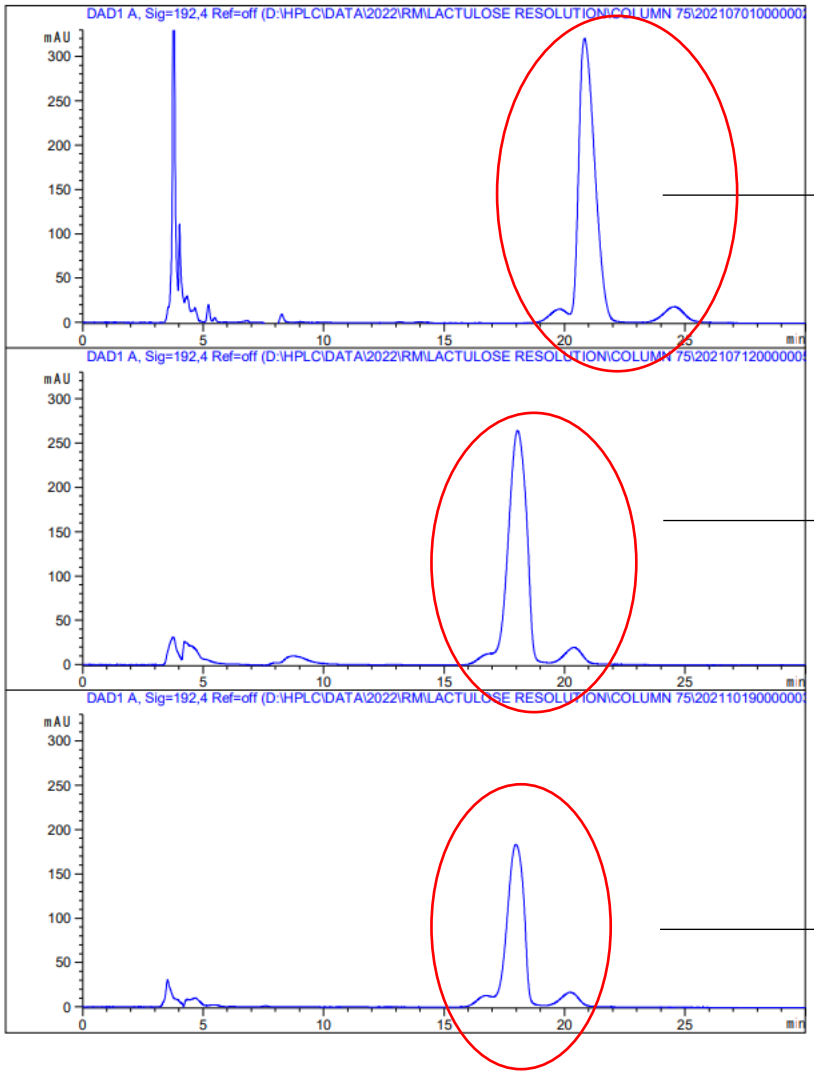
3.3.2.3 ล้างคอลัมน์แบบที่ 3 ด้วยอะซิโตไนไตรล์ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามอัตราส่วนและเวลา ดังตารางที่ 3.1 โดยจะทำการกลับด้านคอลัมน์ล้างแบบส่วนทาง จากนั้นทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการล้างตามข้อที่ 3.3.2.1.2

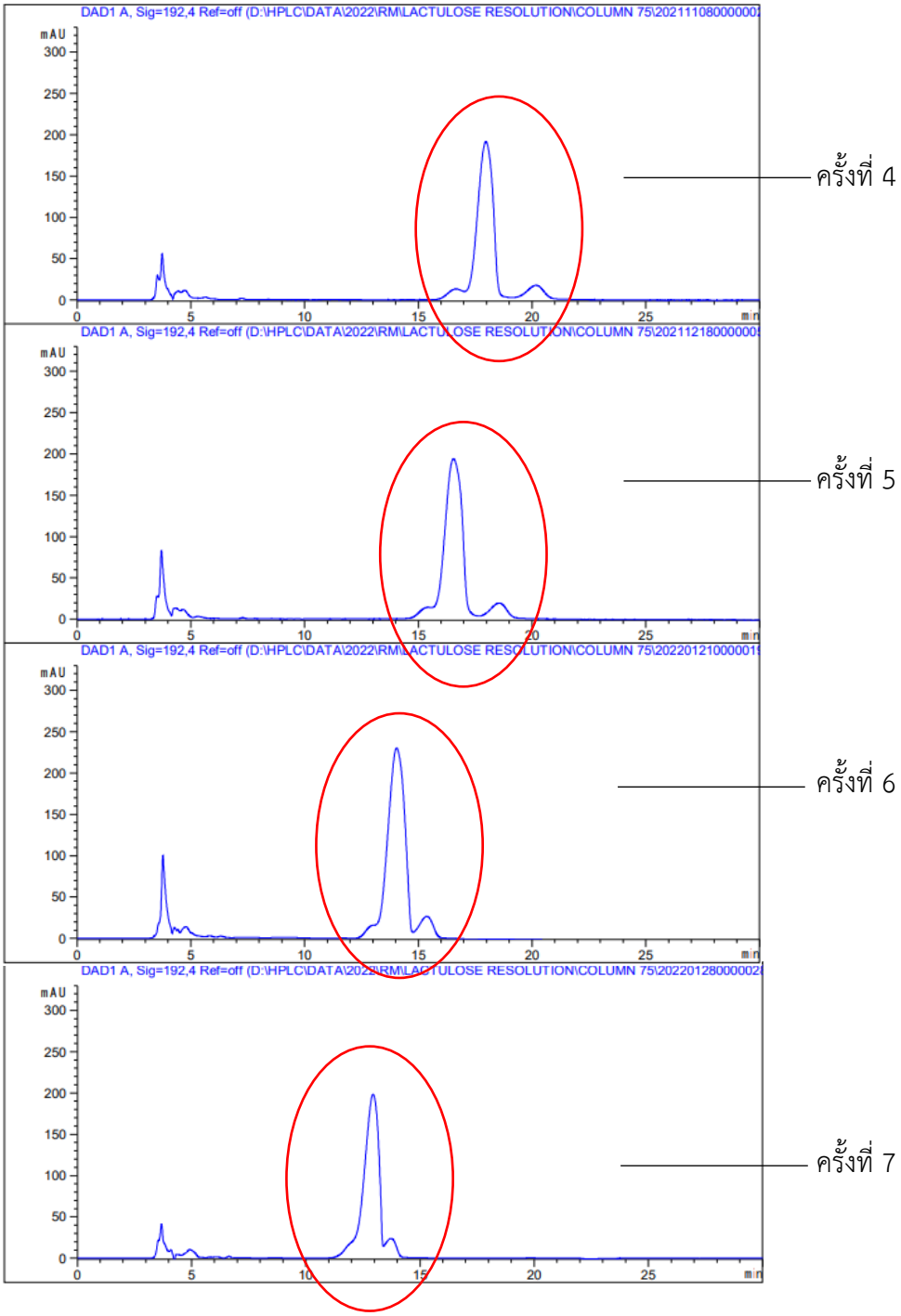
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ข้อมูลการใช้งานของคอลัมน์

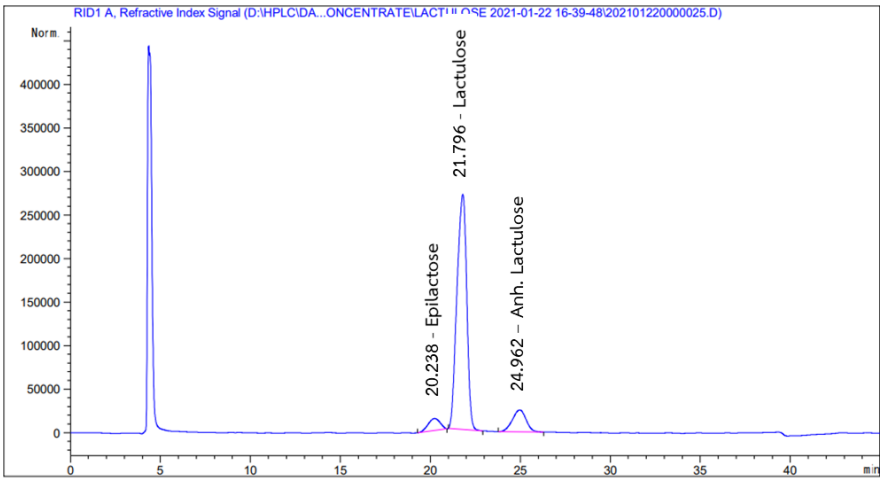
ข้อมูลการใช้งานจากสมุดบันทึกการใช้งานคอลัมน์นี้ได้ใช้ไปทั้งหมด 7 ครั้ง ในการทำการวิเคราะห์ โดยแต่ละครั้งที่ทำการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงคือ พีคที่แยกออกจากกันของการตรวจสอบสภาวะความเหมาะสมของเครื่องมือนั้นแยกออกจากกันไม่ชัดเจน ทำให้ค่า Resolution ไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน USP41 ซึ่งเป็นเพราะคอลัมน์นั้นเสื่อมประสิทธิภาพ สังเกตได้จากรูปที่เปรียบเทียบ





รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบพีคที่ได้จากการใช้งานคอลัมน์ในแต่ละครั้ง

จากภาพจะเห็นได้ว่า พีคมีการแยกตัวได้น้อยลงจนกระทั่งแยกตัวไม่ได้ในครั้งสุดท้ายของการใช้คอลัมน์นี้ โดยคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพนั้นควรจะมีพีคออกมาสวยงาม ดังรูปที่ 4.2

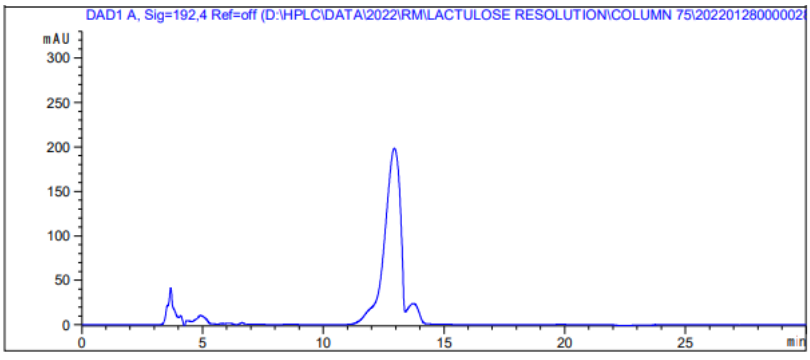


รูปที่ 4.2 พีค System Suitability ของแลคตูโลส

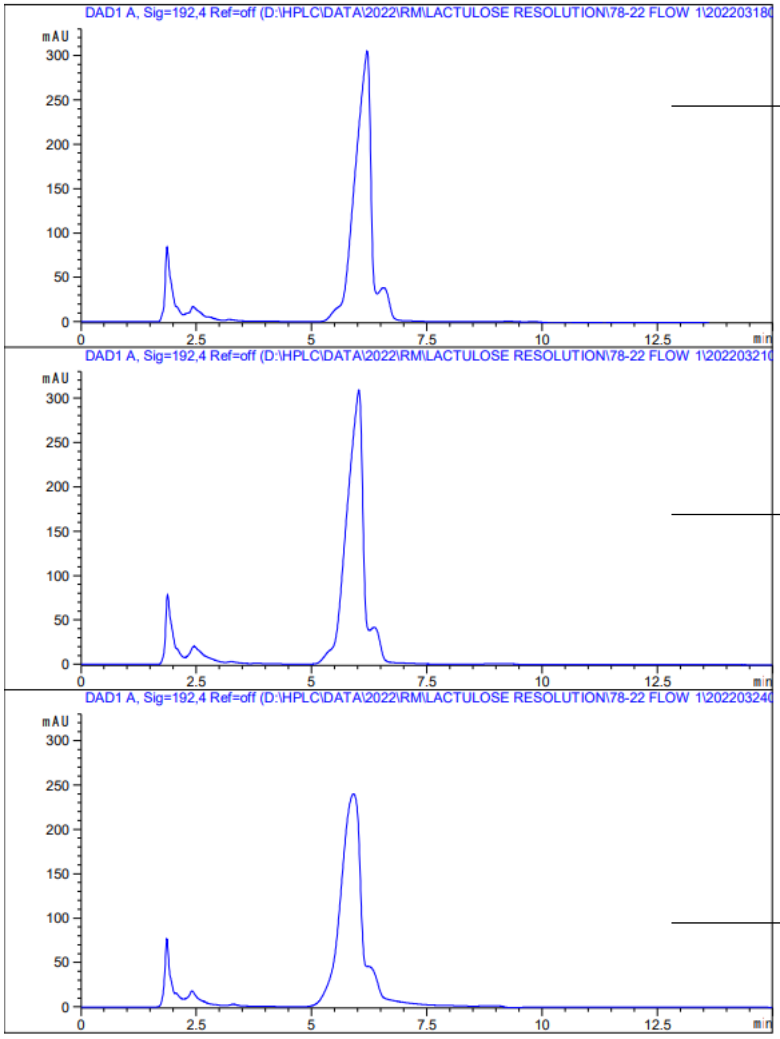
4.2 ผลลัพธ์การฟื้นฟูประสิทธิภาพคอลัมน์

4.2.1 ผลลัพธ์ของการล้างคอลัมน์ทั้ง 3 ครั้ง จากการทดลองฉีดทั้ง 3 แบบ

4.2.1.1 จากการทดลองฉีดด้วยอัตราส่วนโมบายเฟส 22:78 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ได้ผลดังรูปที่ 4.4 โดยจะเห็นได้ว่า การล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1 และ 2 ผลนั้นใกล้เคียงกัน แต่พีคก็ยังคงไม่แยกกันอย่างชัดเจน จึงทำการล้างครั้งที่ 3 แล้วเมื่อล้างครั้งที่ 3 ก็เห็นได้ว่า พีคที่เป็นของอิพิแลคโตสนั้นหายไปจนไม่มีการแยก

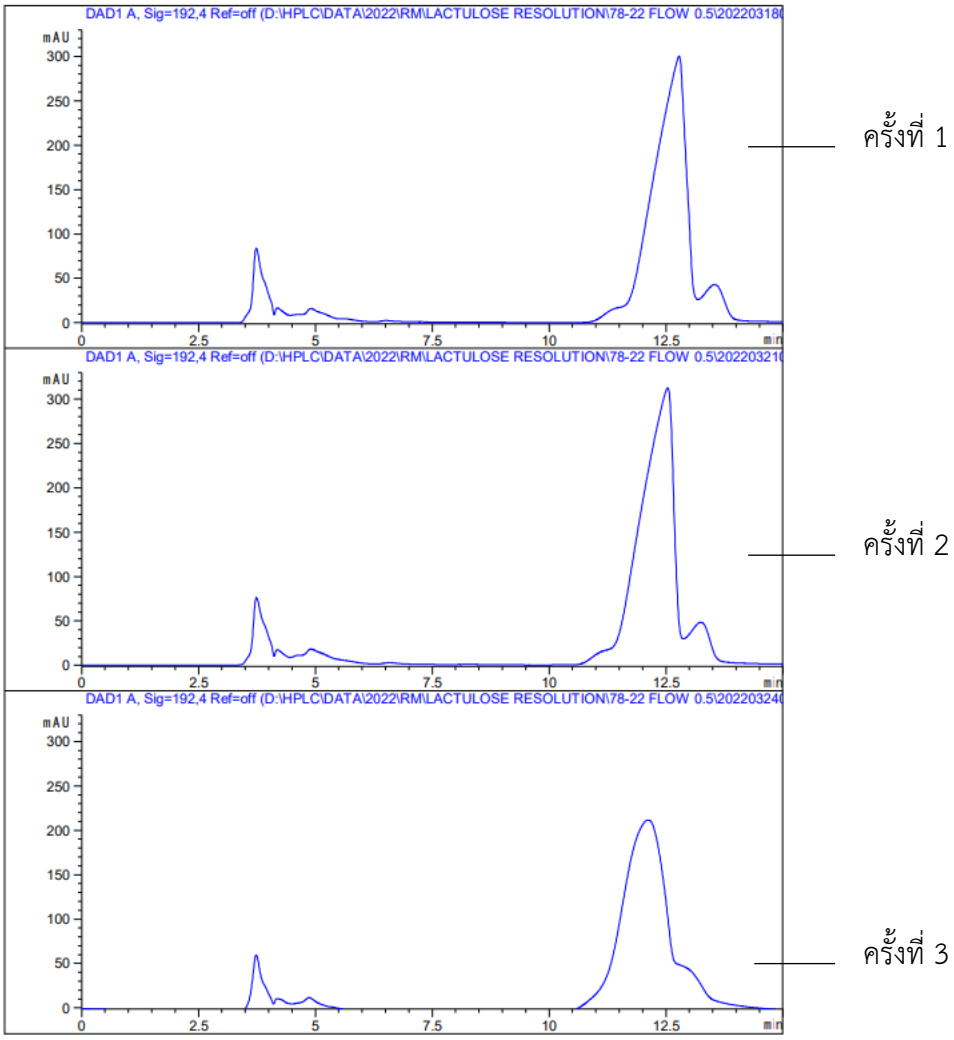


รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ก่อนการล้างคอลัมน์



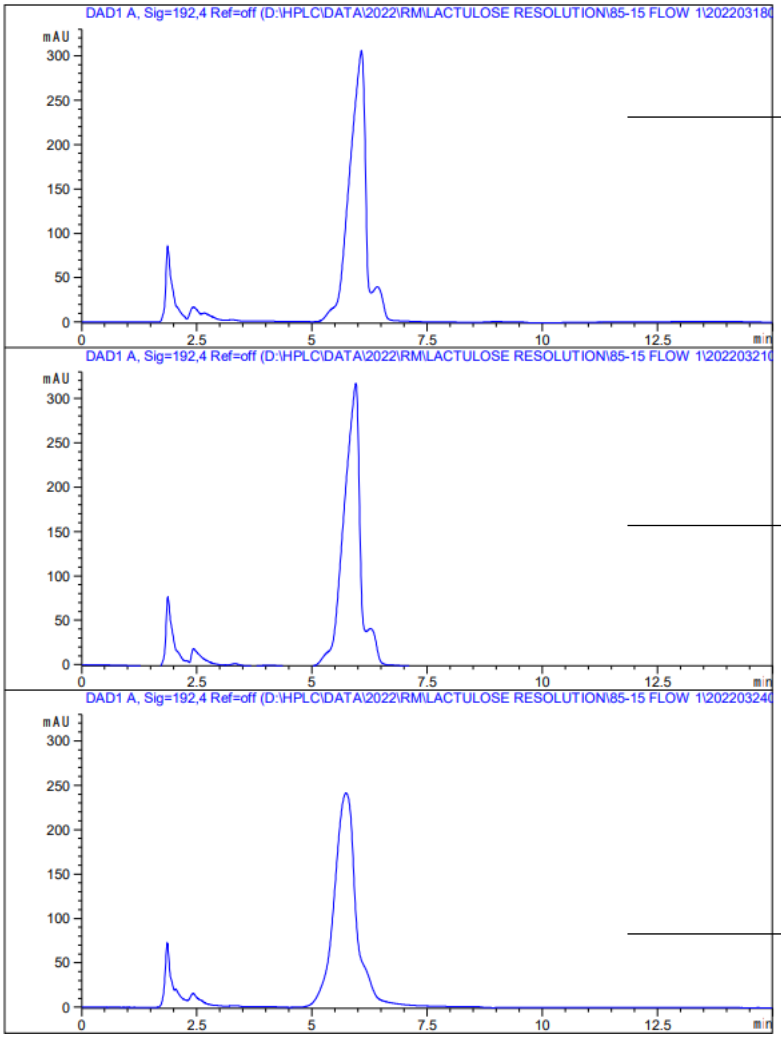
รูปที่ 4.4 การทดลองฉีดแบบที่ 1

4.2.1.2 จากการทดลองฉีดด้วยอัตราส่วนโมบายเฟส 22 : 78 ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ได้ผลดังรูปที่ 4.5 โดยจะเห็นได้ว่าการฉีดที่อัตราการไหลต่ำลงทำให้พีคออกที่เวลาช้าลง และพีคมีความกว้างและแยกได้ดีกว่าการฉีดแบบที่ 1 เล็กน้อย โดยการล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1 และ 2 ผลนั้นใกล้เคียงกัน แต่พีคก็ยังคงไม่แยกกันอย่างชัดเจน จึงทำการล้างครั้งที่ 3 แล้วเมื่อล้างครั้งที่ 3 ก็เห็นได้ว่าพีคที่เป็นของ Epilactose นั้นหายไปไม่แยกออกเห็น และพีคมีความสูงที่ต่ำลง มีฐานพีคที่กว้างขึ้น



รูปที่ 4.5 การทดลองฉีดแบบที่ 2

4.2.1.2 จากการทดลองฉีดด้วยอัตราส่วนโมบายเฟส 15 : 85 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ได้ผลดังรูปที่ 4.6 โดยจะเห็นได้ว่าเมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนโมบายเฟสพีคมีความกว้างต่ำลง และการแยกก็ไม่ได้ดีขึ้นจากการฉีดด้วยโมบายเฟสในอัตราส่วนที่ผ่านมา โดยการล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1 และ 2 ผลนั้นใกล้เคียงกัน แต่พีคก็ยังคงไม่แยกกันอย่างชัดเจน จึงทำการล้างครั้งที่ 3 แล้วเมื่อล้างครั้งที่ 3 ก็เห็นได้ว่าพีคที่เป็นของอิพิแลคโตสนั้นหายไปไม่แยกออก และพีคของ แลคโตสแยกออกมาน้อยมาก ๆ มีแต่พีคของแลคตูโลส



รูปที่ 4.6 การทดลองฉีดแบบที่ 3

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาปัญหาของการเสื่อมประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์แลคตูโลส พบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ไป 7 ครั้ง ผลการวิเคราะห์ก็ไม่ผ่านเกณฑ์ ซึ่งเกิดจากการแยกตัวของพีคที่ตรวจสอบความเหมาะสมของเครื่องมือนั้นแยกตัวกันได้น้อย เนื่องจากประสิทธิภาพของคอลัมน์ต่ำลงจึงทำให้ใช้ในการวิเคราะห์ไม่ได้

จากการศึกษาปัญหาแล้วจึงคิดหาวิธีแก้ปัญหา โดยเราทำการทดลองฟื้นฟูประสิทธิภาพของคอลัมน์ในวิธีการต่าง ๆ คือ ล้างคอลัมน์ด้วยอะซิโตไนไตรล์ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งจะเป็นการล้าง 3 แบบ โดยแบบที่ 1 ล้างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบบที่ 2 ล้างที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และสุดท้ายแบบที่ 3 จะเป็นการกลับคอลัมน์แล้วล้างเหมือนแบบที่ 2 จากนั้นก็ทำการตรวจสอบการล้างคอลัมน์ในแต่ละครั้ง โดยจะทำการตรวจสอบ 3 แบบ ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้น เมื่อนำมาตรวจสอบแล้วจะเห็นได้ว่า การล้างครั้งที่ 1 และ 2 มีผลไปในทางที่ดีขึ้น แต่เมื่อล้างครั้งที่ 3 ผลที่ได้ไม่ดีเลย โดยสังเกตจากพีคที่ไม่แยกออกจากกันจนมองเห็นเป็นพีคเดียว จากที่ควรจะเป็น 3 พีค

เนื่องจากเวลาที่มีจำกัด ไม่เพียงพอที่จะศึกษาต่อจนได้ผลสำเร็จ และแก้ปัญหาได้ เราจึงได้หาวิธีข้อเสนอแนะที่จะทำการศึกษา และแก้ปัญหาต่อไปมาเพื่อสนับสนุนการศึกษา และแก้ปัญหาต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เลือกใช้วิธีการเหล่านี้กับคอลัมน์ L8 ยี่ห้ออื่นที่เสื่อมประสิทธิภาพ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของคอลัมน์แต่ละยี่ห้อ

5.2.2 เลือกใช้วิธีการฟื้นฟูประสิทธิภาพคอลัมน์ด้วย 100 % เอทิลอะซิเตต (Agilent, 2018)

5.2.3 เลือกใช้คอลัมน์แบบเฟสย้อนกลับ เช่น NUCLEOSIL® NH_2 RP (Thomas Scientific, 2022) และ Inertsil NH_2 with 100% CH_3CN (GL sciences, 2022) เป็นต้น

5.2.4 ควรทำ number of the plates (n) เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของคอลัมน์

5.3 ประโยชน์ที่ได้รับ

5.3.1 ได้ทราบปัญหาของคอลัมน์ L8 ที่ใช้วิเคราะห์แลคตูโลส

5.3.2 ได้ทราบผลของการทดลองที่แก้ปัญหาแล้ว ทั้งหมด 3 แบบ

บรรณานุกรม

จิราพรรณ ทองหยอด. (2549). การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Method Validation. กรมวิชาการเกษตร.

โอภาส บุญเกิด. (n.d.). โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. (n.p.)

Agilent. (2018). Column USER GUIDE for Agilent Normal-Phase and HILIC Columns. Canada.

Authority of USP. (2018). Lactulose Concentrate. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, (41), 2324.

Geocities. (n.d.). การใช้และการดูแลรักษาเครื่อง HPLC. http://www.geocities.ws/chem_friend_club/use.html

Gonzaga, N., Watanabe, L., Mareze, J., Madeira, T., Tamanini, R., Rios, E., Nixdorf S., & Beloti, B. (2019). Green method using water for lactose and lactulose extraction and determination in milk by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108288

Hawach. (n.d.). NH2 HPLC Columns Description. https://www.hawachhplccolumn.com/product/nh2-hplc-columns/?fbclid=IwAR2wZiCgJrunX4b2jhbO8kwhXHPFceYQRcb0AKVcmtVQpAba2opINNdphqE

Karkacier, M., Erbas, M., Uslu, M.K., & Aksu, M. (2003). Comparison of Different Extraction and Detection Methods for Sugars Using Amino-Bonded Phase HPLC. https://doi.org/10.1093/chromsci/41.6.331

บรรณานุกรม (ต่อ)

Merck, K., Darmstadt., &Germany. (2022). SUPELCOSIL™ LC-NH2 HPLC Column. https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/supelco/58338?gclid=CjwKCAjwu_mSBhAYEiwA5BBmfxzqD40Vb9pNoz9xyI93tpA9sVmB_ULr0qsVe7zsHGoBn- IfUFim_RoCAOMQAvD_BwE

Olsen, B. A. (2001). Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01063-3

Pazourek, J. (2019). Rapid HPLC method for monitoring of lactulose production with a high yield. https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107773Get

Pobpad. (2016). Lactulose (แล็กทูโลส). https://www.pobpad.com/lactulose

sciences, G. (2022). HILIC Columns Inertsil NH2 Analytical Columns. https://www.glsciences.com/product/lc_columns/hilic_column/01820.html?fbclid=IwAR11EtN0Nhis9nvSXClsaWqb-zoYvG6eE47IbYie8C9__p8JKbOvOgliis0

Thomas, S. (2022). NUCLEOSIL® NH2/NH2 RP HPLC Columns. www.thomassci.com/Equipment/HPLC-Columns/_/NUCLEOSIL-NH2/NH2-RP-HPLC-Columns?fbclid=IwAR1uh50e3szT18JqSSHRLKKK7ZhTH4r6XOiezlPXgaAjJh0bhKhsps12Gwk

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล นางสาวเย็นฤดี นพธรรม

วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 27 ตุลาคม พ.ศ. 2542

ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 489 หมู่ 12 บ้านใหม่ชัยมงคล ตำบลหนองบัวแดง อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ รหัสไปรษณีย์ 36210

E - mail address 6140201114@nrru.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. 2551 จบการศึกษาระดับประถมศึกษา จากโรงเรียนอนุบาลชุมชนหนองบัวแดง ตำบลหนองบัวแดง อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ 36210

ปี พ.ศ. 2554 จบการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนหนองบัวแดงวิทยา ตำบลหนองบัวแดง อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ 36210

ปี พ.ศ. 2557 จบการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนชัยภูมิภักดีชุมพล ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ 36000