การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction (SPE)

อารีย์ คชฤทธิ์*

บทนำ

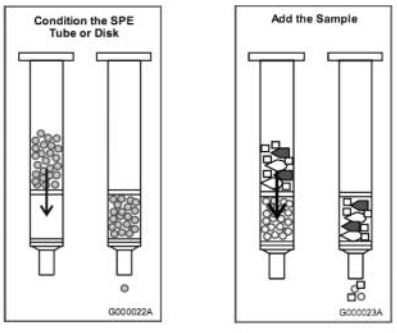
การเตรียมตัวอย่างให้เป็นสารละลายใส ไม่มีสิ่งเจือปนลดการปนเปื้อนของสารรบกวน และเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ (analyte) เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญขั้นตอนหนึ่ง ในการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟี เนื่องจากสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง มีผลทำให้ความถูกต้อง แม่นยำ และความจำเพาะของการวิเคราะห์ลดลง นอกจากนี้ยังอาจทำให้เครื่องมืออุดตันและเกิดความเสียหายได้ การเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การตกตะกอน การกรอง วิธี Solid Phase Micro Extraction (SPME) และวิธี Solid Phase Extraction (SPE) ซึ่งจะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับลักษณะของตัวอย่างและคุณสมบัติของสารที่สนใจวิเคราะห์ เทคนิค SPE มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟี เนื่องจากใช้ตัวทำละลายน้อย สามารถต่อระบบอัตโนมัติกับเครื่องมือวิเคราะห์ได้

หลักการ

เทคนิค SPE เป็นการสกัดสารที่สนใจวิเคราะห์จากตัวอย่างโดยใช้หลักการกระจายตัว (partition) ระหว่างสารที่สนใจวิเคราะห์ในตัวอย่าง กับตัวดูดซับที่เป็นของแข็ง (solid phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด SPE ตัวดูดซับจะต้องสามารถจับสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ดีโดยอาศัยหลักการเช่นเดียวกับหลักการทางโครมาโทกราฟี ซึ่งพิจารณาจากสภาพขั้ว ว่าสารที่สนใจวิเคราะห์มีสภาพขั้วเป็นอย่างไร ให้เลือกตัวดูดซับที่มีขั้วตรงกับสารที่สนใจวิเคราะห์ เช่น ถ้าสารที่สนใจวิเคราะห์ละลายในน้ำได้ดี เป็นพวกที่มีประจุ และสามารถละลายได้ที่ความเป็นกรดด่างที่เฉพาะค่าหนึ่ง การสกัดตัวอย่างนี้จะใช้ตัวดูดซับชนิด ion exchanger โดยใช้ anion exchanger สำหรับสารที่มีประจุลบ และ cation exchanger สำหรับสารที่มีประจุบวก นอกจากนี้ผู้ใช้จะต้องเลือกอุปกรณ์ SPE ที่เหมาะสมกับตัวอย่างที่จะแยก โดยพิจารณาจากขนาดของหลอด SPE และปริมาณของตัวดูดซับที่บรรจุต้องเหมาะสมกับปริมาณของตัวอย่างที่จะสกัดด้วยเช่นกัน โดยปริมาณของสารที่สนใจวิเคราะห์จะต้องมีไม่มากกว่าของตัวดูดซับเกิน 5 เปอร์เซ็นต์ เทคนิคนี้สามารถใช้ได้กับการเตรียมตัวอย่างของเหลว หรือของแข็งที่ละลายให้อยู่ในรูปของเหลวได้[6],[7]

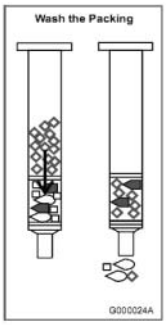
การสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค SPE

การสกัดสารที่สนใจวิเคราะห์ออกจากตัวอย่างด้วยเทคนิค SPE ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ตามลำดับดังนี้ ดังแสดงในภาพที่ 1[3]

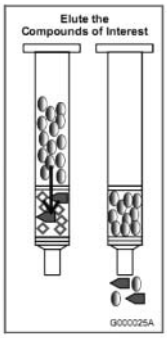


ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนที่ 2

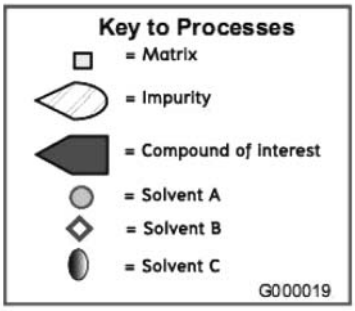
* นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ



ขั้นตอนที่ 3



ขั้นตอนที่ 4



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค SPE

ขั้นตอนที่ 1. การปรับสภาพ (condition) ตัวดูดซับ

ขั้นแรกต้องผ่านตัวทำละลายลงบนตัวดูดซับก่อนที่จะสกัดตัวอย่างเพื่อเป็นการกระตุ้นตัวดูดซับ ทำให้สารที่สนใจวิเคราะห์มีโอกาสสัมผัสหรือเข้าใกล้เฟสของแข็งให้มากที่สุด ตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนนี้ต้องเลือกให้มีสภาพขั้วเหมาะสมกับตัวดูดซับ เช่นในกรณีที่ตัวดูดซับเป็นชนิดไม่ละลายน้ำ ให้ปรับสภาพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เมทธานอล แล้วตามด้วยน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ ถ้าตัวดูดซับเป็นชนิดที่มีประจุปรับสภาพด้วยน้ำ และสารละลายบัฟเฟอร์

ขั้นตอนที่ 2. การใส่ตัวอย่าง (loading)

เนื่องจากเฟสของแข็งที่บรรจุในหลอด SPE มีอนุภาคขนาดเล็ก ทำให้บางครั้งต้องใช้แรงดันช่วยให้สารละลายไหลผ่าน สามารถทำได้โดยใช้แรงดันผลักสารละลายให้ผ่าน ตัวดูดซับออกมา เหมือนการฉีดยาด้วยเข็มฉีดยา หรือใช้แรงดูดทางด้านปลายด้วยปั๊มสุญญากาศ ประสิทธิภาพของการสกัดจะขึ้นกับอัตราเร็วของการผ่านสารละลาย ตัวดูดซับที่มีขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าตัวดูดซับขนาดใหญ่ อัตราการไหลของตัวอย่างที่เหมาะสมจะทำให้สารที่สนใจถูกหน่วง (retain) ได้อย่างสมบูรณ์บนผิวของตัวดูดซับระหว่างการผ่านสารละลายไม่ควรปล่อยให้เกิดการแห้ง เนื่องจากตัวดูดซับส่วนใหญ่ เมื่อแห้งตัวเฟสของเหลวที่เป็นสายไฮโดร-คาร์บอนจะเกิดการคดตัว ทำให้ลดโอกาสของการสัมผัสกันระหว่างสารละลายกับเฟสของแข็ง ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง

ตัวอย่างที่ใส่ลงในหลอด SPE ต้องมีปริมาตรที่แน่นอนและไม่มากเกินความจุของหลอดซึ่งหากใส่ในปริมาตรที่มากเกินไป อาจทำให้ร้อยละการวิเคราะห์กลับคืนของการสกัดลดลงเนื่องจากตัวดูดซับไม่มีพื้นที่มากพอที่จะจับสาร ที่สนใจไว้หมดจึงทำให้สารบางส่วนหลุดออกไปก่อนที่จะถึงขั้นตอนการชะ (elute)

ขั้นตอนที่ 3 การล้างสารปนเปื้อน (washing)

เมื่อผ่านสารตัวอย่างลงในหลอด SPE จะมีสารที่ปนเปื้อนบางชนิดจับที่บริเวณผิวของตัวดูดซับได้ จึงต้องชะสารปนเปื้อนเหล่านี้ออกจากตัวดูดซับก่อนโดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแรงของสภาพขั้ว ความเป็นกรด ด่าง และอัตราการไหลที่พอเหมาะโดยไม่ทำให้สารที่สนใจถูกชะออกมาด้วย ขั้นตอนนี้จะทำให้ตัวอย่างสะอาดขึ้นลดการรบกวน ของสารปนเปื้อนในขั้นตอนการวิเคราะห์ต่อไป

ขั้นตอนที่ 4. การชะ (eluting)

เป็นการชะสารที่สนใจวิเคราะห์ออกจากพื้นผิวของตัวดูดซับ ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะจะต้องมีความแรงมากพอ ที่จะดึงเอาสารที่สนใจหลุดออกมาได้หมด ซึ่งต้องเลือกชนิด อัตราการไหล และปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้ตัวอย่างที่ได้สะอาด ลดการรบกวนจากสารปนเปื้อนต่าง ๆ และให้ค่าร้อยละการวิเคราะห์กลับคืนสูง

โดยทั่วไปจะใช้ปริมาตรตัวทำละลายให้น้อยที่สุด ตัวทำละลายที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง (free from impurity) ไม่เป็นพิษ (non toxic) และเหมาะสมต่อเทคนิคที่จะใช้ในการวิเคราะห์สารต่อไป เช่น การนำสารไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) ควรเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีจุดเดือดไม่สูงมาก[4]

การประยุกต์ใช้เทคนิค SPE

เทคนิค Solid Phase Extraction (SPE) สามารถประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวอย่างได้อย่างกว้างขวาง เช่น การวิเคราะห์ระดับยาเลือด การวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำ การวิเคราะห์โลหะหนักปนเปื้อนในอาหาร และในสิ่งแวดล้อม ดังแสดงในตารางที่ 1

สารที่สนใจวิเคราะห์	ตัวอย่าง	ตัวดูดซับ	ค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้	ร้อยละการวิเคราะห์กลับคืน
Theophylline	เลือด	Molecularly imprinted polymers (MIPs)	0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	79-83 % [1]
Cu(II),Co(II), Ni(ii) และ Pb(II)	น้ำในสิ่งแวดล้อม	multiwalled carbon nanotubes (MWNTs)	1.64-5.68 ไมโครกรัมต่อลิตร [2]	-
สารเคมีกำจัดแมลง	น้ำในสิ่งแวดล้อม	C18-functionalized silica, Amberlite XAD-2 Bond Elut PPL หรือ Abselut Nexus	0.1-30 นาโนกรัมต่อลิตร	ค่าร้อยละการวิเคราะห์กลับคืนมากกว่า 75% [4]
Chrolophenols (CPs)	น้ำประปาและน้ำจากแม่น้ำ	Graphene	0.1-0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	ร้อยละการวิเคราะห์กลับคืน เท่ากับ 77.2-116.6%[5]

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค SPE ในการเตรียมตัวอย่าง

ปัจจุบันมีการพัฒนาตัวดูดซับให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น มีความจำเพาะต่อสารที่สนใจวิเคราะห์ มีพื้นที่ผิวในการดูดซับสูงขึ้น และสามารถใช้ซ้ำได้ เช่น การใช้ Graphene ซึ่งเป็นสารประกอบนาโนคาร์บอนที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ เป็นตัวดูดซับสำหรับสกัดสารกลุ่ม Chrolophenols (CPs) จากตัวอย่างน้ำประปา และน้ำจากแม่น้ำ หลังจากการสกัดแล้วล้างตัวดูดซับด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจะสามารถนำมาใช้สกัดซ้ำได้อีกทันที[5]

เห็นได้ว่าเทคนิค SPE มีประโยชน์ในการเตรียมตัวอย่างที่มีการรบกวนของสารปนเปื้อนและมีความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ปริมาณน้อย ๆ เนื่องจากการสกัดด้วยเทคนิคนี้มีขั้นตอนการล้างสารปนเปื้อนออกก่อน ทำให้ตัวอย่างสะอาดขึ้น การใช้ปริมาตรของตัวทำละลายน้อยในการชะสารที่สนใจวิเคราะห์ออกจากตัวดูดซับ ทำให้สารที่สนใจวิเคราะห์มีความเข้มข้นสูงขึ้น ความไวในการวิเคราะห์ และร้อยละการวิเคราะห์กลับคืนสูงขึ้นด้วย สามารถประยุกต์ใช้ได้กับตัวอย่างหลายประเภทโดยการเลือกใช้ตัวดูดซับและทำละลาย ให้เหมาะกับสารที่สนใจวิเคราะห์และเทคนิคในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังต่อเข้ากับเครื่องมือวิเคราะห์และสามารถทำงานได้โดยอัตโนมัติ ทำให้สะดวกและรวดเร็ว ห้องปฏิบัติการจำเป็นจะต้องมีการพัฒนาศักยภาพ และขอบเขตการวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ โดยมีความถูกต้อง และแม่นยำสูง นอกจากเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ก็เป็นอีกขั้นตอนที่มีความสำคัญ ดังนั้นการสกัดด้วยเทคนิค SPE จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับห้องปฏิบัติการที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ตามความเหมาะสม

..... เอกสารอ้างอิง .....

Afahin Rajabi Khorrami and Amene Rashidpur Design of a new cartridge for selective solid phase extraction using molecularly imprinted polymers : selective extraction of theophylline from human serum samples. **Journal of Biosensors and Bioelectronics,** April, 2009, Vol. 25, No. 4, p.647-651.

Ali Dur., et al. Preconcentration of some trace elements via using multiwalled carbon nanotubes as solid phase extraction adsorbent. **Journal of Hazardous Materails,** April, 2009, Vol.169, No. 4, p.466-471.

Georges-Marie Momplaisir., et al. Development of solid phase extraction method for agricultural pesticides in large-volume water samples. **Journal of Talanta,** February, 2010, Vol. 8, No.2, p.1380-1386.

Qian Llu., et al. Evaluation of graphene as an advantageous adsorbent for solid- phase extraction with chlorophenols as model analytes **Journal of Chromatography A,** 2011, Vol.1218, p.197-204.

Review, Evaluation,and Application of solid Phase Extraction Method. **[Online]** University of Iowa [cited July 20 2007] Available from Internet : http://www.uhl.uiowa.edu.

Somenath Mitra. **Sample preparation techniques in analytical chemistry.** Volume 162. New Jersey : Wiley, 2003, p. 74-113

Supelco Sigms- Aldrich Co. Guide to solid phase extraction . Bulletin 910. **[Online].** [cited 2 April 2010]. Available from Internet : www.sigmaaldrich.com.